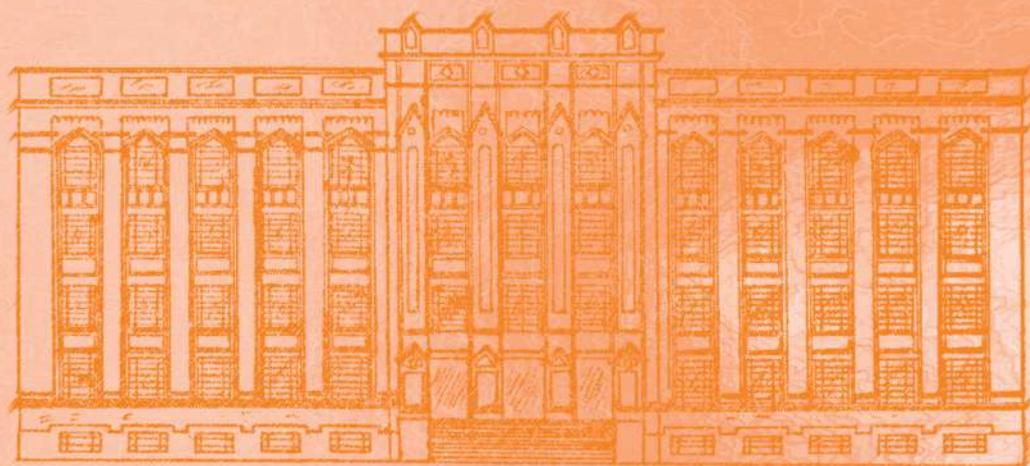


REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ

ISSN 0073-9855
RIALA6



Volume 67 número 3, 2008



GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE



Governo do Estado de São Paulo
Secretaria de Estado da Saúde
Coordenadoria de Controle de Doenças
Instituto Adolfo Lutz

**REVISTA
DO
INSTITUTO ADOLFO LUTZ**

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

Volume 67 número 3, 2008

ISSN 0073-9855

Setembro – Dezembro - 2008

INSTITUTO ADOLFO LUTZ

Diretor Geral do Instituto Adolfo Lutz
Marta Lopes Salomão

Editor Chefe
Thaís Valéria Milanez

Editor Adjunto
Adriana Bugno

Editores Assistentes
Cecília Cristina Marques dos Santos
Cristina Takami Kanamura
Luzia Setuko Umeda Yamamoto
Raquel dos Anjos Fazioli
Sônia França Correia Barbosa
André Gustavo Tempone Cardoso
Márcia Bittar Atuí

Conselho Editorial/Editorial Board

Adele Caterino de Araújo, São Paulo, Brasil.
Alexandre Januário da Silva, Atlanta, EUA
Antonio Ruffino Netto, Ribeirão Preto, Brasil.
Bernadette Dora G. de Melo Franco, São Paulo, Brasil.
Delia Rodrigues Amaya, Campinas, Brasil.
Eliseu Alves Waldman, São Paulo, Brasil.
Elizabeth Castañeda, Bogota, Colômbia.
Elizabeth de Souza Nascimento, São Paulo, Brasil.
Fernando C. Schmitt, Porto, Portugal.
Gordon S. Shephard, Cape Town, África do Sul.
Guilherme Prado, Belo Horizonte, Brasil.
Hans P. van Egmond, Bilthoven, Holanda.
Heitor Franco de Andrade Junior, São Paulo, Brasil.
John Gilbert, York, UK.
Juan Carlos Palomino, Antuérpia, Bélgica.

Lígia Bicudo de Almeida Muradian, São Paulo, Brasil.
Luz Elena Cano Restrepo, Medellín, Colômbia.
Maria José Mendes Gianini, Araraquara, Brasil.
Marluce Bibbo, Pennsylvania, EUA.
Martin Emilio Munk, Copenhagen, Dinamarca.
Myrna Sabino, São Paulo, Brasil.
Paul W. Flinn, Kansas, EUA.
Pedro Paulo Chieffi, São Paulo, Brasil.
Regina Maura Bueno Franco, Campinas, Brasil.
Susana Córdoba, Buenos Aires, Argentina.
Terezinha de Jesus Andreoli Pinto, São Paulo, Brasil.
Thales de Brito, São Paulo, Brasil.
Vanessa Yardley, London, UK.
Venâncio Avancini Ferreira Alves, São Paulo, Brasil.
Vera Akiko Maihara, São Paulo, Brasil.
Vera Lucia Garcia Calich, São Paulo, Brasil.

Setor de Publicações

Rocely Aparecida Bueno Moita

REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ
(Secretaria de Estado de Saúde)
São Paulo, SP – Brasil, 1941

1941-2007
2008, 67 (3)

ISSN 0073-9855
RIALA 6

CDD₁₈ 614.07205

(*) ASSOCIAÇÃO PAULISTA DE BIBLIOTECÁRIOS. Grupo de Bibliotecários Biomédicos
Normas para catalogação de publicações seriadas especializadas, São Paulo, Ed
Polígono, 1072.

Os artigos publicados na REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ são indexados por:
Abstracts on Hygiene and Communicable Diseases, AGRINDEX, Analytical Abstracts
Bibliografia Brasileira de Medicina Veterinária e Zootécnica, Biological Abstracts, Chemical
Abstracts, Food Science and Technology Abstracts, Index Medicus Latino-americano
LILACS/SP: Saúde Pública, Microbiology Abstracts, Sumários Correntes Brasileiros
Toxicology Abstracts, Tropical Diseases Bulletin, Virology Abstracts e outros.

Acesso on line/on line access. texto integral/full text. <http://revista.ial.sp.gov.br>

Endereço/Address
Biblioteca do Instituto Adolfo Lutz
Av. Dr. Arnaldo, 355 – 01246-902 São Paulo/SP - Brasil
Tel.: 3068-2869 – Fax: (11) 3082-9939
E-mail: rial@saude.sp.gov.br

Apoio:



Ministério
da Educação

Ministério da
Ciência e Tecnologia



INSTRUÇÃO AOS AUTORES

A REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ (RIAL) tem por finalidade a divulgação de trabalhos relacionados com as atividades laboratoriais em Saúde Pública.

1. Missão: esta revista tem como missão divulgar resultados de investigações científicas tanto básicas como aplicadas inclusive tecnológicas, abrangendo as diversas áreas de interesse em saúde pública, na forma de artigos originais, artigos de revisão, comunicações breves, notas científicas, relatos de caso, resumos de teses e dissertações.

2. Normas para Publicação: o trabalho submetido à publicação deve ser inédito, não sendo permitida a sua apresentação simultânea em outro periódico, conforme declaração a ser assinada pelos autores. Todas as opiniões e declarações contidas no trabalho são de responsabilidade exclusiva dos autores, não sendo necessariamente as mesmas do Corpo Editorial. Os trabalhos redigidos em língua portuguesa ou inglesa deverão ser enviados para o Setor de Publicações do Instituto Adolfo Lutz, em três cópias impressas, sendo uma completa e as outras duas omitindo os nomes dos autores e respectivas instituições, tanto na página de rosto como nos resumos em português e inglês. Após aprovação do trabalho, será solicitado aos autores o envio do artigo completo em cópia eletrônica acompanhado de uma cópia impressa.

3. Processo de Julgamento dos Manuscritos: os trabalhos serão aceitos para publicação após avaliação por dois pareceristas de unidades distintas daquela da origem dos autores do mesmo indicados pelo Corpo Editorial. Caso haja divergência entre seus pareceres, o artigo será encaminhado a um terceiro parecerista para decisão. A publicação de artigos está condicionada à aprovação do Corpo Editorial da Revista do Instituto Adolfo Lutz, que poderá sugerir ao autor alterações no original. Os manuscritos revisados com as cópias dos pareceres serão devolvidos aos autores para as devidas correções. Há sigilo no decorrer deste processo. O novo texto deverá retornar aos Editores que notificarão a aceitação ou a recusa do artigo. A lista de pareceristas que colaboraram em cada volume é publicada no último fascículo do ano.

4. Ética: os trabalhos de pesquisa envolvendo seres humanos deverão atender à Resolução nº 196/96 do CNS/MS e aqueles envolvendo ensaios com animais deverão atender a Lei Federal 9605 contra crimes ambientais e a Lei Federal 6638/76. No item Material e Métodos deverá constar o número do processo e o nome do Comitê que o aprovou. Os autores deverão ter em seu poder todos os documentos referentes a este procedimento, que poderão ser solicitados em qualquer momento pelos editores.

5. Conflito de Interesses: os autores ao submeterem um artigo científico a RIAL serão responsáveis por reconhecer e revelar conflitos financeiros, de interesse comercial, associativo relacionados ao material do trabalho ou outros que possam influenciá-lo, apresentando uma declaração sobre a existência ou não de tais conflitos. O autor deverá explicitar todo o apoio financeiro direto ou indiretamente recebido. Os agradecimentos às pessoas, por seu auxílio no trabalho, devem ter o seu consentimento documentado. Os pareceristas, também devem revelar aos editores qualquer conflito que possa influir ou impedir sua avaliação.

6. Ensaio Clínico: este periódico apóia as políticas para registros de ensaios clínicos da Organização Mundial da Saúde (OMS) e do *International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE)* em acesso aberto. Somente, serão aceitos para publicação os artigos de pesquisas clínicas que tenham recebido um número de identificação em um dos Registros de Ensaio Clínico validados pelos critérios estabelecidos pela OMS e ICMJE. O número de identificação deverá ser colocado ao final do resumo.

7. Categorias: os seguintes tipos de trabalhos serão aceitos para publicação na RIAL.

7.1. Artigo original: relato completo de pesquisa original ainda não publicada. Deve apresentar no máximo vinte páginas impressas, incluindo figuras, tabelas e referências.

7.2. Comunicação breve: é um artigo sucinto, com objetivo limitado ou cujos resultados sejam provenientes de estudos com metodologia de baixa complexidade ou rotineira, de relevância para a área de saúde pública. Deve apresentar o mesmo formato do artigo científico, contendo no máximo duas tabelas ou duas figuras ou uma tabela e uma figura, até quinze referências e dez páginas impressas.

7.3. Nota científica: é o relato de resultados parciais de um trabalho experimental dignos de publicação, embora insuficientes para constituírem um artigo original. Deve ser relevante e que mereça rápida divulgação. Deve apresentar no máximo duas tabelas ou duas figuras ou uma tabela e uma figura e até quinze referências e dez páginas impressas. O texto deve conter todos os tópicos de um artigo científico, porém na forma de texto único.

7.4. Relato de caso: contempla 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 anômicos e fisiológicos. Deve conter os tópicos: título e resumo

em português e inglês, introdução, relato do caso, discussão, conclusões, referências e apresentar no máximo três páginas incluindo figuras e tabelas e até dez referências.

7.5. Artigo de revisão: elaborado por especialista convidado pelo Corpo Editorial. Deve constituir uma avaliação da literatura sobre assunto cuja divulgação possa contribuir para melhorar o conhecimento da área. O Corpo Editorial aceitará sugestões que sejam relevantes à revista, sendo que neste caso deverá ser enviada uma sinopse para apreciação. A revisão deverá ser subdividida em tópicos, conter resumos em inglês e português e apresentar no máximo 15 páginas.

7.6. Resumos de teses e dissertações: serão aceitos para publicação os resumos de teses e dissertações até um ano após a defesa. Deverão conter o nome do autor e seu endereço eletrônico, o nome do orientador, título da obra (em português e em inglês), nome da instituição em que foi apresentada e ano da defesa. O resumo poderá ser publicado em língua portuguesa ou inglesa, sendo de total responsabilidade do autor o seu conteúdo e também a revisão ortográfica e gramatical.

8. Preparação do manuscrito ou artigo

Geral: os textos devem ser redigidos em processador de texto Word for Windows 6.0 ou compatível, no formato A4, espaço duplo, fonte Times New Roman, tamanho 12. Se usar versão superior, enviar o arquivo em Rich Text Format (.rtf). Devem ser evitados arquivos compactados.

Estrutura

Página de rosto: a) título do artigo; b) nome do(s) autor(es): nome seguido do último sobrenome por extenso e em caixa alta (ex.: Ana Maria C. D. da SILVA); c) local de trabalho indicado por número sobrescrito. O autor responsável e o seu endereço deverão estar assinalados com asterisco (*) para encaminhamento da correspondência.

Resumo: deve ser redigido em português, ser claro e conciso num único parágrafo, contendo objetivo, metodologias, resultados e conclusões. Não deve exceder a 200 palavras.

Palavra-chave: podem ser utilizados até seis descritores que identifiquem o conteúdo do artigo, se possível baseados no DECS (Descritores em Ciências da Saúde), disponível no www.bireme.br terminologia em saúde e consulta ao DECS ou no *Medical Subject Headings (MeSH)*, do *Index Medicus*, disponível no www.nlm.nih.gov/meshhome.html.

Introdução: deve iniciar em página nova e deve conter os objetivos da pesquisa, justificativa de sua importância, apresentação das principais variáveis, definições necessárias e discussão do problema de acordo com a literatura pertinente.

Material e Métodos: o método deve estar claramente descrito e validado, de modo a possibilitar a sua reprodução. Qualquer modificação, em métodos já publicados, deve ser devidamente explicitada.

Resultados: devem ser claros e concisos e podem apresentar tabelas e figuras quando necessárias, que devem ser auto explicativas. As figuras devem ser enviadas em arquivos separados, legendas no texto original, suficientemente claras para permitir sua reprodução (mínimo 300 dpi), fotos em arquivos (.tif).

Discussão: deve fornecer a interpretação dos resultados em função das informações apresentadas. Este item pode ser incluído em resultados, não havendo necessidade de repeti-lo em item à parte.

Conclusão: deve ser clara, concisa podendo, em alguns casos, ser incluída no item discussão não havendo a necessidade de repeti-la em item à parte.

Agradecimentos: é opcional e deve vir após a discussão/conclusão.

Title, Abstract e Key words: devem ser redigidos em inglês e seguir as recomendações apresentadas para a página de rosto, do resumo e das palavras-chave.

Referências: as referências devem ser citadas seguindo os "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" produzidos pelo International Committee of Medical Journal Editors, também conhecidos como Vancouver Style. Os autores devem seguir as diretrizes da quinta edição (Annals of Internal Medicine 1997; 126: 36-47 ou na página (website) <http://acponline.org/journals/resource/unifreq/htm>.

As referências devem ser numeradas consecutivamente na ordem em que foram mencionadas a primeira vez no texto. Identifique as referências no texto, tabelas e legendas de ilustrações por numerais arábicos sobrescritos. As referências citadas em tabelas ou em legendas devem ser numeradas de acordo com a seqüência estabelecida pela sua primeira identificação no texto.

Segundo o Sistema Vancouver, deve-se evitar a utilização de resumos bem como as "observações inéditas" e as "comunicações pessoais" como referências, mas as comunicações escritas (não verbais) podem ser inseridas entre parênteses no texto. Os artigos aceitos para publicação, porém, ainda não publicados, podem ser incluídos na relação das referências, bastando indicar a revista e citar entre parênteses "no prelo".

Informações extraídas de manuscritos submetidos, porém ainda não aceitos, devem ser citados no texto como “observações inéditas” (entre parêntesis). Os títulos das revistas devem ser abreviados de acordo com o Index Medicus seja pela List of Journals Indexed in Index Medicus ou no “website” <http://www.nlm.nih.gov> ou pelo Chemical Abstracts, ISI Science Citation Index, World List of Periodicals (publicado por Butterworks, Londres). Exemplos:

Artigos em revistas

Periódicos. Liste os primeiros seis autores seguidos por et al.

Telles MAS, Mosca A. Avaliação da técnica de microdiluição em placa para determinação de concentração inibitória mínima de isoniazida em cepas de *Mycobacterium tuberculosis*. Rev Inst Adolfo Lutz 2000; 59 (1/2): 15-9.

Número com suplemento

Payne DK, Sullivan MD, Massie MJ. Women's psychological reactions to breast cancer. Semin Oncol 1996; 23 (1 Suppl 2): 89-97.

Volume com suplemento

Maio FD. Determinação de chumbo sanguíneo: a importância de programas interlaboratoriais na avaliação da qualidade analítica laboratorial. Rev Inst Adolfo Lutz 2002; 61 (Suppl 1): 3.

Instituição como autor

The Cardiac Society of Australia and New Zealand. Clinical exercise stress testing. Safety and performance guidelines. Med J Aust 1996; 164: 282-4.

No prelo (forthcoming)

Leshner AI. Molecular mechanisms of cocaine addiction. N Engl J Med. No prelo 1996.

Livros e outras monografias

Indivíduo como autor

Ringsven MK, Bond D. Gerontology and leadership skills for nurses. 2nd ed. Albany (NY): Delmar Publishers; 1996.

Editor(es), compilador(es) como autor(es)

Norman IJ, Redfern SJ, editors. Mental health care for elderly people. New York: Churchill Livingstone; 1996.

Instituição como autor e editor

Institute of Medicine (US). Looking at the future of the Medicaid program. Washington (DC): The Institute; 1992.

Capítulo num livro

Franco DBGM, Landgraf M. Microorganismos patogênicos de importância em alimentos. In: Franco DBGM, Landgraf, M, editores. Microbiologia dos Alimentos 2nd ed. São Paulo: Ed Atheneu; 1996. p. 55-60.

Resumo/Trabalho de congresso publicado

DuPont B. Bone marrow transplantation in severe combined immunodeficiency with an unrelated MLC compatible donor. In: White HJ, Smith R, editors. Proceedings of the 3rd Annual Meeting of the International Society for Experimental Hematology. Houston: International Society for Experimental Hematology, 1974: 44-6.

Dissertação/Tese

Cairns RB. Infrared spectroscopic studies of solid oxygen [Tese de doutorado]. Berkeley, California: University of California, 1965. 156pp.

Material legal

Quanto à legislação, a forma proposta por Vancouver não se aplica à realidade brasileira, para tanto recomenda-se adotar as normas a seguir:

Os elementos essenciais são: competência (país, estado ou cidade ou nome da entidade ou órgão no caso de se tratar de normas), título (especificação da legislação, número e data), ementa e título da publicação oficial, local da publicação oficial

(cidade), data (dia, mês abreviado e ano), seção e paginação. Exemplos:

Brasil. Portaria nº 695 de 1998 da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 30 mar. 1998. Seção 1, nº 60-E, p. 5-6.

Brasil. Resolução nº 16, de 13 de dez. 1984 do Conselho Federal de Educação. Dispõe sobre reajustamento de taxas, e altera a redação do artigo 5 da Resolução n.1 de 14/1/83. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 13 dez. 1984. Seção 1, p. 190-1.

Associação Brasileira de Normas Técnicas [ABNT]. NBR 7024, de 1989: veículos rodoviários automotores leves: medição do consumo de combustível. Rio de Janeiro; 1990. p.29.

Conselho Nacional do Meio Ambiente [CONAMA]. Resolução n.315, de 29 out 2002: dispõe sobre as novas etapas do Programa de controle da poluição do ar

por veículos automotores (Proconve). Brasília (DF); Diário Oficial da União; 15 mar 2002.

Material Eletrônico

Artigo de revista em formato eletrônico:

Morse SS. Factors in the emergence of infectious diseases. Emerg Infect Dis [serial online] 1995 Jan-Mar [cited 1996 Jun 5]; 1(1):[24 screens]. Available from: <http://www.cdc.gov/ncidod/EID/eid.htm>.

Monografia em formato eletrônico:

CDI, Clinical Dermatology Illustrated [monograph on CD-ROM], Reeves JRT, Maibach H. CME Multimedia Group, producers. 2nd ed. Version 2.0. San Diego: CME; 1995.

Arquivo de computador:

Hemodynamics III: the ups and downs of hemodynamics [computer program]. Version 2.2. Orlando (FL): Computerized Educacional Systems; 1993.

Patente

Larsen CE, Trip R, Johnson CR, inventors; Novoste Corporation, assignee. Methods for procedures related to the electrophysiology of the heart. US patent 5,529,067. 1995 Jun 25.

Abreviaturas: devem ser evitadas ou usadas apenas as oficiais.

Unidades de medida e seus símbolos: utilizar as legais do Sistema Internacional de Metrologia.

Tabelas: as tabelas devem ser encaminhadas em folhas separadas e designadas no texto como “Tabelas”. A sua localização aproximada deve ser indicada no texto. Serão numeradas consecutivamente, com números arábicos e encabeçadas pelos respectivos títulos, que devem ser breves e indicar claramente o conteúdo. Os dados apresentados em tabela não devem ser repetidos em gráficos.

Ilustrações (fotografias, gráficos etc.): as ilustrações devem ser encaminhadas em arquivos formato (jpg-CMYK e ou tif) (mínimo de 300 dpi) folhas separadas e designadas no texto como “Figuras”: terão numeração única e seqüencial, em algarismos arábicos e devem apresentar na sua parte inferior e fora da área de reprodução, informações breves e claras que esclareçam o conteúdo da mesma. As suas localizações aproximadas devem ser indicadas no texto. Todas as ilustrações devem ser tão claras que permitam sua reprodução com redução de 6,5 cm no sentido da largura, sem perda de nitidez ou legibilidade. Os custos das ilustrações coloridas ficarão a cargo dos autores e estarão sujeitas à confirmação. Mencionar a fonte e a permissão para reprodução das ilustrações.

Da Publicação

1. Os trabalhos destinados à publicação na RIAL deverão ser encaminhados à Biblioteca do Instituto Adolfo Lutz, Setor de Publicações, Av. Dr. Arnaldo, 355, Cerqueira César, São Paulo/SP, 01246-902, ou rial@saude.sp.gov.br a/c: Rocely Bueno.

2. Todo trabalho entregue para publicação deverá ser assinado pelo autor e trazer endereço para correspondência ou endereço eletrônico. No caso de mais de um autor, deverá ser expressamente indicado o responsável pela publicação. Deverão ser enviados os nomes de todos os autores e afiliação completa.

3. Os trabalhos serão publicados em ordem cronológica de aprovação, salvo o caso especial de comunicação breve, nota científica e relato de caso que terão prioridade.

4. A data de recebimento e a de aprovação do artigo constarão obrigatoriamente no mesmo.

5. As provas gráficas dos trabalhos serão enviadas aos autores para correção pelo correio eletrônico em formato.pdf (portable document format). O Corpo Editorial se reserva o direito de introduzir alterações nos originais, visando à manutenção da homogeneidade e a qualidade da publicação, respeitando, porém, o estilo e as opiniões dos autores.

6. É permitida a reprodução, no todo ou em parte, de artigos publicados na RIAL, desde que sejam indicados a origem e o nome do autor, em conformidade com a legislação sobre direitos autorais.

Da Distribuição

A RIAL é distribuída gratuitamente a entidades governamentais, culturais, ou em permuta de periódicos nacionais ou estrangeiros.

INSTRUCTION FOR AUTHORS

available at <http://revista.ial.sp.gov.br>

SUMÁRIO/CONTENTS

Artigos Originais/ Original Articles

- 1170 **Avaliação da concentração de retinol em requeijões cremosos comercializados em Natal, RN/Brasil**
Retinol concentrations in the cream cheeses sold in Natal, RN/Brazil
Samara Dantas BATISTA, Gabrielle Mahara Martins AZEVEDO, Katherine Feitosa de ARAÚJO, Lígia Rejane Siqueira GARCIA, Karla Danielly da Silva RIBEIRO, Carlos José de LIMA, Roberto DIMENSTEIN 163-166
- 1171 **Avaliação físico-química, colorimétrica e aceitação sensorial de emulsão estabilizada com polpa de banana verde**
Physical-chemical, colorimetric and sensorial characteristics of the emulsion formulation stabilized with green (unripe) banana pulp
Dayane Rosalyn IZIDORO, Agnes de Paula SCHEER, Maria Fátima de Oliveira NEGRE, Charles Windson Isidoro HAMINIUK, Maria-Rita SIERAKOWSKI 167-176
- 1172 **Influência de *Saccharomycopsis schoenii* e *Saccharomycopsis crataegensis* na produção de aflatoxinas B₁ e G₁ por *Aspergillus parasiticus* em amendoim (*Arachis hypogaea* L.)**
Saccharomycopsis schoenii and *Saccharomycopsis crataegensis* effect on B₁ and G₁ aflatoxins production by *Aspergillus parasiticus* in peanut (*Arachis hypogaea* L.)
Guilherme PRADO, Robson de Assis SOUZA, Vanessa Andrea Drummond MORAIS, Jovita Eugênia Gazzinelli Cruz MADEIRA, Marize Silva de OLIVEIRA, Mabel Caldeira de ANDRADE, Ignácio José de GODOY, Carlos Augusto ROSA, Ary CORRÊA Jr, Joenes Mucci PELUZIO, Raphael Sanzio PIMENTA 177-182
- 1173 **Avaliação das condições sanitárias e ambientais da sub-bacia do córrego Barbosa no município de Marília, SP/Brasil**
Assessment of sanitary and environment conditions of the Barbosa stream basin in Marília municipality, SP/Brazil
Armando CASTELLO BRANCO JR., Carina ANDRADE, Felipe Navarro IZIQUE, Roberta LAUER, Willian Tavares MOREIRA 183-189
- 1174 **Análise dos constituintes de gema de ovo de avestruz desidratada por meio de duas metodologias de secagem**
Ostrich egg yolk constituents analyses after drying procedures by means of two dehydration methodologies
Jailane de Souza AQUINO, João Andrade da SILVA, João Paulo PRADO, José Marcelino de Oliveira CAVALHEIRO 190-195

- 1175 **Ação mutagênica do inseticida organofosforado temefós em células de medula óssea de camundongos**
Mutagenic effects of the organophosphate insecticide temephos on mice bone marrow cells
Maria Eliane Bezerra de MÉLO, Kleison da Costa MERLO, Raul Rodrigo de Carvalho FERNANDES, Carlos Feitosa LUNA, George Tadeu Nunes DINIZ, Maria Teresa Janssem de Almeida CATANHO, Leda REGIS 196-201
- 1176 **Deteção de *Bacillus cereus* em leite e avaliação da germinação dos esporos após tratamento térmico**
Detection of *Bacillus cereus* in milk samples and assessment of the spores germination after milk thermal treatment
Milena Martinelli WATANUKI, Cláudio Rosa GALLO 202-207
- 1177 **Aspectos sanitários da comercialização de pescado em feiras livres da cidade de São Paulo, SP/Brasil**
Sanitary aspects of fish commercialization in street markets of the city of São Paulo, SP/Brazil
Miriam Lopes da SILVA, Glavur Rogério MATTÉ, Maria Helena MATTÉ 208-214
- 1178 **Avaliação do perfil bacteriológico de salsichas tipo “hot dog” comercializadas em embalagens a vácuo e a granel em supermercados dos municípios Rio de Janeiro e Niterói, RJ/Brasil**
Bacteriological study in bovine and chicken hot dog type - sausages sold in vacuumed packing-case and in bulk retail commercialized in Rio de Janeiro city and Niteroi, RJ/Brazil supermarkets
Lucimar Lima MARTINS, Iacir Francisco dos SANTOS, Robson Maia FRANCO, Luiz Antônio Trindade de OLIVEIRA, Juliana BEZZ 215-220
- 1179 **Avaliação microbiológica, parasitológica e da rotulagem de hortaliças minimamente processadas comercializadas no município de Ribeirão Preto, SP/Brasil**
Microbiological and parasitic quality and labeling adequacy of minimally- processed vegetables, commercialized in Ribeirão Preto, SP/Brazil
Sonia de Paula Toledo PRADO, Eliana Guimarães Abeid RIBEIRO, Divani Maria CAPUANO, André Luiz de AQUINO, Gutemberg de Melo ROCHA, Alzira Maria Morato BERGAMINI 221-227
- 1180 **Pesquisa de anticorpos para *Leishmania spp* em amostras de sangue de cães da região de Marília/SP, Brasil no período de janeiro de 1999 - junho de 2005**
Anti-*Leishmania spp* antibodies survey in blood samples from dogs from region of Marília / SP, Brazil in the period from January 1999 to June 2005
Maria Laura Sales Rodrigues LIMA, Salete França PÔRTO, Alice Maria dos Santos Ferreira GELSI, Argeu Selos MOREIRA, Ilda Aparecida Capannaci ALVES, Neuza Maria de SOUZA, Layde do Vale ESTECI, Marina Madalena LICATE, Fabrício JACOB, Maria Izabel LICATE, Edilene Patrícia Dias de MENEZES 228-233

Relato de Caso/Case Report

- 1181 **Intoxicação por colchicina em formulação manipulada**
Intoxication by Colchicine in a compounded pharmaceutical formulation
Helena Miyoco YANO, Adriana BUGNO, Mariangela Tirico AURICCHIO 234-236

Nota Científica/ Scientific Note

- 1182 **Surto de toxinfecção alimentar em funcionários de uma empreiteira da construção civil no município de Cubatão, São Paulo, Brasil**
Outbreak of foodborne diseases in employees of an engineering and construction company in Cubatão, São Paulo, Brazil
Estevão de Camargo PASSOS, Camila de Souza ALMEIDA, João Paulo ROSA, Luciana Martins ROZMAN, Ana Ruth Pereira de MELLO, Cícero Vagner de SOUZA, Regina Célia PASCHOAL, Mário TAVARES 237-240
- COLABORADORES 241- 244

Avaliação da concentração de retinol em requeijões cremosos comercializados em Natal, RN/Brasil

Retinol concentrations in the cream cheeses sold in Natal, RN/Brazil

RIALA6/1170

Samara Dantas BATISTA¹, Gabrielle Mahara Martins AZEVEDO¹, Katherine Feitosa de ARAÚJO¹, Lígia Rejane Siqueira GARCIA², Karla Danielly da Silva RIBEIRO², Carlos José de LIMA², Roberto DIMENSTEIN^{2*}

*Endereço para correspondência: Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Av. Senador Salgado Filho 3000 CEP 59072-970 Natal, RN/Brasil, telefone: 55 (0**84) 3215-3416 ramal 205, fax 55 (0**84) 32119208; e-mail: robertod@ufrnet.br

¹Nutrição da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN/Brasil.

²Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN/Brasil.

Recebido: 19/08/2008 – Aceito para publicação: 24/09/2008

RESUMO

Os lipídeos são componentes de diferentes alimentos da dieta humana. Sua concentração afeta os teores de vitaminas lipossolúveis, como a vitamina A, que apresenta ação relevante nos processos biológicos como reprodução, ciclo visual e diferenciação celular. O requeijão, que constitui um queijo fundido derivado do leite, é considerado fonte desse micronutriente. As concentrações de retinol foram avaliadas em duas marcas de requeijão (A e B) nas versões integral e desnatada, comercializadas na cidade de Natal/ RN. Três unidades de cada versão das duas marcas foram adquiridas em supermercado da cidade. Após a extração, a concentração de retinol foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência. As médias das concentrações de retinol em cada marca foram $40,5 \pm 0,7$ e $14,3 \pm 4,5 \mu\text{g}/100\text{g}$ respectivamente para requeijão integral e desnatado da marca A ($p < 0,05$), e de $75,7 \pm 3,51$ e $26,3 \pm 2,52 \mu\text{g}/100\text{g}$ respectivamente para integral e desnatado da marca B ($p < 0,05$). Os resultados demonstraram que a versão integral possui concentração de retinol superior à versão desnatada; entretanto, os níveis de retinol encontrados estão abaixo dos valores relatados por outros autores. Essa variação possivelmente ocorre em virtude da ausência de padronização na fabricação do requeijão.

Palavras-chave. retinol, requeijão, CLAE.

ABSTRACT

Lipids are food components of the human nourishment, and the concentration of these constituents affect on liposoluble vitamins levels, such as vitamin A which takes part in biological processes of reproduction, in visual cycle and in cellular differentiation. As the cream cheese, made from molten milk, is considered the source of this micronutrient, the retinol concentrations in cream cheese samples marketed in the city of Natal, RN were investigated. Three units of each cream cheese kinds, that is, the whole type and skimmed type from two brands (A and B) were purchased from a supermarket of that city. After processing the retinol extraction, its concentration was determined by means of high performance liquid chromatography. The average of retinol concentrations in cream cheese samples from two brands were 40.5 ± 0.7 and $14.3 \pm 4.5 \mu\text{g}/100\text{g}$ in whole and skimmed samples from brand A ($p < 0.05$), respectively, and 75.7 ± 3.51 and $26.3 \pm 2.52 \mu\text{g}/100\text{g}$ in whole and skimmed types from brand B ($p < 0.05$), respectively. The whole cream cheese showed higher concentration of retinol than the skimmed type, although the found retinol levels were lower than those values elsewhere reported. The retinol contents dissimilarity might occurs as no standard operational protocol for cream cheese production has been available yet.

Key word. retinol, cream cheese, HPLC.

INTRODUÇÃO

O requeijão é um derivado do leite fabricado no Brasil com algumas variações de tecnologia e características¹. Este produto surgiu da necessidade de conservação do leite recém ordenhado, proporcionando maior durabilidade, ao passo que aproveita o soro do leite que era tratado como resíduo². Ele pertence à classe de queijos processados ou fundidos e é fabricado a partir de leite pasteurizado ou não, com ou sem adição de cultura láctica^{3,4}.

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), requeijão se define como o produto obtido pela fusão da massa coalhada, cozida ou não, dessorada e lavada, obtida por coagulação ácida e/ou enzimática do leite. Existe uma variedade de requeijões que são classificados conforme matérias-primas empregadas em seu processo de elaboração. Dessa forma, o requeijão pode ser classificado como cremoso, obtido da mesma base de ingredientes com adição de creme de leite e/ou manteiga e/ou gordura anidra de leite ou butter oil. Ou como Requeijão de Manteiga (conhecido como Requeijão do Norte), o qual é obtido pela fusão prolongada com agitação de uma mistura de manteiga e massa de coalhada de leite integral, semi-desnatado ou desnatado. Além destes, outros ingredientes podem ser adicionados como condimentos, especiarias e/ou outras substâncias alimentícias⁵.

A composição média do requeijão típico consiste de 60% de água, 25% de gordura, 10% de proteína, 2% de carboidratos e 1% de NaCl⁶.

Há no mercado dois tipos de requeijão classificados como cremosos: desnatado e integral. O requeijão desnatado (*light*) deve atender à classificação estabelecida pelo Regulamento Técnico referente à Informação Nutricional complementar⁷, que determina uma redução mínima de 25% em gorduras totais e diferença maior que três gramas de gordura por 100g de sólidos em relação ao produto integral.

O teor de gordura vai afetar não só no sabor e na firmeza, como também na determinação do valor calórico do produto final e teores de vitaminas lipossolúveis como, por exemplo, a vitamina A, que está associada aos glóbulos de gordura do leite^{3,8,9}.

Dimenstein¹⁰, com base em diversos autores, ressaltou que a vitamina A está envolvida em vários processos de importância biológica, como a reprodução, o ciclo visual e a diferenciação celular, que por sua vez afetam processos fisiológicos como o crescimento, o desenvolvimento fetal e a integridade do sistema imunológico. Esta vitamina lipossolúvel é encontrada na natureza na forma livre ou esterificada. Nos produtos de origem animal é encontrada no fígado, gema de ovo e laticínios – como queijos, bebidas lácteas e requeijões. E nos vegetais, sob a forma de carotenóides (frutas e vegetais de coloração verde-escura, amarela ou laranja)^{11,12}.

A deficiência de vitamina A ocasiona a cegueira noturna, descamação e aspereza da pele, ressecamento das membranas mucosas, inibição no crescimento, diminuição da resistência a infecções, defeito no desenvolvimento e

modulação dos ossos¹¹.

Para que isso seja evitado, deve-se manter uma adequada ingestão diária de alimentos que contenham esse micronutriente. A *DRI* (Ingestão Dietética Recomendada) recomenda um consumo diário de 900µg e 700µg para homens e mulheres, respectivamente¹³.

Em razão da importância desse micronutriente na dieta e de sua relevante concentração em produtos de origem animal, o presente trabalho objetivou avaliar a concentração de retinol em duas marcas de requeijão comercializadas na cidade de Natal/RN, comparando os níveis encontrados em ambas as marcas e entre as suas versões integral e desnatada.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção e preparação das amostras de requeijão

Para obtenção das amostras, foi realizado um levantamento em supermercados da cidade de Natal/RN das marcas de requeijão mais consumidas pela população. Entre seis marcas disponíveis, três se destacaram pelo volume de vendas. Porém, uma foi excluída do estudo por se tratar de especialidade láctea a base de requeijão, pois continha gordura hidrogenada na sua composição e de acordo com a legislação brasileira a denominação requeijão está reservada ao produto no qual a base láctea não contenha gordura e/ou proteína de origem não láctea. Sendo assim, foram incluídas na pesquisa duas marcas de requeijão que serão aqui apresentadas como marca A e marca B. Esses requeijões são provenientes dos estados de São Paulo e Minas Gerais, respectivamente.

As unidades do produto foram obtidas do mesmo lote, dentro do prazo de validade, sendo 3 frascos de requeijão para as versões integral e desnatada de cada marca, totalizando 12 frascos. De cada frasco foi retirada uma alíquota de 10g para análise da concentração de retinol.

Análises das amostras

A extração foi realizada segundo Giuliano et al. modificado¹⁴. Em alíquotas de 10 g de requeijão preparou-se homogenado com 10 mL de solução salina 0,9%, 10mL de Etanol 95% e 20 mL de Hidróxido de Potássio a 50%. As soluções foram homogeneizadas utilizando-se um processador (*mixer*) e transferidas para provetas de 250mL.

A etapa de saponificação aconteceu em banho-maria a 45°C por 2 horas. Após essa etapa, foram adicionados em cada recipiente 50mL de hexano para recuperação do retinol nas amostras. Em seguida foram agitadas por 2 minutos e reservadas para obtenção do precipitado e sobrenadante. O sobrenadante ou extrato hexânico foi retirado e novamente foram adicionados 50mL de hexano, repetindo-se o mesmo processo extrativo.

O extrato de cada amostra foi separado em provetas, tendo como volumes finais superiores a 93mL para os tipos integral e desnatado da marca A e B.

Do conteúdo total de extrato hexânico foram retiradas

alíquotas de 4mL para a evaporação sob atmosfera de nitrogênio, em banho-maria a 37°C. Após a evaporação, as amostras foram ressuspensas em 1mL de etanol absoluto para então, ser analisada a concentração de etanol.

As amostras foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em cromatógrafo LC-10 AD Shimadzu, acoplado a um Detector SPD-10 A Shimadzu UV-VIS e Integrador Chromatopac C-R6A Shimadzu com uma coluna LC Shim-pack CLC-ODS (M) 4,6mm x 25cm.

O cromatograma evoluiu nas seguintes condições: fase móvel metanol 100% e fluxo 1,0mL/min. A identificação e quantificação do retinol nas amostras foram estabelecidas por comparação com o tempo de retenção e a área do respectivo padrão (Figura 1). A concentração do padrão foi confirmada pelo coeficiente de extinção específico (ϵ 1%, 1cm = 1850) em etanol e comprimento de onda de 325nm¹⁵.

A exatidão do método foi avaliada através do teste de recuperação da extração, obtendo-se 100% de recuperação do retinol acetato (padrão interno) adicionado às amostras, as quais sofreram o mesmo processo de extração que as demais amostras elaboradas, exceto a etapa de saponificação, para evitar a hidrólise alcalina do padrão interno. A linearidade do método foi confirmada pela curva de calibração, feita com soluções padrões obtidas a partir do padrão all-trans-retinol (Sigma) em concentrações entre 4 a 64ng/20µL (Figura 2).

Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média \pm desvio-padrão e as diferenças entre as médias foram consideradas significativas quando $p < 0,05$, através da análise por teste T de Student.

RESULTADOS

Os valores de retinol no requeijão da marca A foram $40,5 \pm 0,7$ e $14,3 \pm 4,5$ µg/100g para integral e desnatado, respectivamente (Figura 3). A análise da marca B apresentou resultados superiores aos encontrados na marca A ($p < 0,05$), consistindo em $75,7 \pm 3,5$ µg/100g para o integral e $26,3 \pm 2,5$ µg/100g para desnatado.

As análises demonstraram que houve diferença significativa entre as versões de requeijão integral e desnatado em ambas as marcas, sendo superiores os níveis de retinol presentes no tipo integral ($p < 0,05$). Isso ocorre pela maior presença de lipídeos no primeiro tipo de requeijão e conseqüentemente, uma maior quantidade de vitamina A por sua característica lipossolúvel, concentrando-se nos glóbulos de gordura no leite^{11,12}. Tendo em vista que o requeijão do tipo desnatado deve ter um decréscimo mínimo de 25% de gorduras totais em relação ao produto integral⁷, a diminuição da quantidade de vitamina A é considerada normal pela menor quantidade de gordura ($14,3$ µg/100g e $26,3$ µg/100g, marcas A e B respectivamente).

Como foi observado, o requeijão da marca A apresentou

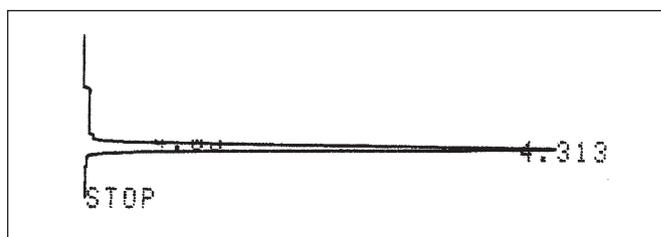


Figura 1. Cromatograma do padrão de all-trans-retinol, 24mg/20µL e tempo de retenção 4,3 minutos

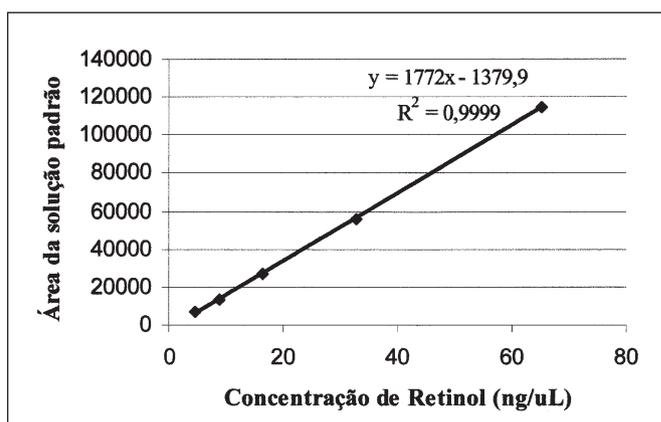


Figura 2. Determinação gráfica da linearidade do método

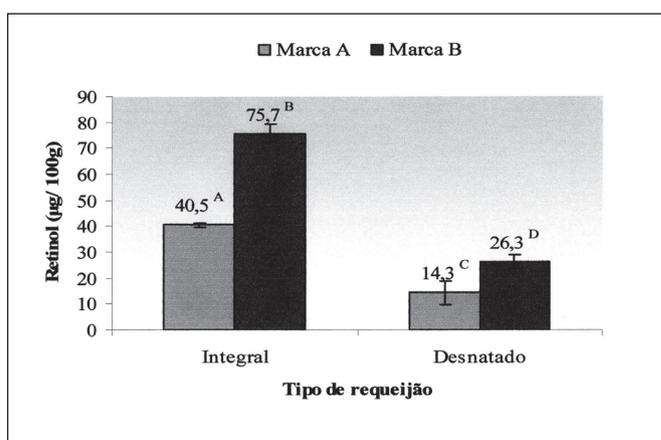


Figura 3. Níveis de retinol das marcas A e B nas versões integral e desnatada.

^{AB} Diferença significativa ($p < 0,001$)

^{CD} Diferença significativa ($p < 0,05$)

^{AC} Diferença significativa ($p < 0,05$)

^{BD} Diferença significativa ($p < 0,0001$)

concentração inferior de retinol quando comparado à marca B nas duas versões trabalhadas. Essa diferença pode ocorrer provavelmente por perdas durante o processamento e acondicionamento, o que ocasionaria oxidação da vitamina A. Outra hipótese seria a diferença na concentração de retinol do leite utilizado para fabricação do requeijão. Silva⁹ referiu que diferenças no tratamento bovino, principalmente no tocante à alimentação, e conseqüentemente, a procedência do leite que será usado na fabricação, podem ser determinantes nos níveis de retinol encontrados em requeijões. Os locais de fabricação de requeijão das marcas analisadas são distintos, São Paulo e Minas Gerais, o que pode influenciar na concentração final de retinol no produto.

Em geral, os níveis de retinol das duas marcas estão abaixo dos apresentados na Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO)¹⁶ e na Tabela do United States Department of Agriculture (USDA)¹⁷, onde os valores são de 195µg/100g e 366 µg/100g de requeijão, respectivamente, para produtos integrais. Essa diferença pode ser explicada provavelmente pela variação de retinol do próprio leite, visto que trabalhos realizados com o leite bovino relatam valores de retinol de 22,7µg/100g a 507µg/100g (1691,6UI/ 100g), demonstrando grande variação na composição em retinol desses produtos^{18,19}.

Apesar da variação encontrada, o requeijão pode fornecer uma contribuição importante para atingir a recomendação nutricional de vitamina A, já que se trata de um alimento de fácil acesso para a população em geral. Sugerimos mais estudos que investiguem as perdas deste nutriente durante o processo de fabricação e acondicionamento.

CONCLUSÃO

Uma diferença considerável nas concentrações de retinol foi verificada entre as marcas e versões de requeijão trabalhadas, tendo a versão integral concentração superior à versão desnatada, e destes com os achados da literatura.

REFERÊNCIAS

1. Munck AV, Campos WA. Requeijão: um produto brasileiro. *Inf Agropec*.1984; 10:35-8.
2. Rodrigues, F. Requeijão Crioulo. Queijos no Brasil. Disponível em: <<http://www.queijosnobrasil.com.br/queijo/tipos/requeijao.htm>>. Acesso em 2 jul. 2008.
3. Baroni AF, Freitas IC, Cunha RL, Hubinger MD, Menegalli FC. Caracterização reológica de requeijão cremoso tradicional e com teor reduzido de gordura: viscosidade extensional e em cisalhamento. *Braz J Food Technol*. 1999; 2: 21-9.
4. Soares FM, Fonseca LM, Martins RT, Machado EC, Pereira Jr FN, Fonseca CSP. Influência do concentrado protéico de soro na composição do requeijão em barra com teor reduzido de gordura. *Arq Bras Med Vet Zootec*.2002; 54(6): 643-7.
5. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Regulamento Técnico MERCOSUL de Identidade e Qualidade do Requeijão. Disponível em: <http://anvisa.gov.br/legis/resol/mercosul/alimentos/82_96.htm>. Acesso em 2 jul. 2008.
6. FOODBASE. Base de dados em CD-ROM da Legislação Brasileira. Associação Brasileira das Indústrias de Alimentos, 1996.
7. Brasil. Portaria n.27 SVS/MS, de 13 de janeiro de 1998. Regulamento Técnico referente à Informação Nutricional complementar. *Diário Oficial da União*. 1998 16 jan; (11-E):1; Seção 1.
8. Castro AF, Prestes MM, Ribeiro L, Imianovsky U, Reiter MGR. Qualidade sensorial e microbiológica do requeijão tradicional e *light*. *Rev Inst Lat Cândido Tostes*.2002; 57(327):160-2.
9. Silva PHF. Leite: Aspectos de Composição e Propriedades. *QNEsc*. 1997; 6:3-5.
10. Dimenstein R. Estudo da transferência materno fetal de vitamina A e carotenóides sob condições adequadas e sub-adequadas do estado nutricional materno em vitamina A [Tese de doutorado]. Rio de Janeiro (RJ): Universidade Federal do Rio de Janeiro; 1999.
11. Combs GF. Vitaminas. In: Mahan LK, Escott-Stump S. Krause: Alimentos, nutrição e dietoterapia, 10ª ed., São Paulo: Ed. Roca; 2002. p. 67-71.
12. Almeida-Muradian LB, Penteadó MVD. Vitamina A. In: Penteadó MVD. Vitaminas: aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos. São Paulo: Manole; 2003. p. 55-72.
13. IOM (Institute of Medicine). Vitamin A. In: Food and Nutrition Board. IOM (Institute of Medicine). Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, cooper, iodine, iron, manganase, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. 1st ed. Washington, DC: National Academy Press. 2001: 82-161.
14. Giuliano AR, Neilson EM, Kelly BE, Canfield LM. Simultaneous quantitation and separation of carotenoids and retinol in human milk by high-performance liquid chromatography. *Methods Enzymol*. 1992; 213:391-9.
15. Nierenberg DW, Nann SL. A method for determining concentrations of retinol, tocopherol, and five carotenoids in human plasma and tissue samples. *Am J Clin Nutr*. 1992; 56:417-26.
16. TACO. Tabela Brasileira de Composição de Alimentos/NEPA-UNICAMP- Versão II. 2.ed. - Campinas: NEPA-UNICAMP, 2006. 113p
17. U.S. Department of Agriculture. Agricultural Research Service. 2007. USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 20. Nutrient Data Laboratory Home Page, <http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl>. Acesso em 13 abr. 2008.
18. Soares FB, Sousa JM, Dimenstein R. Avaliação da concentração de retinol em leite UHT (“Ultra High Temperature”) comercializado em Natal, Rio Grande do Norte. *Quim Nova*.2008; 31(2):268-9.
19. Bianchini R, Penteadó MD. Teores de retinol, b-caroteno e a-tocoferol em leites bovinos comercializados na cidade de São Paulo. *Ciênc Tecnol Aliment*.1999;19(3): 349-55.

Avaliação físico-química, colorimétrica e aceitação sensorial de emulsão estabilizada com polpa de banana verde

Physical-chemical, colorimetric and sensorial characteristics of the emulsion formulation stabilized with green (unripe) banana pulp

RIALA6/1171

Dayane Rosalyn IZIDORO^{1*}, Agnes de Paula SCHEER¹, Maria Fátima de Oliveira NEGRE¹, Charles Windson Isidoro HAMINIUK², Maria-Rita SIERAKOWSKI³

*Endereço para correspondência: ¹Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos – Universidade Federal do Paraná (UFPR), Caixa Postal 19011, Curitiba, Paraná/Brasil, fone/fax(041) 33613232; dayizidoro@ufpr.br;

²Coordenação de Alimentos, UTFPR, Caixa Postal, Caixa Postal 271, Campo Mourão, Paraná/Brasil; ³Laboratório de Biopolímeros, UFPR, Caixa Postal 19081, Curitiba, Paraná/Brasil.

Recebido: 04/04/2007 – Aceito para publicação: 24/09/2008

RESUMO

Com o propósito de introduzir melhor aproveitamento da banana verde, em escala industrial, e também pelo seu alto teor de amido, foram preparadas formulações de emulsões tipo maionese estabilizadas com polpa de banana verde (PBV). A análise das emulsões foi realizada por meio de Metodologia de Superfície de Resposta. As formulações apresentaram alto teor de carboidratos, baixos teores de lipídios e baixos valores energéticos, além de elevados teores de sais minerais como potássio, ferro, magnésio, cálcio, fósforo e sódio. Esses constituintes conferem enriquecimento nutricional e, ainda, valorizam o produto. As amostras com menores teores de polpa (PBV) apresentaram maiores valores de luminosidade (L^*) e com menores tendências a demonstrar cromas vermelho e amarelo (a^* e b^*). Ademais, as amostras com maior teor de PBV apresentaram coloração similar àquela observada na maionese comercial. Em relação à aceitação das emulsões pelos consumidores, as médias de avaliação foram superiores a 6,95, em escala hedônica de nove pontos, o que significa alta aceitabilidade global. Outrossim, as formulações com maior teor de polpa de banana verde foram as preferidas entre os membros avaliadores. A aceitação das emulsões foi confirmada também pela atitude de compra, em que 75% dos consumidores opinaram que comprariam o produto.

Palavras-chaves. banana verde, emulsão, análise físico-química, cor, aceitação.

ABSTRACT

Aiming the best use of green (unripe) banana, on an industrial scale, and also because of its high starch contents, the “mayonnaise” type-formulations emulsions stabilized with green (unripe) banana pulp (GBP) were prepared and they were assessed by Response Surface Methodology. High carbohydrates contents, low lipids amounts and low caloric values, were found in the formulations, in addition to the high mineral salts contents as potassium, iron, magnesium, calcium, phosphorous and sodium. These findings turn these emulsions to be nutritionally enriched, and increase still more the product value. Samples presenting lower GBP contents displayed highest luminosity (L^*) and they showed lower tendency to red and yellow (a^* and b^*) chromes values. On the other hand, samples with high GBP contents presented the light color similar to that revealed by the commercial mayonnaise. In relation to the emulsions acceptance from the consumers, the evaluation averages were superior to 6.95 in scale from 1 to 9, which means a good acceptance, and the formulations with high GBP contents were also those preferred products among the estimators. The emulsions acceptance was confirmed from the purchase intent, which showed that 75% of the consumers would buy the product.

Key words. green (unripe) banana, emulsion, physical-chemical analysis, color, acceptance.

INTRODUÇÃO

A banana é considerada a principal fonte de alimentação e renda anual em muitos países¹. O Brasil, um dos maiores produtores mundiais de banana, é também o que apresenta maior desperdício, sendo que em certas regiões chega-se a perder até 60% da produção, pois a fruta apresenta vida útil muito curta e precisa ser consumida rapidamente. Visando à diminuição dessas perdas, a banana ainda verde vem sendo considerada como um produto ideal para ser industrializado². A banana quando cozida verde, perde tanino, responsável pela adstringência³ e a polpa permite a produção de vários alimentos, como pão, nhoque (entre outras massas), patês e maionese o que ressalta a importância dessa matéria-prima, por apresentar diversidade de aplicações⁴.

Sua utilização em alimentos é de extensão considerável, pois não altera o sabor, aumenta a quantidade de fibras, proteínas e nutrientes, além de aumentar significativamente o rendimento dos produtos³. O desenvolvimento de uma emulsão (tipo maionese) adicionada de polpa de banana verde é uma maneira de agregar valor nutritivo a um produto que pode ser consumido em larga escala. Segundo McClements⁵ maionese é uma emulsão óleo em água que contém gema de ovos, vinagre, agentes estabilizantes e flavorizantes. Amidos modificados, goma xantana, pectina e carboximetilcelulose são geralmente utilizados para estabilizar a emulsão e aumentar a viscosidade da maionese com menor teor de gordura^{6,7}.

A polpa de banana verde contém de 70 a 80% de amido, em base seca, que é comparável ao endosperma do grão de milho¹, podendo ser utilizada em maioneses como modificador de textura e volume além de substituir os ovos e parcialmente a concentração de óleo já que a polpa pode agir como estabilizante.

A aceitação de alimentos acrescidos de banana verde tem sido alvo de vários estudos sensoriais, por se tratar de fonte alternativa de nutrientes saudáveis ao consumidor^{2,3,8,9}. A cor é um atributo de qualidade inerente de cada alimento e muito importante para a maioria dos consumidores. A associação da cor com a aceitabilidade de um produto é universal¹⁰.

Neste estudo a polpa de banana verde foi utilizada no preparo de emulsões tipo maionese e as características físico-químicas, colorimétricas e aceitação sensorial dessas formulações foram avaliadas.

MATERIAL E MÉTODOS

Matéria-prima

A matéria-prima utilizada foi a banana verde da variedade *Caturra* (Nanica) por apresentar preço mais acessível no mercado. Foi adquirida junto ao CEASA, na região de Curitiba, antes de entrar para a câmara de maturação.

A caracterização físico-química da matéria prima e da polpa de banana verde foi realizada no Laboratório de Química Analítica Aplicada (LQAA) e das emulsões foi realizada no

Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos (CEPPA) do Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná.

Padronização da maturação da matéria-prima (banana verde)

Um critério utilizado na escolha da matéria-prima foi a coloração da casca, trabalhou-se com bananas de coloração totalmente verde e determinou-se os valores de umidade, sólidos solúveis, pH e acidez total e também a relação sólidos solúveis/acidez total, com o objetivo de padronizar as características da matéria-prima coletada para o presente trabalho.

A determinação da umidade das amostras foi feita por gravimetria utilizando estufa convencional a 105°C até peso constante¹¹. Os sólidos solúveis totais (°Brix) foram determinados por leitura direta da amostra em refratômetro de bancada Polskie Zakłady Optyczne S.A., modelo RL3, escala 0°Brix a 90°Brix, e os resultados foram expressos em °Brix¹¹.

Determinou-se a acidez total por titulação com NaOH 0,1N padronizado, e o resultado foi expresso em porcentagem de ácido málico¹¹. O pH foi determinado pelo processo potenciométrico em pHmetro (Tecnal, modelo TEC-2)¹¹. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Obtenção da polpa de banana verde

As bananas foram lavadas com água e detergente neutro e cozidas sob pressão pelo tempo de 10 minutos. Em seguida, foram descascadas e homogeneizadas em processador de alimentos (Walita Basic RI2008) com velocidade de rotação constante, por 5 minutos, conforme Borges². No processamento da polpa utilizou-se a proporção 1:1 de banana cozida e água para melhor homogeneização. Parte da polpa foi separada para análise físico-química e colorimétrica e a outra parte foi utilizada no preparo das emulsões.

Preparo das emulsões

Para obtenção das emulsões adaptou-se a formulação de Valle e Camargos³, utilizando os seguintes ingredientes: água, óleo de soja, polpa de banana verde (PBV), mostarda em pó, vinagre e sal. A polpa de banana verde, água e óleo de soja tiveram as proporções variadas e estão descritas na Tabela 1. As proporções de vinagre, sal e mostarda em pó foram iguais para todas as formulações: 3%, 1,5% e 0,5%, respectivamente.

O vinagre (constituído de 4% de ácido acético) apresenta influência na emulsificação pela adição de cargas elétricas provenientes do íon H⁺ às gotas, provocando repulsão entre as mesmas, evitando a coalescência, contribuindo também para o sabor e conservação do produto. A mostarda foi adicionada em pó, pois a adição de compostos finamente divididos em emulsão contribui para a estabilidade, além de melhorar o aroma, a cor e o sabor do produto. O sal contribui para o sabor e conservação. Optou-se pela não adição de outros ingredientes, como temperos, para não mascarar o sabor do produto.

Para o preparo das emulsões utilizou-se liquidificador doméstico (Walita Basic RI2008) com velocidade de rotação constante. Numa primeira etapa homogeneizou-se, a baixa

rotação, o óleo e a mostarda em pó por 1 minuto, a fim de conferir coloração amarelada ao óleo. Em uma segunda etapa adicionou-se a água, o vinagre, o sal e por último a polpa. Os ingredientes foram processados por 3 minutos, a rotação constante, armazenados em recipientes plásticos e conservados em geladeira a aproximadamente 10°C. As análises físico-químicas e sensoriais foram realizadas no primeiro dia de preparo das amostras.

Caracterização físico-química da polpa de banana verde e das emulsões

Na caracterização físico-química da polpa de banana verde e das emulsões, as análises foram realizadas em triplicata e o resultado expresso pela média dos valores incluindo o desvio padrão. A Tabela 2 aponta as análises e os métodos utilizados.

Delineamento experimental

Foi utilizado o delineamento para superfícies limitadas e misturas, módulo do STATISTICA 7.1 (Stat-Soft, Tulsa, OK, USA) utilizando 3 variáveis: água, polpa de banana verde (PBV) e óleo de soja, já que as proporções interferem na estabilidade da emulsão.

Escolheu-se o delineamento para superfícies limitadas por se estar trabalhando com emulsão, haja vista que nenhuma das três variáveis pode variar de 0 a 100%, já que para a formação mesma é indispensável a presença dos líquidos (água e óleo) e do agente estabilizante, no caso, a polpa de banana verde. Desta forma houve a necessidade de se estabelecer limites inferiores e superiores para esses ingredientes. Assim, foram feitos testes preliminares para definição desses limites, baseando-se em formulações de maionese segundo Valle e Camargos³, buscando-se a estabilidade da emulsão sem separação de fases. Com os limites definidos para água, óleo e polpa de banana verde elaborou-se o delineamento experimental, de acordo com a Tabela 3.

Análise colorimétrica

A cor das amostras das emulsões e da polpa de banana verde foi determinada no sistema L*, a*, b* fornecidos pelo espectrofotômetro portátil MiniScan XE Plus (modelo 45/0-L) da marca Hunter Lab (Hunter Assoc. Laboratory, UA, USA), o qual foi calibrado utilizando placas de porcelana preta e branca. Aproximadamente 10g de amostra foi colocada em placa de Petri de 5 cm de diâmetro de modo que cobrisse todo o fundo

Tabela 1. Proporções mínimas e máximas para água, óleo de soja e polpa de banana verde (PBV).

INGREDIENTES	VALORES ORIGINAIS (X _i)		PSEUDOCOMPONENTES (X' _i)	
	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo
Água (X ₁)	0,100	0,200	0,000	0,666
Óleo de soja (X ₂)	0,200	0,250	0,000	0,333
Polpa de banana verde (PBV) (X ₃)	0,550	0,700	0,000	1

Tabela 2. Análises e métodos utilizados na caracterização físico-química da polpa de banana verde e emulsões.

ANÁLISES	MÉTODO
umidade	gravimetria em estufa convencional a 105°C até peso constante ¹¹
cinzas	gravimetria, mediante incineração da amostra em mufla a 550°C até obtenção de cinzas clara ¹¹
gordura total	extração direta em aparelho de Soxhlet, utilizando-se éter de petróleo como solvente ¹¹
acidez	titulação com NaOH padronizado e resultado expresso em mL de solução molar (mL/100g) ¹¹
pH	processo eletrométrico empregando potenciômetro que permite a determinação direta do pH (pHmetro) ¹¹
proteínas	método de Kjeldahl, empregando-se 5,75 como fator de correção de nitrogênio/proteína para vegetais ¹¹
carboidratos	diferença entre a massa inicial da amostra (100g) e o total da massa de proteínas, de lipídios, de resíduo mineral fixo, fibra bruta e umidade ¹²
valor energético total	valor energético = (4 X proteínas) + (9 X lipídios) + (4 X carboidratos) ¹³
sais minerais	os valores de cálcio, fósforo, magnésio foram determinados de acordo com os métodos analíticos da AOAC ¹⁴ , já o potássio, sódio e ferro conforme Freitas et al ¹⁵

da placa e a leitura foi realizada diretamente no centro da mesma. Nesse sistema de cores L^* representa a luminosidade ($L^*=0$ – preto e $L^*=100$ – branco) e a^* e b^* são as coordenadas de cores responsáveis pela cromaticidade: ($+a^*$ = vermelho e $-a^*$ é o verde, $+b^*$ é o amarelo e $-b^*$ é o azul)¹⁶.

Foi calculada a diferença total de cor (ΔE^*) entre as emulsões e a polpa de banana verde (ΔE^*_1) e entre as emulsões e uma amostra de maionese comercial tradicional (ΔE^*_2). A diferença total de cor (ΔE^*) foi determinada utilizando a equação 01 de acordo com Nsonzi e Ramaswamy¹⁷:

$$\Delta E^*=[(\Delta L^*)^2+(\Delta a^*)^2+(\Delta b^*)^2]^{1/2} \quad (01)$$

Onde as alterações em cada parâmetro individual de cor foram calculadas de acordo com as equações 02, 03 e 04¹⁸:

$$\Delta L^*=L^*-L^*_0 \quad (02)$$

$$\Delta a^*=a^*-a^*_0 \quad (03)$$

$$\Delta b^*=b^*-b^*_0 \quad (04)$$

A análise de variância (ANOVA) e o teste de comparação de médias (Tukey), ao nível de significância de 5% ($p<0,05$), foram determinados com o auxílio do programa MSTATC (versão 2.10, Michingan, USA)²².

Neste trabalho, os valores de L^*_0 , a^*_0 e b^*_0 referiram-se aos parâmetros de cor das emulsões e os valores de L^* , a^* e b^* referiram-se aos parâmetros de cor da polpa de banana verde e da maionese comercial.

Avaliação da aceitação sensorial

Os testes sensoriais foram realizados no laboratório de análise sensorial da Usina Piloto do programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos da UFPR, em cabines individuais, iluminadas com luz branca. A análise sensorial das emulsões foi realizada utilizando-se os testes de aceitação global e atitude de compra.

As cinco amostras foram servidas uma de cada vez, aproximadamente 10g em copos descartáveis (50mL),

juntamente com uma espátula plástica, a temperatura de refrigeração ($10^\circ\text{C}\pm 1^\circ\text{C}$) e codificadas de forma aleatória com 3 dígitos. Para neutralizar o paladar serviram-se água e biscoitos do tipo e água e sal.

O teste de aceitação utilizou a escala hedônica aplicado a 36 julgadores não treinados, correspondentes a 27,7% homens e 72,2% mulheres com idade variando de 22 a 35 anos. Utilizou-se a escala estruturada de nove pontos, onde o valor 1 correspondeu a “desgostei muitíssimo” e o valor 9 correspondeu a “gostei muitíssimo”¹⁹. A atitude de compra foi avaliada com a amostra que obteve melhor aceitação na escala hedônica, utilizando escala de 5 pontos onde o valor 1 correspondeu a “eu nunca compraria este produto” e o valor 5 correspondeu a “eu certamente compraria este produto”^{20,21}. A análise de variância (ANOVA) e o teste de comparação de médias (Tukey) ao nível de significância de 5% ($p<0,05$) foram determinados com o auxílio do programa MSTATC (versão 2.10, Michingan, USA)²².

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Padronização da matéria-prima (banana verde)

Os resultados dos parâmetros físico-químicos de umidade, pH, sólidos solúveis totais (°Brix), acidez titulável (em % de ácido málico) e a razão Brix/acidez titulável para a banana verde estão apresentados na Tabela 4.

O valor obtido para umidade esta de acordo com Morton²³ que encontrou umidade média de 70% para banana verde e 75% para a banana madura e concluiu que durante a maturação, a umidade da polpa aumenta ligeiramente, devido às transformações dos carboidratos em açúcares simples.

Com relação ao pH e acidez total titulável (em ácido málico) os resultados 5,20 e 0,15% estão concordantes com o estudo de Lima et al.²⁴, que obtiveram valores similares para banana verde. Dentre os ácidos encontrados na banana estão o

Tabela 3. Delineamento para superfícies limitadas e misturas com 7 tratamentos e 2 pontos centrais, para as misturas de óleo de soja, água e polpa de banana verde.

FORMULAÇÕES	COMPONENTES ORIGINAIS			PSEUDOCOMPONENTES		
	X1	X2	X3	X'1	X'2	X'3
Vertex (V)						
Centroid (C)						
1V (F1)	0,10	0,20	0,70	0,0000	0,0000	1,0000
2V (F2)	0,20	0,20	0,60	0,6660	0,0000	0,3340
3V (F3)	0,10	0,25	0,65	0,0000	0,3330	0,6670
4V (F4)	0,20	0,25	0,55	0,6660	0,3330	0,0100
5V(C) (F5)	0,15	0,225	0,625	0,3330	0,1665	0,5005
5V(C) (F5 ₁)	0,15	0,225	0,625	0,3330	0,1665	0,5005
5V(C) (F5 ₂)	0,15	0,225	0,625	0,3330	0,1665	0,5005

Onde, $X1 + X2 + X3 = 1$ ou 100%; X1 = água. X2 = óleo de soja e X3 = polpa de banana verde (PBV)

málico, o cítrico e o oxálico como predominantes. De acordo com Seymour et al.²⁵ o ácido málico e o cítrico são responsáveis pelo sabor azedo da banana verde e o ácido oxálico é responsável pela adstringência da fruta e à medida que ocorre o amadurecimento há uma redução desses ácidos e o sabor vai se tornando adocicado principalmente devido aos açúcares provindos da degradação do amido.

De acordo com Silva et al.²⁶, os sólidos solúveis totais (SST) aumentam rapidamente com a maturação da fruta e nesse trabalho o valor de SST (°Brix) encontrado para a banana verde foi de 5,15, o que confirma o estágio totalmente das frutas, pois segundo Ditchfield²⁷ as bananas verdes apresentam sólidos solúveis totais em torno de 4,9 a 6,5 ao passo que as maduras com coloração amarelas e traços marrons apresentam teor de 21°Brix

Caracterização química da polpa de banana verde

A Tabela 5 apresenta os resultados dos parâmetros físico-químicos para a polpa cozida de banana verde.

Valle e Camargos³, analisando a polpa cozida de banana verde encontraram 64,79% de umidade, já Morton²³ traz uma

faixa de 58,7 a 74,1% de umidade para a banana verde cozida e nesse trabalho, o alto conteúdo de umidade (89,05%), está relacionado a quantidade de água adicionada, que foi na proporção de 1:1 para banana e água.

Verificou-se também que quantidade de carboidratos (10,17%), apresentou-se um pouco menor que para Valle e Camargos³, 19,64%, o que se deve ao alto conteúdo de umidade da polpa. Em base seca, o valor aproxima-se do encontrado por Torres et al.³⁰ que analisou a farinha de banana verde da variedade *Nanicão* em que a quantidade de carboidratos em matéria-seca foi de 91,70% sendo que dessa proporção a quantidade de amido foi de 87,80%.

Composição química das emulsões

Os resultados dos parâmetros físico-químicos e valor energético para as formulações de emulsão tipo maionese estão apresentados na Tabela 6.

Gordura total e o valor energético tiveram seus valores significativamente aumentados com o aumento de óleo, as formulações F3, F4 e F5 tiveram os maiores valores para estes parâmetros devido ao maior conteúdo de óleo de soja.

Tabela 4. Composição físico-química para a banana verde (matéria-prima).

PARÂMETROS	VALORES EXPERIMENTAIS**
Umidade (%)	71,69 ± 0,12
pH	5,20 ± 0,6
Sólidos solúveis totais (°Brix)	5,15 ± 0,31
Acidez titulável (%)*	0,15 ± 0,01
Razão °Brix/Acidez titulável	34,33

* Expresso em ácido málico; ** Média de triplicata ± desvio padrão

Tabela 5. Parâmetros físico-químicos para a polpa cozida de banana verde.

PARÂMETROS (g/100g)	Polpa de banana verde (PBV)	PBV (base seca)%
Umidade	89,05 ± 0,56	-
Carboidratos	10,17 ± 0,39	92,87 ± 0,46
Proteínas	0,28 ± 0,04	2,56 ± 0,09
Gordura total	0,13 ± 0,01	1,19 ± 0,33
Cinzas	0,37 ± 0,02	3,38 ± 0,21
Cálcio*	7,16 ± 1,25	-
Fósforo*	7,88 ± 0,76	-
Magnésio*	14,74 ± 0,12	-
Potássio*	118,54 ± 3,82	-
Sódio*	26,56 ± 3,75	-
Ferro*	0,74 ± 0,11	-
Valor calórico (Kcal/100g)	43	-

* mg/100g

De acordo com USDA²⁸ uma maionese tradicional tem 680Kcal/100g enquanto que as com menor teor de gordura (*light*) tem 340Kcal/100g. Segundo a Tabela TACO²⁹ a maionese industrializada tradicional com ovos tem 302 Kcal/100g. Nesse trabalho os valores energéticos para as emulsões estiveram entre 197,30 a 240,79Kcal/100g, ou seja, mesmo as formulações com maior conteúdo de óleo (F3 e F4) apresentaram menos calorias que a maionese comercial com menor teor de gordura. Na Figura 1 encontra-se essa comparação pelo gráfico de barras entre os valores energéticos das formulações e da maionese tradicional (MT) e maionese *light* (ML).

Segundo a Tabela TACO²⁹ a maionese comercial tradicional possui por 100g: 3mg de cálcio, 1mg de magnésio, 0,1mg de ferro, 16mg de potássio, 787mg de sódio e não apresenta valores significativos para fósforo. Exceto pelo valor de sódio, todas as formulações com polpa de banana verde obtiveram maiores valores para os sais minerais listados, baseado nisso, pode ser verificado que a polpa de banana verde contribui significativamente para aumentar os valores nutritivos das emulsões. Na Figura 2 pode ser percebido a diferença entre esses teores de cálcio, fósforo, magnésio e ferro e na Figura 3 a relação entre as quantidades de potássio das formulações e da maionese comercial tradicional segundo a Tabela TACO²⁹

A determinação de umidade é uma das medidas mais importantes e utilizadas na análise de alimentos. A umidade de um alimento está relacionada com sua estabilidade, qualidade e composição, e pode afetar a embalagem, estocagem e processamento do produto, dessa maneira definir os parâmetros que mais afetam essa característica é importante durante a formulação do produto. Para isso foram plotados diagramas

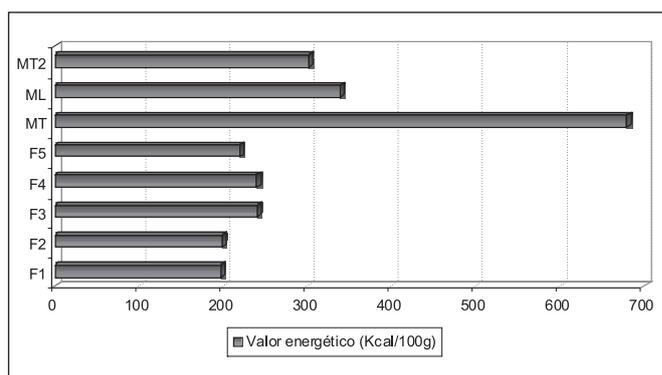


Figura 1. Valor energético das emulsões de banana verde e das maioneses comerciais: tradicional e *light*

Nota: MT2: maionese tradicional TACO, MT :maionese tradicional USDA, ML: maionese *light* USDA

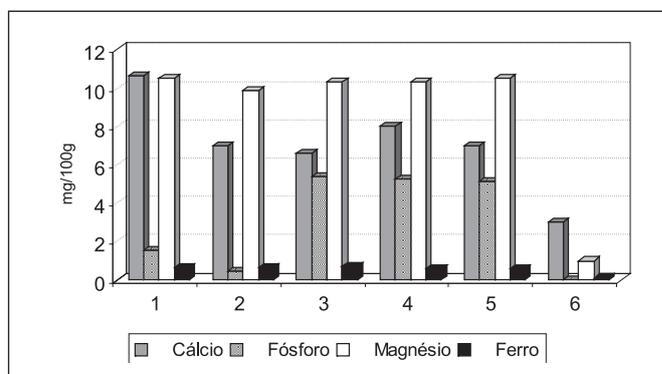


Figura 2. Valores de sais minerais das emulsões de banana verde e da maionese comercial tradicional.

Nota: 1 – F1, 2 – F2, 3 – F3, 4 – F4, 5 – F5, 6 – MAIONESE COMERCIAL

Tabela 6. Parâmetros físico-químicos e valor energético para as formulações de emulsões tipo maionese de banana verde.

PARÂMETROS (g/100g)	F1 água/óleo/PBV (0,10/0,20/0,70)	F2 água/óleo/PBV (0,20/0,20/0,60)	F3 água/óleo/PBV (0,10/0,25/0,65)	F4 água/óleo/PBV (0,20/0,25/0,55)	F5 água/óleo/PBV (0,15/0,225/0,625)
Umidade	72,04 ± 0,04 b	72,87 ± 0,07 a	67,59 ± 0,03 e	67,87 ± 0,16 d	70,33 ± 0,17 c
Carboidratos	7,32 ± 0,12 a	5,78 ± 0,11 d	6,78 ± 0,10 b	6,45 ± 0,12 c	5,87 ± 0,09 d
Proteínas	0,38 ± 0,03 a	0,27 ± 0,02 b	0,33 ± 0,03 a	0,33 ± 0,02 a	0,37 ± 0,01 a
Gordura total	18,50 ± 0,12 e	19,39 ± 0,03 d	23,60 ± 0,07 b	23,67 ± 0,19 a	21,68 ± 0,02 c
Cinzas	1,76 ± 0,01 a	1,69 ± 0,03 b	1,70 ± 0,02 b	1,68 ± 0,02 b	1,68 ± 0,03 b
Cálcio*	10,65 ± 0,62 a	7,00 ± 0,10 b	6,61 ± 0,96 b	8,00 ± 1,42 b	6,98 ± 0,47 b
Fósforo*	1,55 ± 0,58 b	0,46 ± 0,21 b	5,37 ± 0,04 a	5,24 ± 0,39 a	5,11 ± 0,12 a
Magnésio*	10,54 ± 0,23 a	9,90 ± 0,53 a	10,34 ± 0,52 a	10,31 ± 0,34 a	10,54 ± 0,82 a
Potássio*	95,85 ± 4,08 a	81,53 ± 1,10 b	81,44 ± 1,27 b	78,11 ± 1,65 b	85,13 ± 2,24 a
Sódio*	500,73 ± 1,23 c	527,10 ± 2,74 b	517,07 ± 3,92 b	525,22 ± 2,87 b	537,12 ± 0,94 a
Ferro*	0,64 ± 0,13 a	0,62 ± 0,05 a	0,71 ± 0,03 a	0,57 ± 0,04 a	0,60 ± 0,10 a
Valor energético (Kcal/100g)	197 ± 0,69 c	198 ± 0,35 c	240 ± 0,31 a	240 ± 1,45 a	220 ± 0,24 b
pH a 25°C	4,40 ± 0,01 a				
Acidez (mL/100g)	3,33 ± 0,10 a	3,18 ± 0,04 a	3,20 ± 0,04 a	3,09 ± 0,20 a	3,14 ± 0,10 a

*valores em mg/100g. Médias de triplicata ± desvio padrão seguidas da mesma letra em cada linha, são significativamente iguais pelo teste de Tukey. PBV = Polpa de banana verde.

ternários, em que pela Metodologia de Superfície de Resposta verifica-se estatisticamente influência da água, polpa de banana verde e do óleo de soja na umidade das emulsões e também no valor energético das mesmas, visto que a quantidade de calorías é um dos fatores determinantes na compra de um produto.

Os diagramas ternários mostrando a influência das proporções de água, óleo e PBV na umidade e no valor energético das formulações, em pseudo componentes, estão representados nas Figuras 4 e 5.

Os coeficientes das equações ajustados pelo modelo quadrático para L^* , a^* e b^* , assim como seus erros padrões, estão listados na Tabela 7.

Pelas Figuras 4 e 5 e analisando as equações quadráticas para a umidade e valor energético e também pelos coeficientes da Tabela 7, verificou-se que a água (x) e a polpa (z) de banana verde (PBV) tiveram a maior influência no aumento deste parâmetro, o mesmo ocorrendo com interação entre ambos (xz). Com relação ao valor energético, ao contrário o óleo (y) teve maior influência no aumento deste parâmetro.

A Tabela 8 mostra a Análise de Variância para os parâmetros umidade e valor energético, ajustados de acordo o modelo quadrático. O valor de F foi significativo para todos os parâmetros e mostrou que o modelo de segunda ordem ajustou bem os dados experimentais. Pelo coeficiente de determinação (R^2) estabelecidos nas Figuras 3 e 4 verificou-se que ambos estiveram acima de 0,9 para os parâmetros analisados. A falta de ajuste, que mede o ajuste do modelo utilizado, não foi significativa ($p > 0,05$), indicando que o modelo é suficientemente apurado para predizer os parâmetros físico-químicos.

Análise colorimétrica

Na Tabela 9 estão apresentados os valores médios dos parâmetros de cor para as amostras das emulsões e da polpa de banana verde.

De acordo com os resultados da Tabela 9, a cor da polpa de banana verde influenciou a cor de todas as formulações de emulsões. Quanto maior a proporção de polpa, maiores os valores de a^* e b^* e menores os valores de L^* . A polpa teve o menor valor para a luminosidade (L^*) e os maiores valores de a^* e b^* , o que indica que a polpa apresentou as cores vermelha e amarela mais intensa e é mais escura comparada a todas as formulações.

Verificou-se que as formulações com menor teor de polpa de banana verde (F2, F4 e F5) apresentaram maiores valores de luminosidade (L^*). De acordo com Worrasinchai et al⁷ a luminosidade é um parâmetro muito importante na aparência de maionese, pois o consumidor prefere as mais luminosas as mais opacas.

Com relação aos parâmetros a^* e b^* as formulações com maior teor de polpa de banana verde (F1 e F3) apresentaram os maiores valores para ambos os parâmetros, pois apresentaram-se mais amarelas e vermelhas que as demais devido ao conteúdo de polpa.

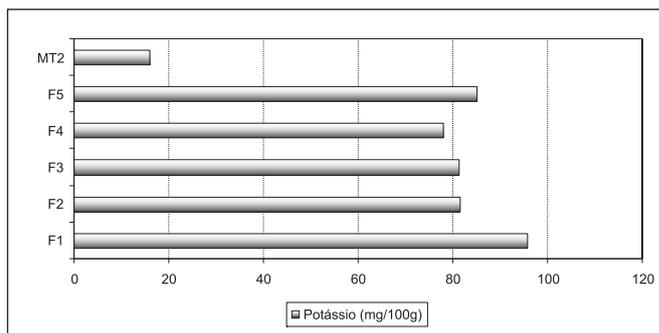


Figura 3. Valores de potássio das emulsões de banana verde e da maionese comercial tradicional.

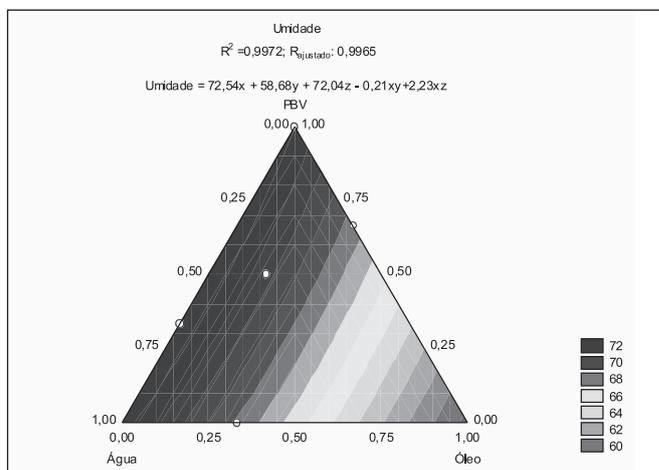


Figura 4. Diagrama ternário da superfície de resposta do modelo quadrático relativo à umidade na temperatura de 10°C.

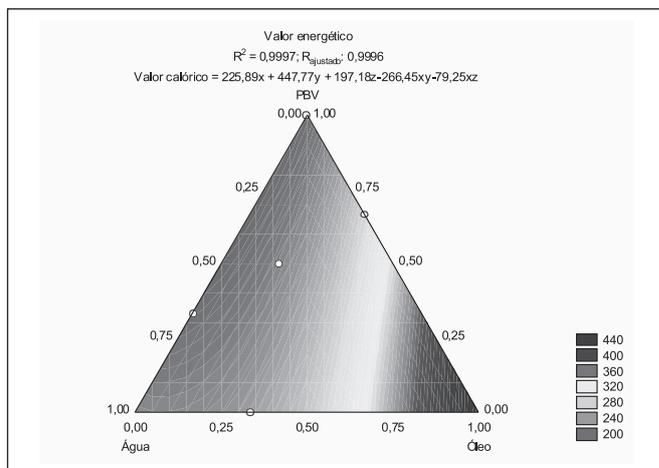


Figura 5. Diagrama ternário da superfície de resposta do modelo quadrático relativo ao valor energético na temperatura de 10°C.

Na Tabela 10 encontra-se a diferença total de cor (ΔE^*) entre emulsões e a polpa de banana verde (ΔE^*_1) e entre as emulsões e a amostra de maionese comercial tradicional (ΔE^*_2).

Verificou-se que o ΔE^*_1 (diferença total de cor entre as emulsões e a polpa de banana verde), foi maior para todas as formulações comparado ao ΔE^*_2 (diferença total de cor entre

as emulsões e a maionese tradicional), mostrando que as amostras aproximaram-se mais da cor da maionese comercial tradicional que da polpa de banana verde. Essa diferença pode ser observada na Figura 6 em que está representada em gráfico de barras a comparação entre os valores de diferença total de cor (ΔE^*).

Tabela 7. Coeficientes obtidos do modelo quadrático para os parâmetros: umidade e valor energético.

UMIDADE	x	y	z	xy	xz
Coefficientes	72,54*	58,68*	72,04*	-0,207	2,24*
Erro padrão	0,19	0,23	0,06	0,72	0,43
VALORENERGÉTICO					
Coefficientes	225,89*	447,77*	197,18*	-266,45*	-79,25*
Erro padrão	0,96	1,14	0,31	3,59	2,18

* Coeficientes significativos. x = água; y = óleo; z= polpa de banana verde (PBV)

Tabela 8. Análise de variância do modelo quadrático para as respostas: umidade e valor energético das emulsões.

PARÂMETROS	SQ	GL	QM	F	p
UMIDADE					
Modelo	68,45	4	17,11	1418,52	0,00
Erro total	0,19	16	0,012		
Falta de ajuste	0,00	0	0,00		
Erro puro	0,19	16	0,012		
Total ajustado	68,64	20	3,43		
VALORENERGÉTICO					
Modelo	14616,28	4	3654,07	12095,17	0,00
Erro total	4,83	16	0,302		
Falta de ajuste	0,00	0	0,00		
Erro puro	4,83	16	0,302		
Total ajustado	14621,11	20	731,06		

Nota: SQ – Soma dos quadrados, GL – Grau de liberdade, QM – Quadrado da média.

Tabela 9. Parâmetros de cor L*, a* e b* da polpa de banana verde (PBV) e das emulsões.

AMOSTRAS (água/óleo/PBV)	L*	a*	b*
Polpa de banana verde (PBV)	69,42 ^a ±0,49	1,30 ^a ±0,26	31,63 ^a ±0,63
F1 (0,10/0,20/0,70)	83,93 ^b ±0,54	1,22 ^{ab} ±0,04	14,87 ^b ±0,07
F2 (0,20/0,20/0,60)	89,40 ^d ±0,21	0,95 ^{bc} ±0,03	13,45 ^c ±0,04
F3 (0,10/0,25/0,65)	86,29 ^c ±0,07	1,27 ^a ±0,01	14,77 ^b ±0,08
F4 (0,20/0,25/0,55)	93,17 ^e ±0,23	0,75 ^c ±0,02	12,68 ^c ±0,03
F5 (0,15/0,225/0,625)	90,40 ^d ±0,83	0,88 ^c ±0,06	13,34 ^c ±0,86

Médias ± desvio padrão seguidas da mesma letra em cada coluna, são significativamente iguais pelo teste de Tukey (p≤0,05). L* (luminosidade), a* (croma verde-vermelho), b* (croma azul-amarelo)

As formulações F1 e F3 (com 70 e 65% de PBV, respectivamente) apresentaram-se mais próximas a coloração da maionese comercial, haja vista que apresentaram menores valores de (ΔE_2^*) precedidas das formulações F5 e F2 (com 62,5 e 60% de PBV respectivamente). A amostra F4 (55% de PBV) por outro lado, diferiu significativamente das demais se revelando a menos similar em relação à cor tanto da polpa de banana verde como da maionese comercial tradicional.

Avaliação Sensorial

Na Tabela 11 encontram-se as médias de aceitação global pela escala hedônica das cinco formulações (F1, F2, F3, F4 e F5),

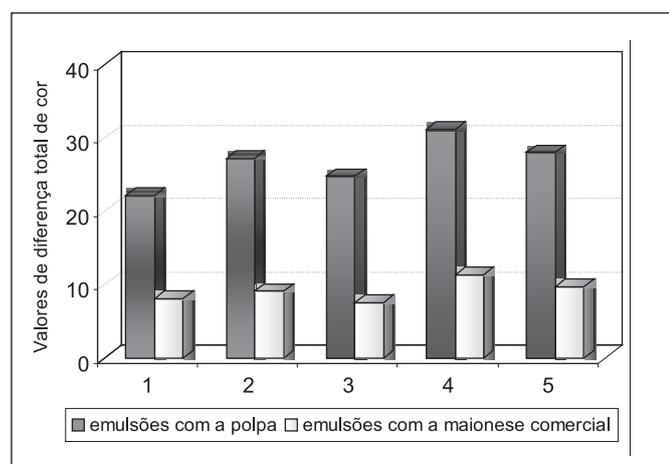


Figura 6. Diferença total de cor (ΔE^*) entre as emulsões e a polpa de banana verde e entre as emulsões e a maionese comercial tradicional.

As notas estiveram entre 6,11 para a formulação menos aceita (F4) e 7,14 para a mais aceita (F3). A formulação F1 não diferiu significativamente da F3 mostrando-se que também foi bem aceita pelos julgadores. Verifica-se ainda que as amostras com melhor aceitação (F1 e F3) foram as com maior concentração de polpa de banana verde (70% e 65%).

A Figura 7 apresenta os resultados com relação à atitude de compra dos julgadores.

A intenção de compra das emulsões tipo maionese (Figura 7) refletiu de certa forma a aceitabilidade dos produtos. Pediu-se aos julgadores responder a intenção de compra baseado na amostra mais aceita e verificou-se que apenas 1% dos provadores “jamais comprariam o produto”, 20% “teria

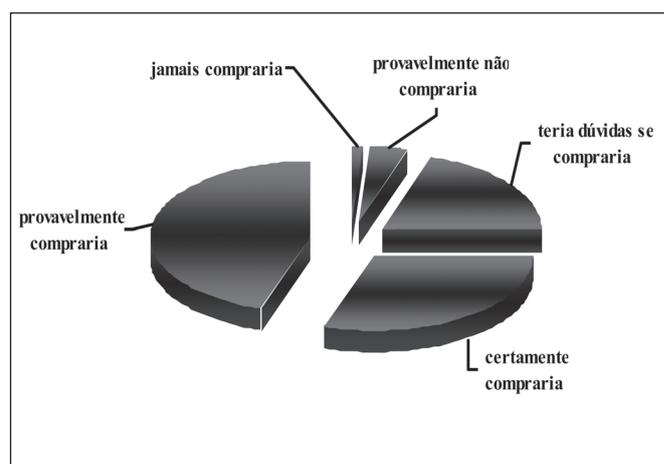


Figura 7. Atitude de compra dos provadores com relação à amostra mais aceita.

Tabela 10. Diferença total de cor (ΔE^*) entre as emulsões e a polpa de banana verde (ΔE_1^*) e entre as emulsões e a maionese comercial tradicional (ΔE_2^*).

Emulsões(água/óleo/PBV)	ΔE_1^*	ΔE_2^*
F1 (0,10/0,20/0,70)	22,18 ^d ± 0,39	8,13 ^c ± 0,43
F2 (0,20/0,20/0,60)	27,24 ^{bc} ± 0,83	9,12 ^b ± 0,11
F3 (0,10/0,25/0,65)	24,80 ^c ± 0,69	7,54 ^c ± 0,08
F4 (0,20/0,25/0,55)	31,18 ^a ± 1,98	11,34 ^a ± 0,11
F5 (0,15/0,225/0,625)	28,00 ^b ± 1,20	9,75 ^b ± 0,59

Médias desvio padrão seguidas da mesma letra em cada coluna são significativamente iguais pelo teste de Tukey.

Tabela 11. Médias de aceitação global pela escala hedônica das cinco formulações de emulsão tipo maionese de banana verde.

Formulações (aguar/óleo/PBV)	Notas aceitação global*	DMS
F1(0,10/0,20/0,70)	7,11 ^a ± 0,89	0,65
F2(0,20/0,20/0,60)	6,44 ^b ± 1,18	0,65
F3(0,10/0,25/0,65)	7,14 ^a ± 1,07	0,65
F4(0,20/0,25/0,55)	6,11 ^b ± 1,28	0,65
F5(0,15/0,225/0,625)	6,36 ^b ± 1,07	0,65

* Médias de 36 julgadores. Médias seguidas da mesma letra em cada coluna são significativamente iguais pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%. DMS = Diferença Mínima Significativa.

dúvidas se compraria”, sendo que a maioria dos provadores 30 e 45%, certamente e provavelmente compraria o produto, respectivamente.

Os autores Borges² e Taipina et al⁹ trabalharam com formulações de pão, nhoque, e suco, respectivamente formulados com polpa cozida de banana verde e encontram boa aceitação do consumidor a esse novo ingrediente. Dessa maneira verifica-se que a polpa de banana verde vem sendo uma alternativa na produção de produtos diferenciados sem alteração significativa nas características sensoriais.

CONCLUSÃO

As emulsões formuladas com polpa de banana verde apresentaram baixo valor energético comparados às maioneses comerciais, além de altos valores para potássio, ferro, fósforo, cálcio e magnésio o que mostra a contribuição da polpa para o valor nutritivo das emulsões.

As formulações com maior proporção de polpa de banana verde (70 e 65%, respectivamente) obtiveram coloração próxima à maionese comercial e ainda obtiveram melhor aceitação pelos consumidores, mostrando que a polpa apresentou influência positiva tanto na cor como no sabor das emulsões. Pela atitude de compra verificou-se que 75% dos provadores comprariam as emulsões, o que indica a aceitação do novo produto formulado com polpa de banana verde.

REFERÊNCIAS

1. Zhang P, Wampler JL, Bhunia AK, Burkholder KM, Patterson JA, Whistler RL. Effects of arabinoxylans on activation of murine macrophages and growth performance of broiler chicks. *Cer Chem*. 2004; 81: 511-4.
2. Borges MTMR. Potencial vitamínico de banana verde e produtos derivados. [Tese de doutorado] Campinas, São Paulo: Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 2003. 137pp.
3. Valle HF, Camargos M. Yes, nós temos banana. São Paulo: Senac; 2003.
4. Costa AS, Borges MTMR. Definição e análise das formas de amido presentes em diferentes variedades de banana verde. In: Anais do V Congresso de iniciação científica da UFSCar. São Carlos, SP, 1997: 204.
5. McClements DJ. Food emulsions: principles, practice, and techniques. Boca Raton: CRC Press; 1999.
6. Chouard G. 100% indulgence 0% guilt-be in phase, bring connectivity to your low-fat mayonnaise. *Innov in Food Tech* 2005; 29: 98-100.
7. Worrasinchai S, Supphantharika M, Pinjai S, Jamnong P. β -Glucan prepared from spent brewer's yeast as a fat replacer in mayonnaise. *Food Hydroc*. 2006;20:68-78.
8. Ranzani RTC, Sturion GL, Picudo MH. Avaliação química e biológica de casca de banana madura. In Anais do Simpósio Latino-Americano de Ciência de Alimentos. Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos, 1995: 84.
9. Taipina MS, Cohen VH, Del Mastro NL, Rodas MAB, Della Torre JCM. Aceitabilidade sensorial de suco de manga adicionado de polpa de banana (Musa sp) verde. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2004; 63 (Suppl 1): 49-55.
10. Doymaz I, Tugrul N, Pala M. (2006). Drying Characteristics of Dill and Parsley Leaves. *J Food Eng*. 2006; 77: 559-565.
11. Instituto Adolfo Lutz. (IAL). Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz - Métodos Químicos e Físicos para Análise de Alimentos. 4th ed. Brasília: 2005.
12. USP – Universidade Estadual de São Paulo. Tabela de composição de alimentos: Projeto integrado de composição de alimentos. Available from: URL <http://www.fcf.usp.br/tabela/tbmenu.php>.
13. Souci, SW, Fachman, W, Kraut, H. Food composition and nutrition tables 6th ed.: Stuttgart: Medpharm; 2000.
14. AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC International. 17th ed. Gaithersburg; 2000.
15. Freitas RS, Cecato E, Santos MB, Tiboni EB. Técnicas analíticas de alimentos. Curitiba; 1979. p 10.
16. Hunterlab. Applications Note [serial online] 1996. 8(7). Available from: URL: <http://www.hunterlab.com>.
17. Nsonzi F; Ramaswamy HS. Osmotic Dehydration Kinetics of Blueberries. *Drying Tech*. 1998;16: 725-41.
18. Chua KJ, Mujumdar AJ, Chou SK, Hawlader MNA, Ho JC. Batch drying of banana pieces – effect of stepwise change in drying air temperature on drying kinetics and product colour. *Food Res Intern*. 2001 34: 721-731.
19. Dutcoski SD. Análise Sensorial de Alimentos. 2nd ed. Curitiba (PR); Editora Universitária Champagnat; 2007.
20. Meilgaard M, Civille GV, Carr BT. Sensory Evaluation Techniques. Boca Raton: CRC Press; 1991.
21. Izidoro DR, Sierakowski MR, Demczuk JRB, Haminiuk CWI, Scheer AP. Avaliação sensorial de emulsão adicionada de polpa de banana (Musa ssp) verde. In Anais do: XX Congresso de ciência e tecnologia de alimentos. Curitiba, PR, 2006: 794.
22. Koehler HS. Estatística Experimental. Curitiba(PR): UFPR: 1999.
23. Morton JF. Fruits of Warm Climates. Banana.Miami. FL: 1987; 29-46.
24. Lima LC, Costa SM, Dias MSC, Martins RN, Ribeiro JrPM. Controle do amadurecimento de banana ‘prata-anã’, armazenada sob refrigeração e atmosfera modificada passiva com o uso do 1-metilciclopropeno. *Ciênc e Agro*, Lavras. 2004; 29(2):476-80.
25. Seymour GB, Taylor JE, Tucker GA. Biochemistry of Fruit Ripening. London: Chapman & Hall;1993.
26. Silva CS, Lima LC, Santos HS, Camili EC, Vieira CRYI, Martin CS, Vieites RL. Amadurecimento da banana-prata climatizada em diferentes dias após a colheita. *Ciênc Agrotec*. 2006;30(1):103-111.
27. Ditchfield D, Tadini CC. Acompanhamento do processo de amadurecimento da banana nanição (Musa cavendishii Lamb.). In Anais do XVIII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos. São Paulo, SP, 2002.
28. USDA. Nutritive Values of Foods. U.S. Department of Agriculture. Beltsville, Maryland: Agricultural Research.. Nutrient Data Laboratory; 2002.
29. TACO – Tabela Brasileira de Composição de Alimento. Campinas (SP): NEPA – UNICAMP. 2nd ed; 2006.
30. Torres LLG, Ahmed AED, Carvalho CWP, Ascheri JLR, Germani R, Miguez M. Efeito da umidade e da temperatura no processamento de farinha de banana verde (Musa acuminata, grupo AAA) por extrusão termoplástica. *B. CEPPA*, 2005: 3(2) 273-290.

Influência de *Saccharomyopsis schoenii* e *Saccharomyopsis crataegensis* na produção de aflatoxinas B₁ e G₁ por *Aspergillus parasiticus* em amendoim (*Arachis hypogaea* L.)

Saccharomyopsis schoenii and *Saccharomyopsis crataegensis* effect on B₁ and G₁ aflatoxins production by *Aspergillus parasiticus* in peanut (*Arachis hypogaea* L.)

RIALA6/1172

Guilherme PRADO^{1*}, Robson de Assis SOUZA¹, Vanessa Andrea Drummond MORAIS¹, Jovita Eugênia Gazzinelli Cruz MADEIRA¹, Marize Silva de OLIVEIRA¹, Mabel Caldeira de ANDRADE¹, Ignácio José de GODOY², Carlos Augusto ROSA³, Ary CORRÊA Jr³, Joenes Mucci PELUZIO⁴, Raphael Sanzio PIMENTA⁴

* Endereço para correspondência: Fundação Ezequiel Dias, Rua Conde Pereira Carneiro, 80 Gameleira. CEP30510010, Belo Horizonte, MG/Brasil. Tel: +55 31 33719462; Fax: +55 31 33719553 e-mail: gui@funed.mg.gov.br.

¹Laboratório de Micologia e Micotoxinas, Serviço de Ciências Bioquímicas, Fundação Ezequiel Dias. Belo Horizonte, MG/ Brasil.

²Instituto Agronômico de Campinas, Campinas, SP/ Brasil.

³Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG/ Brasil.

⁴Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia, Universidade Federal do Tocantins, Palmas, TO/ Brasil.

Recebido:30/04/2008 – Aceito para publicação: 16/10/2008.

RESUMO

As aflatoxinas constituem o grupo de metabólitos secundários produzidos principalmente pelos *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius*. Foi investigado o efeito isolado das leveduras *Saccharomyopsis schoenii* e *S. crataegensis* na produção de aflatoxinas B₁ e G₁ em amendoim, cultivar IAC Caiapó. As amostras de amendoim *in natura* e previamente autoclavadas foram inoculadas com *A. parasiticus* (1,6 x 10⁶ esporos.mL⁻¹) e cultura das leveduras (1,6 x 10⁸ células.mL⁻¹), seguido de incubação a 25°C durante sete dias. Foram realizados dois experimentos: no primeiro o fungo filamentososo e as leveduras foram inoculados simultaneamente. No segundo, a levedura foi inoculada 3 h antes da adição de fungo filamentososo. A quantificação das aflatoxinas foi executada por cromatografia em camada delgada. A produção das aflatoxinas B₁ e G₁ foi reduzida na presença das leveduras. A porcentagem de redução da concentração das aflatoxinas foi maior quando a suspensão do fungo foi adicionada 3 h após a inoculação da suspensão de leveduras. O decréscimo da concentração de aflatoxina B₁ atingiu 89,3% e 82,6%, respectivamente na presença de *S.schoenii* e de *S.crataegensis*. Os níveis de aflatoxina G₁ foram reduzidos em 91,2% na presença de *S.schoenii* e em 93,2% quando *S.crataegensis* foi inoculada.

Palavras-chave. controle biológico, fungos, aflatoxinas.

ABSTRACT

Aflatoxins are a group of secondary metabolites produced mainly by *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* and *A. nomius*. The effect of *S. schoenii* and *S. crataegensis* in the production of aflatoxin B₁ and G₁ in peanuts, cultivar IAC Caiapó was investigated. Previously autoclaved and *in natura* peanuts samples were inoculated with *A. parasiticus* (1.6 x 10⁶ spores.mL⁻¹) and yeast cultures (1.6 x 10⁸ cells.mL⁻¹), followed by incubation at 25°C for seven days. Two experiments were carried out: for the first one, the filamentous fungi and the yeast suspensions were inoculated simultaneously. In the second experiment, the filamentous fungi were inoculated 3 h after yeasts inoculation. Aflatoxin quantification was performed by thin layer

chromatography. The production of B₁ and G₁ aflatoxin was reduced in the presence of the yeasts. The percentage of reduction in aflatoxin concentration was higher when the filamentous fungus was inoculated 3 h after adding yeast suspension. The reduction of B₁ aflatoxin concentration came to 89.3% and 82.6%, in the presence of *S. schoenii* and *S. crataegensis*, respectively. The G₁ aflatoxin levels were reduced in 91.2% in the presence of *S. schoenii* and 93.2% in the presence of *S. crataegensis*.

Key words. biological control, fungi, aflatoxins.

INTRODUÇÃO

Aflatoxinas são produtos do metabolismo secundário de *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius*, ocorrendo, na grande maioria dos casos, após a fase de crescimento exponencial dos fungos, sendo descritas como tendo atividade imunossupressora, teratogênica e hepatocarcinogênica^{1,2}.

A contaminação de alimentos com aflatoxinas é mais freqüente em regiões tropicais e semitropicais, como o Brasil, sendo as aflatoxinas B₁ e G₁ as de maior ocorrência. A literatura publicada está repleta de informações sobre a incidência de aflatoxinas em alimentos naturais e processados, principalmente em grãos, como o amendoim, em níveis que variam de 1 a 100 ng.g⁻¹ ou superiores³.

O controle das micotoxinas, e em especial das aflatoxinas, após mais de 40 anos de sua descoberta, ainda não apresentou um modelo seguro, eficaz e de solução definitiva. Numerosas estratégias para a prevenção, detoxificação ou inativação das aflatoxinas têm sido utilizadas, como separação mecânica de grãos, calor, utilização de adsorventes, microondas e irradiação gama⁴⁻⁹.

Com o crescente aumento no consumo de alimentos isentos de agrotóxicos, devido a uma maior preocupação do consumidor com a qualidade de vida e saúde, produtores têm buscado alternativas de controle de doenças que não depreciem o valor final do produto e que atendam as necessidades do mercado. Neste contexto, o controle biológico de patógenos se apresenta como uma alternativa¹⁰.

Alguns microrganismos são capazes de diminuir ou inibir a produção de aflatoxinas por espécies toxigênicas de *A. flavus* e *A. parasiticus*. As bactérias *Lactobacillus casei* e *L. rhamnosus*, as leveduras *Pichia guilliermondii*, *Kluyveromyces* sp, *Saccharomyces cerevisiae* e os fungos, tais como, *A. oryzae*, *A. niger* e *Rhizopus oryzae*, têm sido descritos como capazes de inibir o crescimento de cepas toxigênicas de *Aspergillus*, bem como a produção de aflatoxinas¹¹⁻¹⁵.

Normalmente o controle biológico utiliza fungos, bactérias, vírus e insetos. Nos últimos anos, as leveduras têm despertado o interesse de estudiosos, pois apresentam diversas características que podem ser exploradas no desenvolvimento de estratégias de controle¹⁶. Leveduras em geral são de fácil cultivo, com grande habilidade de colonização de substratos vegetais, permanecendo viáveis nestes substratos por grandes períodos de tempo em diferentes condições ambientais, não formam esporos alergênicos e normalmente não produzem substâncias tóxicas¹⁷⁻¹⁹.

Diversas espécies de leveduras vêm sendo utilizadas com sucesso como agentes de controle biológico. *Candida oleophila* e *Pichia membranifaciens* contra *Botrytis cinerea* causador do bolor cinzento em uvas; *Debaryomyces hansenii* contra *Penicillium digitatum* também em uvas; *Pichia guilliermondii* contra *Botrytis*, *Rhizopus*, *Penicillium* e *Alternaria* que degradam o tomate; *Cryptococcus laurentii*, *Cr. flavus* e *Cr. albidus* que controlam as populações de *Mucor* em pêras; *Candida sake* contra *B. cinerea* e *Rhizopus nigra*, que são os principais causadores de doenças pós-colheita em maçãs²⁰⁻²².

O parasitismo e a degradação das hifas do fungo patogênico pelos antagonistas têm sido vinculados à aderência das células da levedura às hifas dos fungos e à elevada produção de glucanase a partir de diferentes fontes de carbono. A presença natural de várias espécies de leveduras, bem como a utilização de alimentos preparados com esses organismos pela população, são fatores que contribuem para a aceitação de vegetais tratados com estes microrganismos nos diversos mercados do mundo²³.

O primeiro relato descrevendo a penetração de um fungo filamentosos por uma levedura foi realizado por Kreger-van Rij e Veenhuis²⁴, mas foi o trabalho de Lachance e Pang²⁵, o primeiro a descrever a penetração e identificar esse fenômeno como predação. A capacidade de predação foi observada em espécies do gênero *Saccharomycopsis* incluindo *Candida amapae*, uma levedura anamórfica (sem fase sexual conhecida), também pertencente a este gênero, como determinado por seqüenciamento das regiões D1 e D2 da substância maior do DNA ribossomal²⁶.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência das leveduras *Saccharomycopsis schoenii* e *S. crataegensis* na produção de aflatoxinas B₁ e G₁ por uma cepa toxigênica de *Aspergillus parasiticus*, em amendoim *in natura* e previamente autoclavado.

MATERIAL E MÉTODOS

Espécies de leveduras

As leveduras estudadas neste trabalho foram a *Saccharomycopsis schoenii* UWO (PS) 80-91 isolada de seiva de avelã (*Quercus* sp) e a *S. crataegensis* UFMG-DC 19-2 isolada de fruto de palmeira na Estação Ecológica da Universidade Federal de Minas Gerais. Encontram-se depositadas na coleção de cultura de leveduras tropicais do Laboratório de Ecologia e

Biotecnologia de Leveduras (Instituto de Ciências Biológicas - UFMG).

Isolado fúngico

O fungo a ser controlado foi a cepa de *A. parasiticus* IMI 242695 (International Mycological Institute, Inglaterra) isolado de produtos alimentícios e produtor de aflatoxinas. Está depositado na coleção de cultura de fungos do Laboratório de Micologia da Fundação Ezequiel Dias.

Amendoim

Utilizaram-se neste trabalho aproximadamente 6 kg de grãos de amendoim, cultivar IAC Caiapó, cultivado no Instituto Agrônomo de Campinas (SP), safra 2005/2006.

Preparação dos inóculos

As leveduras preservadas em meio GYMP (glicose 1%, extrato de levedura 0,5%, extrato de malte 0,3% e fosfato monobásico de potássio 0,2%) foram repicadas para ágar Sabouraud (glicose 2%, peptona 1%, extrato de levedura 0,5% agar 1,5%) suplementado com cloranfenicol (100 mg.L⁻¹) e mantidas a 25°C por 4 dias. Em seguida foram novamente repicadas no mesmo meio para obtenção de biomassa e incubadas por 48 h a 25°C. Após este procedimento as células foram retiradas com o auxílio de uma alça bacteriológica e transferidas para tubos de ensaio contendo caldo GY (extrato de levedura 0,01%, glicose 1%)²⁷. A concentração celular foi estimada com uma Câmara de Neubauer e ajustada para 1,6 x 10⁸ células.mL⁻¹.

A. parasiticus foi crescido em placa com meio Czapek (nitrito de sódio 4%, cloreto de potássio 1%, sulfato de magnésio 1%, sulfato ferroso 0,02%, fosfato de potássio dibásico 2%, sacarose 3%, sulfato de zinco 1%, sulfato de cobre 0,5%, agar 2%) a 25°C por 7 dias. Seguiu-se inoculação para o meio GYEP (glicose 2%, extrato de levedura 0,3% e peptona 1%) e incubação a 25°C por 7 dias⁹. A suspensão de esporos foi preparada adicionando-se Tween 80 0,1% e a concentração foi determinada em Câmara de Neubauer e ajustada para 1,6 x 10⁶ esporos.mL⁻¹.

Inoculação

Grãos de amendoim (15g) *in natura* ou autoclavados a 120°C por 15 min foram inoculados com 2,5 mL da suspensão de *S. schoenii* e 2,5 mL da suspensão de esporos de *A. parasiticus*. A adição da suspensão de *A. parasiticus* foi realizada imediatamente após a inoculação da cultura de levedura (experimento 1) e após 3h da inoculação da mesma (experimento 2). Estas etapas foram realizadas com 5 repetições cada. O mesmo procedimento foi adotado com a linhagem de *S. crataegensis*.

Também foi incluído nas avaliações um grupo controle constituído somente da inoculação de suspensão de esporos de *A. parasiticus*, em grãos de amendoim *in natura* e autoclavados.

Extração e quantificação das aflatoxinas

A extração das aflatoxinas B₁ e G₁ e a purificação dos extratos foram feitas segundo o método descrito por Valente Soares e Rodriguez-Amaya²⁸. Posteriormente, as aflatoxinas foram separadas, identificadas e quantificadas por cromatografia em camada delgada (CCD), em placas de sílica gel 60G, 20 x 20 cm (Merck), sem indicador fluorescente, espessura de 0,25 mm, utilizando-se como fase móvel tolueno:acetato de etila:clorofórmio:ácido fórmico (70:50:50:20, v/v/v/v), recomendado por Gimeno²⁹. Os extratos das amostras foram ressuspensos em benzeno:acetona (98:2), em volumes que variavam de 100 a 1000µL. Para aplicação na placa de CCD foram utilizados volumes que variaram de 2 a 10µL. Para elaboração da curva de calibração das aflatoxinas foram utilizados volumes das soluções padrão de concentração conhecida (Sigma Chemicals Co, St. Louis, MO), sempre com um mínimo de 4 pontos. A quantificação das aflatoxinas foi feita por medidas das intensidades das fluorescências dos spots das amostras e de padrões, em Densitômetro Shimadzu, modelo CS9301PC, Japão, com lâmpada de xenônio, em leitura linear, com feixe 0,4 x 5,0 mm e alta sensibilidade de fluorescência. Os níveis de aflatoxinas nas amostras foram calculados a partir do cálculo das áreas dos picos das aflatoxinas referentes aos extratos das amostras e das soluções padrão de aflatoxinas.

Nestas condições de análise, Prado³⁰ verificou que os limites de detecção e quantificação para a aflatoxina B₁ foram 0,90µg.kg⁻¹ e 1,1µg.kg⁻¹ e para aflatoxina G₁ 1,0µg.kg⁻¹ e 1,2µg.kg⁻¹, respectivamente. Valores médios de recuperação e coeficientes de variação para aflatoxina B₁ foram 97,2% e 11,7% e para aflatoxina G₁ 99,8% e 15,0%, respectivamente.

Análise Estatística

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com cinco repetições e 10 tratamentos. Os tratamentos foram instalados em um esquema fatorial constituído por cinco formas de inoculação (1) Controle: somente o fungo; (2) Fungo + *S. schoenii* tempo 0; (3) Fungo + *S. schoenii* tempo T; (4) Fungo + *S. crataegensis* tempo 0; (5) *S. crataegensis* tempo T e em dois tipos de amostra: *in natura* e autoclavada. Os resultados obtidos de aflatoxina B₁ e G₁ sofreram transformações logarítmicas, uma vez que foi observada instabilidade da resposta, isto é, aumento da proporcionalidade entre as médias dos grupos experimentais e seus respectivos desvios padrões, configurando a não conformidade com os pré-requisitos exigidos para a análise de variância. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e comparação das médias pelo teste de Tuckey (p<0,05)³¹.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observa-se que a produção das aflatoxinas B₁ e G₁ foi reduzida na presença das leveduras (Tabela 1).

Tabela 1. Médias de aflatoxinas B₁ e G₁ (µg.kg⁻¹) produzidas por *Aspergillus parasiticus* (Ap) IMI 242695 após inoculação de *Saccharomycopsis schoenii* (Sc) e *S. crataegensis* (Cr), em amendoim IAC Caiapó, *in natura* e autoclavado, em diferentes formas de inoculação.

Formas de inoculação	Aflatoxina B ₁ (µg.kg ⁻¹)*		Aflatoxina G ₁ (µg.kg ⁻¹)*	
	<i>In natura</i>	Autoclavado	<i>In natura</i>	Autoclavado
Controle (Ap)	1374 Cb	8483 Aa	2914 Cb	19861 Aa
Ap + Sc tempo 0	769 Bb (44%)	6469 Aa (23,9%)	1861 Cb (36,1%)	18387 ABa (7,4%)
Ap + Sc tempo T	205 Ab (89,3%)	5863 Aa (30,9%)	256 Ab (91,2%)	17442 ABa (12,2%)
Ap + Cr tempo 0	444 Bb (67,7%)	6238 Aa (26,5%)	697 Bb (76%)	10617 Aa (46,5%)
Ap + Cr tempo T	238 Ab (82,6%)	4566 Aa (46,2%)	199 Ab (93,2%)	8358 Ba (57,9%)

Tempo 0: Inoculação simultânea das suspensões do fungo filamentosos e levedura;

Tempo T: Inoculação da suspensão da levedura 3 h antes da suspensão do fungo filamentosos;

Na linha as médias seguidas pela mesma letra minúscula, e na coluna, pela mesma letra maiúscula, não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

* Média de 5 repetições

(%): Porcentagem de redução de aflatoxina

No tratamento que envolveu grãos de amendoim *in natura* a produção de aflatoxina B₁ e G₁ foi reduzida na presença de leveduras, independente do tempo de adição das suspensões do fungo filamentosos e das leveduras predadoras. Entretanto, a porcentagem de redução da concentração das aflatoxinas foi maior quando se adicionou a suspensão do fungo após 3h da suspensão das leveduras. A redução da concentração da aflatoxina B₁ atingiu 89,3% e 82,6%, na presença da *S. schoenii* e *S. crataegensis*, respectivamente. Os níveis da aflatoxina G₁ foram reduzidos em 91,2% na presença da *S. schoenii* e 93,2% quando da inoculação da *S. crataegensis*. No tratamento em que houve a autoclavação dos grãos de amendoim, antes do processo de inoculação das cepas dos fungos, observou-se também uma redução dos níveis de aflatoxinas. A maior redução ocorreu quando as suspensões das leveduras foram adicionadas após 3h antes da adição do fungo filamentosos. A redução da concentração da aflatoxina B₁ atingiu 30,9% e 46,2%, na presença de *S. schoenii* e *S. crataegensis*, respectivamente. Os níveis da aflatoxina G₁ foram reduzidos em 12,2% na presença de *S. schoenii* e 57,9% quando da inoculação da *S. crataegensis*. De uma forma geral, a *S. crataegensis* apresentou uma maior eficiência na redução dos níveis de aflatoxinas quando comparada à *S. schoenii*. Este fato pode ser interpretado como resultado de uma maior capacidade de permanência da *S. crataegensis* nos grãos de amendoim, em relação à *S. schoenii*.

A eficiência das leveduras predadoras foi maior nas amostras *in natura* quanto comparada com amostras autoclavadas. Estes resultados sugerem que a microbiota natural e/ou algum componente químico, destruídos ou modificados no processo de autoclavação dos grãos, podem influenciar o processo de competição entre o *A. parasiticus* e as leveduras

predadoras. Resultados semelhantes foram observados por Pimenta³² quando foi inoculado em amendoim, cultivar Tatu Vermelho, a *S. javanensis* e o *A. flavus* IMI 190443 produtor de aflatoxina B₁. O autor observou redução dos níveis de toxina na faixa de 56,7% a 73,5% e não foi detectada nenhuma alteração visível nos grãos de amendoim. Recentemente, Pimenta et al³³ avaliaram a capacidade da levedura *S. schoenii* UWO-PS 80-91, levedura utilizada neste trabalho, em controlar o crescimento dos fungos patogênicos *Penicillium expansum*, *P. italicum* e *P. digitatum* em laranjas. Os autores observaram que a *S. schoenii* reduziu a severidade da doença em laranjas inoculadas com todos os fitopatógenos testados.

O mecanismo de ação da levedura não foi esclarecido neste trabalho. Entretanto, sugere-se que a redução dos níveis de aflatoxinas pode ser devida a um desses mecanismos: (1) a levedura inibe a produção de aflatoxina por *A. parasiticus*; (2) a levedura degrada a toxina; (3) a levedura compete com o fungo filamentosos por espaço e nutrientes; (4) ocorre a penetração da levedura predadora no hospedeiro, através de estruturas denominadas “peg” de infecção e conseqüente diminuição da viabilidade do fungo filamentosos; (5) ocorre a adsorção da toxina pela parede celular da levedura.

Estudos prévios têm revelado a eficiência de alguns microrganismos em agirem como agentes de controle do crescimento e produção de aflatoxina por cepas toxigênicas.

Kusumaningtyas et al³⁴ observaram que *S. cerevisiae* inoculada em ração para frango e em presença de uma cepa toxigênica de *Aspergillus flavus*, foi capaz de reduzir a produção de aflatoxina B₁ (60,7%).

Diferentes isolados de leveduras do gênero *Kluyveromyces* revelaram atividade antagonista contra *A. flavus*

e *A. parasiticus* em meios de cultura, em diferentes atividades de água, após incubação durante sete dias a 25°C. As porcentagens de inibição do crescimento fúngico e produção de aflatoxina B₁ variaram de 75 a 100%¹⁴.

Três linhagens de *S. cerevisiae* foram capazes de degradar parcialmente, durante processo de fermentação alcoólica de mosto, ocratoxina A, toxina do *Aspergillus alutaceus* e *Penicillium expansum* e fumonisina B₁ e B₂, toxinas do *Fusarium verticillioides*, resultando em cerveja com menores níveis destas toxinas³⁵. Bejaouli et al.³⁶ observaram redução (45%) dos níveis de ocratoxina A em meios sintéticos e suco de uva na presença de diferentes linhagens de *S. cerevisiae*. A ausência de produtos de degradação sugere que adsorção e não um processo de metabolismo possa estar envolvido neste processo. A levedura *Pichia anomala* foi capaz de reduzir a deterioração por *Penicillium roquerfortii* (fungo filamentosso produtor de diferentes toxinas) em cereais úmidos contidos em sistema de armazenamento hermeticamente fechado. A linhagem de *P. anomala* JI 121 não cresce acima de 37°C e foi capaz de impedir o crescimento de fungos durante 14 meses de armazenamento de trigo, por meio de sua habilidade de consumir rapidamente o oxigênio e de sintetizar o acetato de etila, agente antifúngico³⁷⁻³⁸. A utilização de *Pichia ohmeri* e *S. cerevisiae* como possíveis agentes de controle biológico foi observado por Coelho et al.³⁹ em meio de cultura e suco de maçã. Os autores detectaram uma eliminação de 90% na concentração de patulina, toxina normalmente encontrada em maçã e produzida por *P. expansum*.

Apesar de se mostrar promissor, o controle biológico do acúmulo de aflatoxinas e outras toxinas em alimentos necessita de trabalhos suplementares para sua implantação. Além do efeito inibitório, alguns aspectos devem ser avaliados, como: (1) habilidade do organismo ser adequadamente formulado, ou seja, se o microrganismo permanece viável após formulação; (2) realização de testes de toxicidade; (3) identificação dos mecanismos de ação; (4) impacto ao meio ambiente. O fato de as leveduras predadoras serem encontradas em ambientes naturais aonde se deseja realizar o controle biológico fazem destes microrganismos um agente em potencial.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos revelaram que as duas espécies de leveduras estudadas, a *Saccharomyces schoenii* e a *S. crataegensis* foram capazes de controlar a produção de aflatoxinas pelo *Aspergillus parasiticus*. A redução da formação de aflatoxinas foi mais significativa quando as leveduras foram inoculadas nos grãos de amendoim antes do fungo filamentosso.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) o apoio financeiro para

o desenvolvimento da pesquisa – CBB 1375/05 e a bolsa de Iniciação Científica Institucional para Robson de Assis Souza. Os autores também agradecem o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

REFERÊNCIAS

1. Atroshi F, Rizzo A, Westermarck T, Ali-vehmas T. Antioxidant nutrients and mycotoxins. *Toxicol.*2002; 180 (2): 151-67.
2. Yu J, Bhatnagar D, Ehrlich KC. Aflatoxin biosynthesis. *Rev Iberoamer Micol.*2002; 19: 191-200.
3. Council for Agricultural Science and Technology - CAST. Mycotoxins: economics and health risks. Ames, Iowa: Council for Agricultural Science and Technology, 2003; Task Force Report 139.
4. Sylos CM, Amaya-Farfan J. Aflatoxin destruction during heat processing of contaminated peanuts. A reevaluation. *Boletim Soc Bras Ciênc Tecnol Aliment.*1992; 26(2): 89-96.
5. Prado G, Oliveira MS. Efeito do forno de microondas na destruição de aflatoxinas em amendoim. *Rev Inst Adolfo Lutz.*1996;56(2):21-4.
6. Rustom IYS. Aflatoxin in food and feed: occurrence, legislation and inactivation by physical methods. *Food Control.*1997;59(1):57-67.
7. Santurio JM. Experiência brasileira no uso de adsorventes para aflatoxinas. In: Scussel VM. Editor. Atualidades em micotoxinas e armazenagem de grãos. Florianópolis, 2000.
8. Galvez FCF, Francisco MLDL, Villarino BJ, Lustre AO, Resurreccion AVA. Manual sorting to eliminate aflatoxin from peanuts. *J Food Prot.* 2003;66(10):1879-84.
9. Prado G, Carvalho EP, Oliveira MS, Gazzinelli JECM, Moraes VAD, Corrêa RF, Cardoso VN, Soares TV. Influência da irradiação gama na produção de aflatoxina B₁ e no crescimento de cepa toxigênica de *Aspergillus flavus* em amendoim (*Arachis hypogaea* L.). *Rev Inst Adolfo Lutz.*2005;64(1):85-90.
10. Spadaro D, Gullino ML. State of the art and future prospects of the biological control of postharvest fruit diseases. *Int J Food Microbiol.*2004;91:185-94.
11. Faraj MK, Smith JE, Harran G. Aflatoxin biodegradation: effects of temperature and microbes. *Mycol Res.*1993; 97(11):1388-92.
12. Paster N, Droby S, Chalutz E, Menasherov M, Nitzan R, Wilson CL. Evaluation of the potential of the yeast *Pichia guilliermondii* as a biocontrol agent against *Aspergillus flavus* and fungi of stored soya beans. *Mycol Res.*1993; 97(10):1201-6.
13. Shantha T. Fungal degradation of aflatoxin B₁. *Natural Tox.*1999;7:175-8.
14. Penna M, Nesci A, Etcheverry M. *In vitro* studies on the potential for biological control on *Aspergillus* section Flavi by *Kluyveromyces* spp. *Lett Appl Microbiol.*2004;38:257-64.
15. Bueno DJ, Silva JO, Oliver G, Gonzalez SN. *Lactobacillus casei* CRL 431 and *Lactobacillus rhamnosus* CRL 1224 as biological controls for *Aspergillus flavus* strains. *J Food Prot.*2006; 69(10):2544-8.
16. Janisiewicz WJ, Korsten L. Biological control of postharvest diseases of fruits. *Annu Rev Phytopathol.*2002;40:411-41.
17. Cartwright DK, Spurr Jr HW. Biological control of *Phytophthora parasitica* var. *nicotiane* on tobacco seedlings with non pathogenic binucleate *Rhizoctonia* fungi. *Soil Biol Biochem.*1998;30:1879-84.
18. Droby S, Lischinski S, Cohen L, Weiss V, Daus A, Chandgoyal T, Eckert JW, Manulis S. Characterization of an epiphytic yeast population of grapefruit capable of suppression of green mold decay caused by *Penicillium digitatum*. *Biol Control.*1999;16:27-34.
19. Janisiewicz WJ, Tworowski TJ, Kurtzman CP. Biocontrol potential of *Metchnikowia pulcherrima* strains against blue mold of apple. *Biol Control.*2001;91:1098-108.
20. Jijakli MH, Lepoivre P. Characterization of an exo-2,1,3 glucanase produced by *Pichia anomala* strain K, antagonist of *Botrytis cinerea* on apples. *Phytopathology.*1998;88:335-43.

21. Masih EI, Alie I, Paul B. Can the grey mould disease of the grape vine be controlled by yeasts? *FEMS Microbiol Lett.*2000;189:233-7.
22. Masih EI, Slezack-Deschaumes S, Marmaras I, Ait-Barka E, Vernet G, Charpentier C, Adholeya A, Paul B. Characterization of the yeast *Pichia membranifaciens* and its possible use in the biological control of *Botrytis cinerea*, causing the grey mould disease of grapevine. *FEMS Microbiol Lett.*2001;202:227-32.
23. Wilson CL, Wisniewski ME, Biles CL, McLaughlin R, Chalutz E, Drobny S. Biological control of postharvest diseases of fruits: alternatives to synthetic fungicides. *Crop Prot.*1991; 10: 172-7.
24. Kreger-van Rij NJW, Veenhuis M. Electron microscopy of some special cell contacts in yeasts. *J Bacteriol.*1973;113:350-6.
25. Lachance MA, Pang WM. Predacious yeasts. *Yeast.*1997;13: 225-32.
26. Lachance MA, Pupovac-Velikonja A, Natarajan S, Schlag-Edler B. Nutrition and phylogeny of predacious yeasts. *Can J Microbiol.*2000;46:495-505.
27. Pimenta RS. Utilização de leveduras predadoras como agentes de controle biológico de doenças pós-colheita [Tese de doutorado]. Belo Horizonte, Minas Gerais: Universidade Federal de Minas Gerais, 2004. 130p.
28. Valente Soares LM, Rodriguez-Amaya DB. Survey of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone and sterigmatocystin in some Brazilian foods by using multi-toxin thin-layer chromatographic method. *J Assoc Off Anal Chem.*1989;72(1): 22-5.
29. Gimeno A. Thin layer chromatographic determination of aflatoxins, ochratoxins, sterigmatocystin, zearalenone, citrinin, T-2 toxin, diacetoxyscirpenol, penicillic acid, patulin and penitrem A. *J Assoc Off Anal Chem.*1979;62:579-85.
30. Prado G. Influência da irradiação gama (⁶⁰Co) na microbiota fúngica e na aflatoxina B₁ em amendoim (*Arachis hypogaea* L.). [Tese de doutorado]. Lavras, Minas Gerais: Universidade Federal de Lavras, 2005. 186p.
31. Ferreira DF. Sistema de análise estatística – SISVAR. Versão 5.0 Lavras: DEX/UFLA, 2000.
32. Pimenta RS. Utilização de leveduras predadoras como agentes de controle biológico de fungos filamentosos causadores de doenças pós-colheita. [Tese de doutorado]. Instituto de Ciências Biológicas. Belo Horizonte, Minas Gerais: Universidade Federal de Minas Gerais, 2004. 108p.
33. Pimenta RS, Silva FLS, Silva JFM, Morais PB, Braga DT, Rosa CA, Correa Junior A. Biological control of *Penicillium italicum*, *P. digitatum* e *P. expansum* by the predacious yeast *Saccharomycopsis schoenii* on oranges. *Braz J Microbiol.*2008;39:85-90.
34. Kusumaningtyas E, Widiastuti R, Maryam R. Reduction of aflatoxin B₁ in chicken feed by using *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhizopus oligosporus* and their combination. *Mycopath.*2006;162:307-11.
35. Scott PM, Kanhere SR, Lawrence GA, Daley EF, Farber JM.. Fermentation of wort containing added ochratoxin A and fumonisins B₁ and B₂. *Food Addit Contam.*1995; 12(1):31-40.
36. Bejaoui H, Mathieu F, Taillandier P, Lebrihi A. Ochratoxin A removal in synthetic and natural grape juices by selected oenological *Saccharomyces* strains. *J Appl Microbiol.*2004; 97:1038-44.
37. Druvefors UA. Yeast biocontrol of grain spoilage moulds. [Thesis – Doctoral] – University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden, 2004. 44p.
38. Petersson S, Schnürer J. *Pichia anomala* as a biocontrol agent of *Penicillium roqueforti* in high-moisture wheat, rye, barley and oats stored under airtight conditions. *Can J Microbiol.*1998;44(5):471-6.
39. Coelho AR, Celli MG, Ono EYS, Hoffmann FL, Pagnocca FC, Garcia S, Sabino M, Harada KI, Wosiacki G, Hirooka EY. Patulin biodegradation using *Pichia ohmeri* and *Saccharomyces cerevisiae*. *World Mycotoxin Journal*. No prelo 2008.

Avaliação das condições sanitárias e ambientais da sub-bacia do córrego Barbosa no município de Marília/SP

Assessment of sanitary and environment conditions of the Barbosa stream basin in Marilia municipality, SP/Brazil

RIALA6/1173

Armando CASTELLO BRANCO JR.*, Carina ANDRADE, Felipe Navarro IZIQUE, Roberta LAUER, Willian Tavares MOREIRA

* Endereço para correspondência: rua Julio Albertoni, 141, Marília, SP/ Brasil. CEP 17.514-090, e-mail: acastbr@flash.tv.br. Faculdade de Ciências da Saúde/ Universidade de Marília, UNIMAR, Marília, SP/Brasil.

Recebido: 11/09/2008 – Aceito para publicação: 11/11/2008

RESUMO

Foi avaliada e monitorada a qualidade da água da sub-bacia do córrego Barbosa, afluente do rio do peixe no município de Marília-SP, no centro-oeste paulista. Foram demarcadas sete estações de coleta ao longo dos mananciais que formam a sub-bacia (córrego das Clínicas, Água do Bonfim e Barbosa). As coletas de amostras de água foram feitas mensalmente no período de março a outubro de 2007, nas quais foram realizadas análises físico-químicas e biológicas (microbiológica e parasitológica). Os aspectos físico-químicos avaliados foram temperatura, oxigênio dissolvido, dureza, amônia, cloro, ferro, fosfato, pH, turbidez e cloreto, foram feitos em campo com o uso de *kits* de reagentes de ensaio colorimétrico. Para efetuar a análise microbiológica e parasitológica da água foram empregados respectivamente os protocolos da Portaria MS nº 518 e do Ministério da Saúde do Brasil (2004). As características físico-químicas e biológicas da água da sub-bacia do córrego de Barbosa mostraram-se fora dos limites estabelecidos para córrego Classe II, de acordo com a Resolução CONAMA nº 357/ 2005. Esses achados indicam o não atendimento às condições de qualidade previstas em lei e, ainda, a possibilidade de causar risco a saúde do homem e na preservação das comunidades aquáticas.

Palavras-chave. qualidade de água, bacia hidrográfica, recursos hídricos, poluição.

ABSTRACT

The water quality of Barbosa stream basin situated in Marília region was evaluated and monitored according to environmental legislation. The water quality was assessed by means of physical, chemical and biological analysis. Seven samples stations were settled along the Barbosa stream basin, and water samples were monthly collected from March to October, 2007. The evaluated physical-chemical characteristics were water temperature, dissolved oxygen, pH, turbidity, ammonium, total phosphate, chloride, iron, water hardness and chlorine. Physical and chemical analyses were performed on a field condition using colorimetric assay kit. Microbiological and parasitic analyses were carried out in a regular laboratory, following 518/2004 Health Governmental Decree and Brazilian Health Ministry (2004) protocols, respectively. The water quality from Barbosa stream basin showed to be out of legal limits established for Class II water stream according to 357/ 2005 CONAMA Resolution. These findings indicate that the water from Barbosa stream basin may cause human health harm and even to the freshwater and aquatic communities preservation.

Key words. water quality, water resources, pollution.

INTRODUÇÃO

Considerando-se a pequena porcentagem de água doce disponível para uso no nosso planeta e sua crescente demanda para diversos fins, verifica-se a necessidade urgente de estudos que contribuam para a política de gestão destes recursos hídricos em nosso estado¹. Apesar da aparente fartura de recursos hídricos, já há bacias hídricas que ultrapassam seu ponto de saturação de uso no estado de São Paulo².

Além de estar cada vez mais escassa em algumas regiões do país, a água está se convertendo em um elemento que não pode ser usado para a maioria dos usos humanos devido à contaminação causada pelo lançamento de efluentes domiciliares, industriais e hospitalares *in natura* nos corpos d'água. O município de Marília, no centro-oeste do estado de São Paulo, é um dos muitos locais onde tal situação ainda ocorre.

A sub-bacia do córrego Barbosa é o principal afluente do rio do Peixe (21ª UGRHI) antes da captação de água para o município de Marília. Esta sub-bacia recebe aproximadamente 40% do esgoto municipal lançado *in natura* em suas águas apesar de haver uma densa legislação normativa. Verifica-se que esta sub-bacia se encontra em estado de destruição e desaparecimento eminente pelo desenvolvimento desordenado da cidade evidenciado pela ocupação inadequada do solo e urbanização das cabeceiras dos mananciais que alimentam este e outros córregos. O uso e a ocupação das terras ao redor desta sub-bacia são tipicamente para agricultura e pecuária restando fragmentos de mata ciliar ao longo dos cursos d'água.

O presente estudo tem por objetivos avaliar e monitorar a qualidade físico-química e biológica da água da sub-bacia do córrego Barbosa, afluente do rio do Peixe, município de Marília-SP, e a investigação quanto ao seu enquadramento perante a legislação ambiental vigente no Estado de São Paulo.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado na sub-bacia do Córrego Barbosa localizada na região do alto rio do Peixe no Estado de São Paulo, pertencendo à periferia do município de Marília-SP (Figura 1), entre as latitudes 22°13' e 22°20' S e longitudes 49°55' e 50°01' O, possuindo uma área de aproximadamente 135km² e altitudes que variam de 400 a 500m em relação ao nível do mar.

Para a análise da qualidade da água foi feito o mapeamento da área da sub-bacia e a demarcação de 7 estações de coleta de água ao longo dos três principais mananciais que compõem a sub-bacia, a saber: córrego das Clínicas, córrego Água do Bonfim e córrego Barbosa (Figura 2).

Foram demarcadas duas estações de coleta no córrego Água do Bonfim, respectivamente após trecho de córrego de cerca de 500m e 1.120m da encosta à montante. O primeiro ponto ocorreu em área parcialmente coberta por vegetação ripária enquanto o segundo ficava em área totalmente descoberta de vegetação. Foi demarcada apenas uma estação de coleta no córrego das Clínicas após trecho de cerca de 2km de extensão desde a encosta da nascente. O último e maior manancial, o córrego Barbosa, é formado pela junção das águas dos córregos Água do Bonfim e das Clínicas. Assim, foram demarcadas quatro estações de coleta no córrego Barbosa, respectivamente, após trechos de cerca de 50m, 800m,

1.700m e 3.400m após seu início (junção das águas dos córregos anteriores). As estações de coleta número 1, 2 e 3 do córrego Barbosa foram demarcadas em áreas sem qualquer vegetação ripária enquanto na estação número 4 havia uma vegetação em fase inicial de sucessão (Figura 2).

As amostragens foram realizadas mensalmente durante o período de março a outubro de 2007 compreendendo as estações do outono à primavera, sempre no período matutino entre 8h e 12h, totalizando 7 amostragens mensais, uma em cada ponto, sempre todas feitas no mesmo dia. As amostras foram retiradas no centro de cada seção, na zona sub-superficial de maior correnteza, direcionando-se a boca do frasco coletor contra a correnteza³. No total, foram feitas 56 amostragens ao longo do período do estudo para cada parâmetro físico-químico e biológico.

As análises físico-químicas foram feitas sempre à campo com o auxílio de kit Alphakit® para determinação de 10 parâmetros físico-químicos avaliados: temperatura, oxigênio dissolvido (OD), dureza, amônia, cloro, ferro, fosfato, pH, turbidez e cloreto. A temperatura e a turbidez foram medidas diretamente no corpo d'água com termômetro portátil e disco de Secchi enquanto as demais análises foram baseadas em critérios colorimétricos por ocasião das coletas de água.

A análise biológica da água foi feita tanto em termos microbiológicos como parasitológicos seguindo-se os protocolos definidos pelo Ministério da Saúde do Brasil⁴ e Portaria nº 518/2004 do Ministério da Saúde do Brasil⁵.

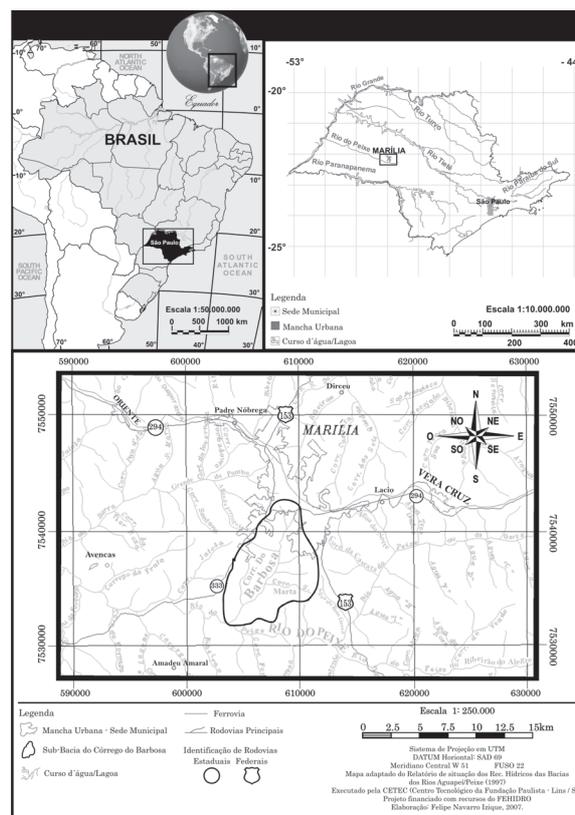


Figura 1. Localização da Sub-Bacia do Córrego do Barbosa, município de Marília - SP.



Figura 2. Visão aérea da área de estudo da sub-bacia do córrego Barbosa apresentando relevo em “cuestas” e pontos de amostragem de água. A. Bonfim: córrego Água do Bonfim; Clínicas: córrego das Clínicas; Barbosa: córrego Barbosa. Google Earth, aquisição em novembro de 2008.

Em cada ponto de amostragem foi calculada a vazão do córrego pelo método do flutuador. Dados relativos à pluviosidade mensal no município foram colhidos junto à Casa da Agricultura do município de Marília - SP.

Análise de correlação entre os resultados de alguns parâmetros físico-químicos (fosfato, ferro e OD) e as vazões mensais de cada manancial da sub-bacia foi feita pelo software NCSS 2007®.

RESULTADOS

A Tabela 1 apresenta os resultados relativos às análises físico-químicas e microbiológicas da água da sub-bacia do córrego Barbosa durante todo o período de estudo.

A análise parasitológica da água revelou total ausência de cistos de protozoários patogênicos ao homem. No entanto, revelou a presença de grande quantidade de larvas do nematódeo *Strongyloides* sp., agente causador da Estrongiloidose em diversos mamíferos, inclusive no homem. Outras formas infectantes de helmintos nunca foram evidenciadas nas amostras.

A Figura 3 apresenta os dados relativos à pluviosidade no município de Marília e a vazão média da sub-bacia do córrego Barbosa durante o período do estudo.

As vazões médias dos córregos Água do Bomfim, das Clínicas e Barbosa foram, respectivamente, de 26,8L/s; 94,3L/s e 150,3L/s durante o período de estudo. O córrego Água do Bonfim apresentou valores mínimo e máximo de vazão de 13,0 e 59,0L/s enquanto o córrego das Clínicas variou de vazão mínima de 21 L/s até o máximo de 127L/s. O córrego Barbosa, o maior de todos, apresentou vazão mínima de 111,0L/s e máxima de 197,0L/s.

DISCUSSÃO

Não apenas as águas da sub-bacia do córrego Barbosa, mas toda a bacia do rio do Peixe (UGRHI 21) é classificada como pertencendo à classe 2. As águas da classe 2 podem ser utilizadas para abastecimento doméstico após tratamento convencional; irrigação, sem nenhuma restrição, exceto quando a cultura for de hortaliças, devendo assim, passar por tratamento e; dessedentação de animais sem nenhuma restrição^{6,7}. Assim, os parâmetros para qualidade da água classe 2 são definidos na forma de lei tanto na esfera federal⁶ como estadual⁷.

Quanto ao parâmetro Ferro dissolvido temos que, segundo a Resolução CONAMA nº357/ 2005⁶, o limite é de 0,3mg/L Fe. De acordo com a Tabela 1, verifica-se que os três mananciais, Córrego das Clínicas, Córrego Água do Bonfim e Córrego Barbosa, apresentaram-se em discordância quanto a este parâmetro. Na realidade, as análises revelaram que o parâmetro Ferro estava fora dos padrões em 17,0% (n=8); 25,0% (n=16) e 60,0% (n=32) das amostras realizadas, respectivamente aos córregos. O ferro confere à água sabor adstringente e coloração avermelhada, decorrente de sua precipitação. Apesar de não representar risco sanitário mesmo sendo ingerida com teores de ferro acima do padrão, percebe-se que as águas ferruginosas mancham roupas e aparelhos sanitários além do ferro poder ficar depositado em tubulações. O ferro, em concentrações elevadas, também tem conseqüências no processo de tratamento da água servida à população interferindo na disponibilidade de cloro e entrando no sistema de distribuição de água adiante^{8,9,10}.

É interessante salientar que a concentração de ferro ao longo do córrego Água do Bonfim permaneceu a mesma ou reduziu ao longo de seu trajeto considerando-se a amostragem

no ponto 1 e no ponto 2, distantes cerca de 600m, sugerindo não haver outras fontes de descarga ao longo do córrego. No entanto, ao longo do córrego Barbosa, do trecho entre os pontos de coleta 1 e 4, distantes cerca de 3.350m, verificou-se um aumento da concentração de ferro indicando haver fontes de descarga ao longo de seu curso. Esta fonte pode ser o próprio solo uma vez que a região é caracterizada pelo solo do tipo podzolizado, ou seja, rico em ferro.

Embora o parâmetro ferro não seja contemplado explicitamente no Decreto SP nº 8468/76⁷, há citação quanto à obrigatoriedade de ausência de substâncias que comuniquem gosto ou odor. Assim, também há desacordo com tal legislação neste parâmetro.

Quanto ao parâmetro fósforo (fosfato) dissolvido temos que, segundo a Resolução CONAMA nº357/ 2005⁶, o limite para ambientes lóticos é de 0,1mg/L. De acordo com a Tabela 1, verifica-se que os três mananciais sempre se apresentaram acima deste limite em todas as amostragens. No mínimo, o limite estava ultrapassado em 7,5 vezes chegando ao valor máximo igual a 25 vezes maior que o limite definido por lei. A presença elevada de fósforo pode ser explicada pela descarga de efluentes, especialmente domésticos, principalmente na forma de detergentes^{9,11}. Estes detergentes quando incorporados à água também causam sabor desagradável além da formação de espumas em águas sob agitação. Este quadro de formação de espuma sempre foi verificado em quaisquer pontos dos mananciais onde havia quedas d'água.

Embora o fósforo seja um elemento fundamental para o metabolismo dos seres vivos, tais como, armazenamento de energia (ATP) e a estruturação da membrana plasmática (fosfolídeos)¹², concentrações elevadas de fosfato tornam-se tóxicas^{9,13}.

Além do fósforo incorporado pelos efluentes deve ser levada em consideração a incorporação tanto aérea como pela lixiviação do solo uma vez que a região do estudo é eminentemente agro-pastoril e assim, a participação de defensivos agrícolas e da pecuária é potencialmente grande. Salienta-se que a mata ciliar quase inexistente nesta bacia colaborando para a fácil incorporação de material via lixiviação^{9,13,14,15}.

A análise da concentração de fosfato ao longo dos córregos Água do Bonfim e Barbosa, cursos onde havia mais de um ponto de coleta, revelou dinâmicas diferentes. Enquanto no córrego Água do Bonfim percebeu-se a manutenção das concentrações de fosfato ou mesmo a sua redução entre um ponto de amostragem e outro, distantes cerca de 600m; no córrego Barbosa verificou-se geralmente um aumento em sua concentração entre os pontos de amostragem 1 e 4, distantes cerca de 3.350m. Estes resultados evidenciam que, no primeiro caso, não haveria outras fontes de descarga e, à princípio, os fragmentos de mata ciliar poderiam estar evitando a lixiviação de fosfato de origem agro-pastoril para o curso d'água. Tal situação não estaria acontecendo no segundo caso, córrego Barbosa, onde o curso d'água corta uma região de pastagem e monoculturas, quase sem a presença de matas ciliares. Desta forma, a incorporação de fosfato de origem agro-pastoril poderia estar se processando com facilidade conforme já verificado por outros autores^{9,13,14,15}.

A grande quantidade de fosfato pode ser considerada como fator desencadeador do processo de eutrofização destas águas¹⁴ tanto quanto o nitrato e assim, provocam o crescimento acelerado de algas que também conferem odor e gosto desagradáveis^{9,13} além de contribuir para a redução dos teores de OD¹⁶.

Verifica-se assim, que tanto a alta concentração de fosfato como a de ferro podem causar odores^{9,13,17,18}. Odor desagradável foi verificado em todos os cursos d'água estudados, especialmente no córrego das Clínicas. Salienta-se que, de acordo com a legislação vigente, águas enquadradas como classe 2 não podem apresentar odor desagradável^{6,7}.

Quanto ao parâmetro temperatura da água, verificou-se uma amplitude de 17°C variando de 15°C até 32°C acompanhando a variação da temperatura ambiente que oscilou entre 18°C e 35°C ao longo do período do estudo. A oscilação de temperatura verificada em todos os mananciais da sub-bacia apresentou-se bastante elevada. Tem-se que a principal variável que controla a temperatura da água de pequenos cursos é a radiação solar¹⁹. Assim, temos que na área em estudo, esta grande variação pode ser explicada tanto pela pequena quantidade de material suspenso na massa líquida, representado pela turbidez (neste estudo, sempre dentro dos parâmetros normais da legislação), quanto pela falta de vegetação ripária promovendo o sombreamento de trechos dos córregos. Esta abordagem também foi corroborada por diversos autores^{16,19-21}. Considerando-se ainda que, organismos aquáticos geralmente têm amplitudes mais estreitas de tolerância à temperatura e que os limites superiores de temperatura são mais críticos, pois interferem na taxa de OD, considera-se que as altas temperaturas verificadas também colaborem para a ausência de vertebrados aquáticos além dos demais parâmetros físico-químicos já relatados, especialmente o OD^{14,17}.

De acordo com a Resolução CONAMA nº 357/2005⁶ e com o Decreto SP nº 8468/ 76⁷, o nível de OD mínimo permitido e compatível com a vida aeróbica em cursos d'água é de 5ppm (mg/L). De acordo com os dados da Tabela 1, verifica-se que as concentrações médias dos córregos das Clínicas e Barbosa estão abaixo deste limite. Na realidade, o córrego das Clínicas apresentou-se impróprio quanto ao parâmetro OD em 100% das análises realizadas (n=8) enquanto que o córrego Barbosa se apresentou em desacordo em 65,0% das amostras realizadas (n=32). Já o córrego Água do Bonfim apresentou 33,3% das análises (n=16) fora do limite de OD.

Vale salientar que em momento algum foi verificada a presença de vertebrados aquáticos com exceção de girinos e alevinos na região próxima à cabeceira do córrego Água do Bonfim. Além disto, temos que a descarga de efluente doméstico em cursos d'água aumenta a concentração de matéria orgânica e de nutrientes que podem afetar a produtividade do sistema, aumentando a matéria em suspensão e colaborando para a redução do OD^{17,22,23}. Como conseqüência, populações de organismos aquáticos podem sofrer alterações qualitativas e quantitativas¹⁴.

A análise das concentrações de OD nos córregos Água do Bonfim e Barbosa, cursos onde havia mais de um ponto de amostragem, permite a visualização de dinâmicas diferentes. No córrego Água do Bonfim sempre se verificou um aumento da concentração de OD entre os pontos de amostragem 1 e 2, revelando que a auto-depuração foi efetivando-se ao longo de seu curso dentro dos seus 1.200 m de extensão. No entanto, no córrego Barbosa, verificou-se a manutenção das concentrações de OD, em níveis abaixo do tolerado (5mg/L), indicando que devido a carga de matéria orgânica em oxidação a extensão de 3.350m, entre um ponto e outro, ainda não foi suficiente para a autodepuração do corpo d'água.

Tabela 01. Resultados verificados quanto aos parâmetros de qualidade de água nos pontos de coleta dos córregos da sub-bacia do Córrego Barbosa ao longo do período de março a outubro de 2007 e padrões de qualidade das águas segundo Resolução Conama nº 357/ 2005 e Decreto SP nº 8468/ 76.

Parâmetros (unid. medida)	Córrego	Concentração Mínima	Concentração Média	Concentração Máxima	s	PC	Conama 357 (classe2)	Decr. 8468 (classe 2)
OD (mg/L)	Clínicas	2,2	3,06	3,8	0,51	1		
	Água Bonfim	3,4	5,85	8,8	1,61	1/ 2	≥ 5,0	≥ 5,0
	Barbosa	2,4	4,47	6,0	0,96	1/ 2/ 3/ 4		
Fosfato (mg/L)	Clínicas	0,75	1,54	2,0	0,46	1		
	Água Bonfim	0,75	1,40	2,0	0,62	1/ 2	≤ 0,1	Nd
	Barbosa	0,75	1,45	2,5	0,47	1/ 2/ 3/ 4		
Ferro (mg/L)	Clínicas	0,25	0,33	0,5	0,13	1		
	Água Bonfim	0,2	0,40	1,0	0,30	1/ 2	≤ 0,3	Nd
	Barbosa	0,2	0,65	1,5	0,43	1/ 2/ 3/ 4		
Cloreto (mg/L)	Clínicas	40,0	48,0	60,0	9,38	1		
	Água Bonfim	25,0	37,75	50,0	7,31	1/ 2	≤ 250,0	Nd
	Barbosa	35,0	44,91	60,0	7,01	1/ 2/ 3/ 4		
pH	Clínicas	7,0	7,2	7,5	0,26	1		
	Água Bonfim	6,5	7,1	7,5	0,31	1/ 2	6,0 – 9,0	Nd
	Barbosa	6,5	7,25	8,0	0,38	1/ 2/ 3/ 4		
Amônia (mg/L)	Clínicas	> LL(1,5)	> LL(1,5)	> LL(1,5)	-	1		
	Água Bonfim	> LL(1,5)	> LL(1,5)	> LL(1,5)	-	1/ 2	≤ 3,7	≤ 0,5
	Barbosa	> LL(1,5)	> LL(1,5)	> LL(1,5)	-	1/ 2/ 3/ 4	(p/ pH≤7,5)	
Cloro (mg/L)	Clínicas	< LL(0,1)	< LL(0,1)	< LL(0,1)	-	1		
	Água Bonfim	< LL(0,1)	< LL(0,1)	< LL(0,1)	-	1/ 2	≤ 0,01	Nd
	Barbosa	< LL(0,1)	< LL(0,1)	< LL(0,1)	-	1/ 2/ 3/ 4		
Turbidez (unt)	Clínicas	48,0	50,0	52,0	1,41	1		
	Água Bonfim	45,0	50,4	57,0	2,84	1/ 2	≤ 100	nd
	Barbosa	45,0	50,4	61,0	3,86	1/ 2/ 3/ 4		
Temperatura água (°C)	Clínicas	17,0	23,3	29,0	4,08	1		
	Água Bonfim	15,0	21,8	25,0	3,81	1/ 2	nd	nd
	Barbosa	19,0	26,4	32,0	3,4	1/ 2/ 3/ 4		
Dureza (mg/L CaCO ₃)	Clínicas	120,0	138,3	150,0	12,11	1		
	Água Bonfim	125,0	143,3	190,0	17,62	1/ 2	nd	nd
	Barbosa	115,0	138,2	180,0	19,14	1/ 2/ 3/ 4		
Coliformes fecais (UFC)	Clínicas	16,0x10 ²	36,29x10 ⁴	10,0x10 ⁵	439,13	1		
	Água Bonfim	2x10 ¹	67,261x10 ⁵	42,0x10 ⁶	13.861,12	1/ 2	≤ 10 ³	≤ 10 ³ NMP
	Barbosa	5,0x10 ²	45,88x10 ⁵	60,0x10 ⁶	1.498,06	1/ 2/ 3/ 4		

PC=ponto de coleta; s=desvio padrão; OD=oxigênio dissolvido; nd= padrão não definido ; LL=limite de leitura do método colorimétrico utilizado(valor limite) ; UFC=unidades formadoras de colônia; Conama 357=padrão para qualidade de água/ Resolução Conama nº357/ 2005; Decr.8468=padrão para qualidade de água/ Decreto sp nº8468/76

Os parâmetros de amônia (nitrogênio amoniacal) e cloro residual total não puderam ser aferidos junto à legislação, pois a sensibilidade do método de campo não permitiu a leitura de valores superiores a 1,5ppm e inferiores a 0,1ppm, respectivamente. Problemas técnicos, à época, impediram a análise destes parâmetros por meio de outra metodologia.

O nitrato geralmente ocorre em baixos teores em águas superficiais. O seu consumo por meio das águas de abastecimento está associado a dois efeitos adversos à saúde: indução à metemoglobinemia, especialmente em crianças pequenas, e a formação potencial de nitrosaminas e nitrosaminas carcinogênicas²⁴.

Apesar da legislação vigente⁵ determinar o limite de 10mg/L de nitrato para fins de potabilidade de água, alguns autores²⁵ consideram que concentrações superiores a 3mg/L de nitrato já seriam indicativas de contaminação por atividades antropogênicas.

Outros autores^{10,16,26-30} estudando outros cursos d'água no estado de São Paulo submetidos à descarga urbana de efluentes também relataram concentrações elevadas dos nutrientes nitrogênio e fosfato além de baixos níveis de OD.

Apesar de alguns parâmetros de qualidade da água estarem fora dos limites definidos por lei, outros se apresentaram de acordo com a legislação como foi o caso da Turbidez, Cloreto e pH (Tabela 1).

A turbidez na água é causada pela matéria orgânica e inorgânica em suspensão²⁰. Os valores de turbidez nos 3 mananciais não revelaram oscilação ao longo do período de estudo. O limite de turbidez estabelecido pela legislação vigente

para corpos d'água classe 2 é de até 100 NTU^{6,7}, o que não foi excedido em nenhuma das amostras analisadas.

O teor de cloreto é advindo da dissolução de sais, podendo em altas concentrações, imprimir sabor salgado à água, podendo também indicar a presença de águas residuárias³¹. A análise das amostras revelou que este padrão foi sempre atendido estando sempre bem abaixo do limite de 250mg/L.

De acordo com a legislação vigente^{6,7}, o pH da água para classe 2 deve oscilar entre 6,0 e 9,0. Considerando que o pH das águas dos 3 mananciais em estudo oscilaram entre 6,5 e 8,0 temos estarem dentro dos padrões de qualidade legal das águas. Embora as águas naturais apresentem pH variando entre 5,0 e 9,0³², temos que um pH mais ácido seria resultante das concentrações de íons H⁺ originados da dissociação do ácido carbônico. Este ácido carbônico, nos corpos d'água, seria resultante da introdução de gás carbônico tanto pelas águas de chuva e ar atmosférico como também pela matéria orgânica tanto do solo como de origem antropogênica^{20,21}.

Quanto à dureza da água da sub-bacia estudada, temos que os valores médios obtidos a caracterizam como água dura. Apesar do sabor desagradável que conferem os íons de cálcio, magnésio e ferro, entre outros, temos que a água dura não confere problemas fisiológicos. No Brasil, o valor máximo permitido para padrão de potabilidade é de 500mgCaCO₃/L (Portaria MS nº 518/2004)⁵. Assim, considerando-se os valores mínimos e máximos encontrados na sub-bacia (115,0 e 190,0mg/L de CaCO₃, respectivamente) e as médias de

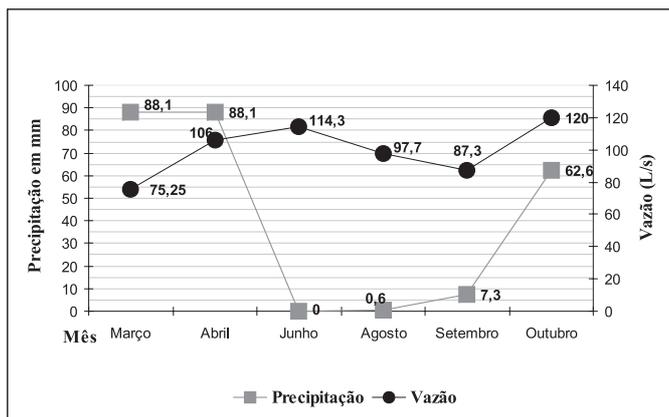


Figura 3. Valores referentes à pluviosidade do município de Marília* e vazão média da sub-bacia do córrego Barbosa, área de estudo, ao longo dos meses de março a outubro de 2007. (*Fonte: CATI – Casa da Agricultura de Marília – SP)

138,2 a 143,3mg/L de CaCO_3 de acordo com o manancial estudado, tem-se estarem dentro dos padrões de qualidade das águas.

A ocorrência de coliformes fecais em todas as amostras ao longo de todo o período de estudo confirma o alto grau de contaminação das águas da sub-bacia por efluente doméstico. A presença de coliformes fecais é vetada para a potabilidade da água⁵ sendo permitida até o limite de 10^3 ufc/100mL para águas de classe 2^{6,7}. Desta forma, considerando-se as médias verificadas nas águas da sub-bacia do córrego Barbosa percebe-se a classificação como impróprias tanto para o contato primário como para consumo^{6,7,33} tornando-se um grave risco para a saúde humana. Estes resultados corroboram os resultados obtidos para o rio do Peixe, corpo receptor da sub-bacia do córrego Barbosa, onde os valores de coliformes fecais também estiveram acima do permitido por lei ao longo do ano de 2007¹⁸.

Considerando-se a coleta de 78% dos esgotos produzidos em Marília, a inexistência de estações de tratamento de esgoto no município e o fato da sub-bacia do córrego Barbosa receber volume significativo de esgoto bruto (80 a 85 milhões de litros por dia) segundo estimativa do próprio Departamento de Águas e Esgoto de Marília (DAEM) era esperada a presença de coliformes fecais. Infelizmente esta é a realidade da grande maioria dos municípios do Brasil^{9,13,17,18}, inclusive em trabalhos recentes^{10,16,18,31}.

Considerando-se que o córrego Barbosa é formado pela junção das águas dos córregos Água do Bonfim e das Clínicas e que, estes dois córregos apresentaram coliformes fecais acima dos limites previstos por lei para os padrões de qualidade de classe 2 na maioria das amostragens, é esperado a potencialização de valores de coliformes fecais ao longo do córrego Barbosa. Ainda quanto ao córrego Barbosa, se considerarmos os valores de coliformes fecais do primeiro e último ponto de coleta por mês de amostragem (março: $1,2 \times 10^4$ e $1,1 \times 10^3$; abril: $1,2 \times 10^5$ e $1,2 \times 10^4$; junho = $6,0 \times 10^7$ e $2,0 \times 10^4$; agosto = $1,0 \times 10^4$ e $2,8 \times 10^3$; setembro = $1,0 \times 10^6$ e $2,0 \times 10^4$; outubro = incontáveis ufc e $3,0 \times 10^3$), verifica-se sempre a ocorrência de níveis superiores ao permitido por lei. Assim, apesar de haver uma diluição ao longo do córrego Barbosa quanto à carga de coliformes fecais, inferimos que a distância necessária para a autodepuração, ou seja, para atingir

os valores máximos permitidos por lei (10^3 ufc/100mL) é maior do que os 3.400m percorridos até a estação de coleta número 4 (último ponto do córrego Barbosa). Há casos relatados onde a distância necessária para a autodepuração é maior que a distância física do corpo d'água¹⁶.

Quanto à análise parasitológica da água, temos que, a ocorrência de larvas de *Strongyloides* sp. pode também indicar a contaminação da água por efluente doméstico, apesar de não terem sido evidenciadas quaisquer outras formas infectantes de protozoários ou helmintos, ou ser resultante da contaminação de fezes de gado uma vez que o contato de gado bovino com os cursos d'água foi freqüentemente presenciado nas ocasiões de coletas.

Embora a grande maioria dos parâmetros analisados confirme elevado grau de poluição orgânica na sub-bacia do Córrego Barbosa e esta sub-bacia ser a de maior contribuição para o rio do Peixe, as águas do rio do Peixe oscilaram, em 2007, de classificação péssima até boa quanto ao índice de qualidade de água bruta para fins de abastecimento público (IAP) e de ruim a boa quanto ao índice de qualidade de água para proteção da vida aquática (IVA)¹⁸. A média de IAP 2007 foi ruim enquanto o IVA médio de 2007 foi regular¹⁸. Tem-se ainda que de acordo com o Índice de Estado Trófico (IET) médio, para 2007, o rio do Peixe foi classificado como mesotrófico, ou seja, se encontra em estado moderado de trofia devido principalmente às concentrações médias de fosfato e nitrogênio¹⁸.

Considerando-se que as sub-bacias não são monitoradas nem pela CETESB nem pela prefeitura, percebe-se a necessidade de sua caracterização e monitoramento uma vez serem responsáveis por significativa contribuição tributária da poluição na bacia do rio do Peixe uma vez que o próprio Departamento de Águas e Esgoto de Marília (DAEM) estima que a sub-bacia do córrego Barbosa receba entre 80 e 85 milhões de litros de esgoto por dia, resultado de parcela significativa dos efluentes de uma população de mais de 218 mil habitantes³⁴.

O clima da região, segundo a classificação climática de Köppen, é do tipo Aw caracterizado por longa estiagem entre os meses de junho e setembro, fato comprovado verificando-se os valores da pluviosidade em cada mês para a região de Marília (Figura 3). Neste mesmo período, verifica-se a vazão média da sub-bacia variando muito pouco. Diante deste aspecto, pode-se inferir que, além do abastecimento pelo lençol freático estes mananciais recebiam quantidade relativamente constante de efluentes da cidade. Segundo dados do próprio Departamento de Água e Esgoto de Marília (DAEM), estima-se que esta sub-bacia receba entre 80 e 85 milhões de litros de esgoto por dia.

Considerando-se que a descarga de efluentes colabora sobremaneira para a vazão dos mananciais desta sub-bacia, pode-se supor que pequenos cursos d'água como o córrego Água do Bonfim, com vazão média de 26,8L/s oscilando de 13 a 59L/s, correm o risco de se tornarem temporários quando do futuro desvio do efluente de suas águas. Este aspecto deve ser levado em consideração na análise de impacto ambiental na área sendo ainda necessários, no entanto, estudos quanto à drenagem da sub-bacia.

A análise entre os parâmetros fosfato, ferro e OD (parâmetros em desacordo com a legislação) em relação à vazão de cada córrego não revelou correlação alguma em termos estatísticos sugerindo que estes resultados parecem refletir momentos de maior ou menor descarga aguda de efluentes nas águas da sub-bacia. Este tipo de resultado foi também relatado

em uma microbacia em Guairá/SP¹¹.

Considerando a extensão da área degradada e sua importância como contribuinte da bacia do rio do Peixe, estudos pormenorizados quanto à composição da possível fauna residente de invertebrados e vertebrados nesta sub-bacia além de estudos fitossociológicos dos fragmentos de mata ciliar, ainda existentes, precisam ser levados à termo para a correta proposição de projetos de recuperação desta área.

CONCLUSÕES

A análise dos resultados obtidos no presente trabalho permite as seguintes conclusões, a saber:

1. Considerando a classificação da sub-bacia do córrego Barbosa como Classe 2, diante da Resolução CONAMA nº 357/2005 e do Decreto SP nº 8468/1976, temos que análise dos parâmetros físico-químicos e biológicos revelou o não atendimento às condições de qualidade previstas em lei, havendo, inclusive risco à saúde do homem e à preservação das comunidades aquáticas em diversas ocasiões;
2. Os parâmetros físico-químicos e biológicos verificados em desacordo com a legislação indicam claramente alto grau de contaminação orgânica das águas da sub-bacia por efluente doméstico;
3. Há necessidade urgente do desvio dos efluentes que hoje são lançados nesta sub-bacia e seu encaminhamento para o correto destino em Estações de Tratamento de Esgoto. Estas ações implicam em redução dos custos para tratamento da água servida e em redução de ações de atenção à saúde como consultas, hospitalizações e medicação para o tratamento de pessoas afetadas diretamente ou indiretamente pela contaminação das águas da sub-bacia do córrego Barbosa.

REFERÊNCIAS

1. Tundisi JG. Água no Século XXI: Enfrentando a Escassez. 2ª ed. São Carlos: RiMa, IIE, 247 pp., 2005.
2. DAEE – Departamento de Águas e Energia Elétrica. Relatório de situação dos Recursos Hídricos do Estado de São Paulo; 2005.
3. CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Curso de coletas e preservação de amostras de água. São Paulo, 58 pp., 1996.
4. Ministério da Saúde do Brasil. Manual Prático de Análise de Água. 1ª ed. Brasília: Fundação Nacional de Saúde. 146 pp., 2004.
5. Ministério da Saúde do Brasil [MS]. Portaria nº 518, de 25 de março de 2004: estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Brasília (DF); Diário Oficial da União
6. Conselho Nacional de Meio Ambiente [CONAMA]. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005: dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Brasília (DF); Diário Oficial da União
7. Estado de São Paulo. Decreto Estadual nº 8468, de 8 de setembro de 1976: aprova o regulamento da lei nº 997, de 31 de maio de 1976, que dispõe sobre a prevenção e controle da poluição do meio ambiente. São Paulo (SP): Diário Oficial do Estado de São Paulo.
8. Freitas VPS, Brígido BM, Badolato MIC, Alaburda J. Padrão físico-químico da água de abastecimento público da região de Campinas. *Rev Inst Adolfo Lutz* 2002;61(1):51-8.
9. Nieto R. Tratamento de Efluentes Líquidos Industriais e Domésticos. São Paulo: CETESB, 57 pp., 2005.
10. Freitas MB, Brillante OM, Almeida LM. Importância da análise de água para a saúde pública em duas regiões do Estado do Rio de Janeiro: enfoque para coliformes fecais, nitrato e alumínio. *Cad Saúde pública*.2001;17(3):651-60.
11. Toledo LG, Nicoletta G. Índice de qualidade de água em microbacia sob uso agrícola e urbano. *Scientia Agrícola*.2002; 59(1):181-6.
12. Esteves FA. Fundamentos de Limnologia. Edit. Interciência, 602 pp, 1998.
13. Braga B, Hespanhol I, Conejo JGL, Barros MTL, Spencer M, Porto M, Nucci N, Juliano N, Eiger S. Introdução à Engenharia Ambiental, Ed. Pearson Prentice Hall,305 pp., 2004.
14. Odum EP, Barrett GW. Fundamentos de Ecologia. Editora Thomson Learning, 612 pp., 2007.
15. Parry R. Agriculture phosphorus and water quality: a U.S. Environmental Protection Agency perspective. *J environ qual*.1998;27(2):258-61
16. Sardinha DS, Conceição FT, Souza ADG, Silveira A, Julio M, Gonçalves JCSI. Avaliação da qualidade da água e autodepuração do ribeirão do meio, Leme (SP). *Eng sanit ambient*.2008; 13(3): 329-38.
17. Oliveira EM. Gestão Ambiental de Recursos Hídricos. São Paulo: CETESB, 78 pp., 2005.
18. CETESB. Relatório de qualidade das águas interiores no Estado de São Paulo. Série Relatórios, 537pp., 2008.
19. Arcova FCS, César SF, Cicco V. Qualidade da água e dinâmica de nutrientes em bacia hidrográfica recoberta por floresta de mata atlântica. *Revista do Instituto Florestal, São Paulo* 1993; 5(1): 1-20.
20. Branco SM. Hidrologia Aplicada à Engenharia Sanitária. 3. ed. São Paulo: CETESB/ ASCETESB, 616pp., 1986.
21. Bueno LF, Galbiatti JÁ, Borges MJ. Monitoramento de variáveis de qualidade da água do horto Ouro Verde – Conchal – SP. *Eng Agric, Jaboticabal* 2005; 25(3): 742-8.
22. Laws EA. Aquatic Pollution: an introductory text. 3th. Ed. John Wiley & Sons Inc., New York, 639 pp, 1999
23. Hall RI, Leavitt PR, Dixit AS, Smol JP. Effects of agriculture, urbanization and climate on water quality in the northern Great Plains. *Limnol Oceanogr*.1999; 44(3/2):739-56.
24. Bouchard DC, Williams MD, Surumpalli RY. Nitrate contamination of ground water sources and potential health effects. *J Am Water Works Assoc*.1992;84(2):85-90
25. Alaburda J, Nishihara L. Presença de compostos de nitrogênio em águas de poços. *Rev Saúde Pública*.1998;32(2):160-5.
26. Camargo AFM, Bini LM, Schiavetti A. Avaliação dos impactos provocados pelas descargas de esgotos orgânicos em alguns corpos d'água do município de Rio Claro. *Oecologia Brasiliensis*.1995; 1(1): 395-406.
27. Sanches AK, Camargo AFM. Efeitos da poluição orgânica em um ambiente de mangue da Ilha de Cananéia: Evidências à partir de variáveis físico-químicas e composição de zooplâncton. *Naturalia* 1995; 20(1): 125-133.
28. Henry-Silva GG, Camargo AFM. Impacto do lançamento de efluentes urbanos sobre ecossistemas aquáticos do município de Rio Claro-SP. *Ciências Biológicas e do Ambiente* 2000; 2(3): 317-30.
29. Fonseca HS, Salvador NNB. Estudo Integrado da qualidade das águas da bacia hidrográfica do rio Bonito em Descalvado-SP. *Rev Inst Adolfo Lutz* 2005;64(2):179-85.
30. Biudes JFV, Camargo AFM. Changes in Biomass, chemical composition and nutritive value of *Spartina alterniflora* due to organic pollution in the Itanhaém river basin (SP, Brazil). *Braz J Biol*. 2006; 66(3): 781-789.
31. Barcellos CM, Rocha M, Rodrigues LS, Costa CC, Oliveria PR, Silva IJ, Jesus EFM, Rolim RG. Avaliação da qualidade da água e percepção higiênico-sanitária na área rural de Lavras, Minas Gerais, Brasil, 1999-2000. *Cad Saúde Pública*.2006;22(9):1967-78.
32. Batalha BHL, Parlatore AC. Controle da qualidade de água para consumo humano: bases conceituais e operacionais. São Paulo: CETESB, 198 pp, 1993.
33. Conselho Nacional de Meio Ambiente [CONAMA]. Resolução nº 274, de 29 de novembro de 2000: dispõe sobre a sistemática de avaliação da qualidade ambiental das águas e dá outras providências. Brasília (DF); Diário Oficial da União.
34. IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2008: <http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1>

Análise dos constituintes de gema de ovo de avestruz desidratada por meio de duas metodologias de secagem

Ostrich egg yolk constituents analyses after drying procedures by means of two dehydration methodologies

RIALA6/1174

Jailane de Souza AQUINO^{1*}, João Andrade da SILVA², João Paulo PRADO³, José Marcelino de Oliveira CAVALHEIRO³

*Endereço para correspondência: Universidade Federal do Piauí, Campus Senador Helvídio Nunes de Barros, Departamento de Nutrição. R: Cícero Eduardo, s/n – Junco. 64.600.000. Picos, PI/Brasil, e-mail: lalaaquino@hotmail.com

¹Departamento de Nutrição, Universidade Federal do Piauí, UFPI.

²Departamento de Nutrição, Universidade Federal da Paraíba, UFPB, João Pessoa, PB/Brasil

³Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal da Paraíba, UFPB, João Pessoa, PB/Brasil

Recebido: 15/05/2008 – Aceito para publicação: 19/11/2008

RESUMO

As gemas de ovo de avestruz foram analisadas quanto às características de seus constituintes após serem desidratadas por meio de técnica de *spray-dryer* e pela metodologia de liofilização. As amostras foram desidratadas pela técnica de *spray-dryer* com vazão de ar comprimido de 30 L/ min, vazão da bomba de alimentação de 0,5 L/ h e sob a temperatura do ar de secagem de 125°C. Pela metodologia de liofilização, as amostras foram tratadas a temperatura de - 49 °C durante sete horas e sob pressão de 0,02955 mmHg. Após a desidratação, foi determinada a composição centesimal das amostras. O colesterol foi determinado por HPLC, em fase móvel, acetonitrila/isopropanol (80:20) à vazão de 1mL/min e em coluna Nova Pack C18 (15cm x 4,6cm x 5µm), em comprimento de onda de 210nm. O diâmetro das partículas do pó obtido foi avaliado em microscópio óptico. As médias de composição centesimal das gemas de ovo de avestruz desidratadas pelo método *spray-dryer* e por liofilização diferiram estatisticamente ($p < 0,05$). A gema liofilizada apresentou maior conteúdo lipídico, porém menor taxa de colesterol. As partículas liofilizadas mostraram-se irregulares, maiores e mais estáveis do que as atomizadas. O método de secagem por liofilização conservou o teor lipídico e protéico da gema de ovo de avestruz, bem como menor concentração de colesterol na amostra quando comparado à secagem por meio de *spray-dryer*.

Palavras chave. desidratação, liofilização, ovo de avestruz, *spray-drying*.

ABSTRACT

The dehydrated ostrich egg yolks were analyzed in order to assess their constituents after being dried by means of two dehydration methodologies, that is the spray-drying technology and the freeze-drying technique. The egg yolk samples were dehydrated by spray – dryer with compressed air flow at 30 L/min, feeding bomb flow at 0.5 L/ h, and drying air temperature at 125°C. In using the freeze-drying technology, the samples were processed at temperature of - 49 °C for seven hours under the pressure of 0.02955 mmHg. After being dehydration, the centesimal composition of dried samples was determined. Cholesterol contents were determined by HPLC, in movable phase, acetonitrile/izopropanol (80:20) at flow of 1mL/min, on Nova Pack column C18 (15.0cm x 4.6cm x 5.0µm), and wavelength at 210nm. The powder particles diameter sizes were achieved by optical microscopy. Statistically significant differences ($p < 0.05$) were found in comparing the averages of centesimal compositions of ostrich egg yolks dehydrated by spray-dryer and those dried by freeze drying technology. The freeze-dried egg yolk showed higher lipid contents, but lower cholesterol contents. The freeze-dried particles were irregular, larger and more stable than those atomized powders. By

means of freeze-drying technique, the retention of ostrich egg yolk lipid and protein contents was observed, although lower cholesterol quantity was detected when compared to those samples dehydrated by means of spray-drying technology.

Key words. dehydration, freeze-drying, ostrich egg, spray-drying.

INTRODUÇÃO

A maior concentração de lipídios nos ovos encontra-se na gema, dentre seus componentes podem-se citar as lipoproteínas, fosfolipídios, triacilgliceróis e colesterol^{1,2}. O ovo de avestruz possui sabor idêntico ao do ovo de galinha como também propriedades químicas e físicas semelhantes³. Em sua composição centesimal, este tipo de ovo contém de 47,7 a 48,2% de proteína, de 43,8 a 44,2% de gordura e de 5,2 a 5,5% de minerais em extrato seco⁴. Os ovos de avestruz inférteis (não incubável) já são utilizados na forma de ovoprodutos em padarias, pastelarias e indústrias de alimentos, uma vez que cada ovo pesa entre 1,3kg e 1,7kg⁵.

O termo ovoproduto refere-se aos ovos dos quais tenham sido removidos a casca para algum processamento, podendo apresentar-se na forma líquida, congelada ou desidratada⁶. O ovoproduto da gema pode ser usado em confeitaria, pastelaria, padaria, sorvetes, produtos lácteos, alimentos infantis, massas alimentícias, cremes e sopas, maionese e molhos⁷. Do número total dos ovos consumidos, mais de 30% estão na forma de produtos derivados do ovo⁸.

A desidratação é uma maneira bem sucedida de preservação dos ovos, sendo que outras vantagens são: ocupar menos espaço no estoque, facilidade de transporte, boa uniformidade, utilização mais fácil (produto pronto para o uso) e ter qualidade microbiológica estável^{9,10}. Os principais procedimentos usados na desidratação são a atomização e a liofilização¹¹.

Um dos métodos para produzir ovo em pó como gema, clara ou ovo integral é pelo processo denominado spray-drying, onde o produto é atomizado por uma corrente de ar quente em que uma enorme área de superfície é criada pela atomização, sendo a água evaporada rapidamente^{9,10}. Outro processo de desidratação bastante utilizado é a liofilização, onde a água contida no produto passa diretamente do estado sólido ao estado de vapor por sublimação, sob determinadas condições de temperatura e de pressão^{12,13}.

No presente estudo, objetivou-se comparar alguns constituintes de gemas de ovo de avestruz desidratadas por spray-dryer com as desidratadas por liofilização, em relação à composição centesimal, conteúdo de colesterol e morfologia das partículas, com intuito de aprimorar as técnicas para

obtenção de ovoprodutos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais

Os ovos utilizados neste experimento foram cedidos pela Coovestruz-PB (Cooperativa dos Criadores de Avestruz da Paraíba- Brasil), coletados utilizando-se luvas estéreis, acondicionados em sacos estéreis individuais e transportados para os laboratórios em isopor onde foram mantidos sob refrigeração por no máximo um dia, sendo portanto frescos. Os ovos apresentavam pesos diferentes, porém uma mesma quantidade de gema foi desidratada pelos dois métodos, aproximadamente 200g por sessão. As avestruzes receberam uma mesma ração e apresentavam idades entre dois e cinco anos, nesta faixa etária a postura de ovos inférteis por estas aves corresponde a 20-25%⁵. Foram destinadas três amostras de gema de ovo de avestruz à desidratação por spray-dryer e três à liofilização. Todas as variáveis foram analisadas em triplicata.

Desidratação

A desidratação por spray-dryer foi realizada no laboratório de armazenamento e processamento de produtos agrícolas pertencente à Unidade Acadêmica de Engenharia Agrícola da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG) e a desidratação por liofilização foi realizada no laboratório de análise de alimentos pertencente à Unidade Acadêmica de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). Realizaram-se três ensaios para a secagem da gema do ovo de avestruz tanto por liofilização como por spray-dryer. Inicialmente os ovos foram lavados com detergente clorado e água morna, a quebra foi manual realizada com auxílio de um instrumento tipo martelo.

As gemas foram separadas e imediatamente homogeneizadas em batedeira doméstica na velocidade um (681 rpm) por 20 segundos. E em seguida filtradas em tamis de plástico. Posteriormente, passaram pelo processo de fermentação com a finalidade de diminuir o conteúdo de glicose e evitar a reação de Maillard. Segundo a metodologia proposta por Martucci¹⁴ para cada 200g de gema de ovo de avestruz foram adicionados 1g de levedura comercial previamente misturada com uma parte da amostra, perfazendo a concentração de 0,5%. As amostras com 0,5% de levedura foram deixadas em banho-maria, à 32°C por 2 horas.

Após a fermentação, as amostras foram desidratadas

por atomização no secador mini “spray dryer” modelo MS 1.0 de fabricação da Labmaq do Brasil Ltda, com ar comprimido e sistema de atomização com bico atomizador duplo fluído e separador de pó do tipo ciclone. As condições de secagem foram: o bico de aspersão utilizado foi o de diâmetro de 0,7mm (bocal nº 1), com vazão de ar comprimido de 30L/ min, a vazão da bomba de alimentação de 0,5L/h, temperatura do ar de secagem de 125°C e a temperatura de saída de ar média de 70°C.

Na desidratação por liofilização as amostras foram dispostas em bandejas com espessura da lâmina de aproximadamente 6 cm e congeladas por contato direto com ambiente resfriado em freezer comercial a -18°C por 14 horas. Posteriormente, as bandejas foram imediatamente transferidas para o liofilizador modelo LS 3000 fabricado pela Terroni Ltda e desidratadas em temperatura de - 49 °C por 7 horas a uma pressão de 0,02955 mmHg. Após a secagem, as amostras foram reduzidas a pó em almofariz.

Ao final da desidratação, tanto as amostras recolhidas do spray-dryer como as recolhidas do liofilizador foram armazenadas em sacos de polietileno e codificadas. Estas amostras embaladas foram colocadas em isopor contendo sílica gel para evitar o ganho de umidade.

Determinação da composição centesimal

Cada parâmetro foi analisado em três repetições. As determinações de umidade, resíduo mineral fixo e proteína seguiram a metodologia proposta pela A.O.A.C¹⁵ e a determinação de lipídios totais seguiu a metodologia proposta por Folch et al.¹⁶. A determinação de carboidratos foi calculada por diferença, utilizando-se os índices obtidos pela análise de umidade, resíduo mineral fixo, proteínas e lipídios, segundo a metodologia preconizada pela A.O.A.C¹⁵.

Determinação do conteúdo de colesterol por HPLC

A Figura 1 apresenta o fluxograma do método utilizado para a determinação de colesterol das gemas desidratadas por spray-dryer e por liofilização. Os lipídios totais foram extraídos com clorofórmio: metanol (2:1) de acordo com Folch et al.¹⁶. O colesterol foi determinado por cromatografia líquida de alta eficiência por um método utilizado anteriormente para a mesma determinação em filés de camarão¹⁷. Inicialmente, procedeu-se a saponificação com 10mL de extrato clorofórmico homogeneizado com 10 mL de KOH 12% em metanol 90%. A fase móvel utilizada foi a mistura dos eluentes acetonitrila/ isopropanol (80/20). Houve então posterior secagem do material para ressuspensão da solução na fase móvel para o sistema de HPLC.

O equipamento de cromatografia líquida utilizado foi um Varian 2699 fabricado nos Estados Unidos, composto por bomba isocrática, com injetor manual Reody, com alça de amostragem de 20µl, acoplado a detector de arranjo de diodo (DAD). A coluna cromatográfica utilizada foi: C₁₈ (Chrompack-Varian, Inerstisil – 150 x 4,6mm 5ODS-2) com 5µm de diâmetro de partícula; vazão de 1,0mL; detector por conjunto de diodos

(VARIAN 330); e integrador processador (VARIAN 230). O espectro de absorbância utilizado para leitura das amostras foi de 210nm e o tempo de corrida cromatográfica foi de 20 minutos. Todos os solventes usados foram de grau cromatográfico, filtrados e desgaseificados em ultra-som antes do uso.

A identificação do pico de colesterol foi feita por comparação dos tempos de retenção do padrão e o da amostra, por co-cromatografia e espectros de absorbância. A quantificação foi realizada pelo método de padronização externa.

Determinação do diâmetro das partículas do pó

As lâminas foram montadas com uma pequena quantidade do produto que foi suavemente misturada a algumas gotas de óleo de silicone, em seguida colocou-se a lamínula para evitar a formação de bolhas. As lâminas permaneceram 24 horas na posição horizontal para estabilização¹⁸. A observação foi realizada em microscópio óptico trinocular, marca Taimin, utilizando filtro azul. As amostras liofilizadas foram observadas com objetiva 10 e as desidratadas por spray-dryer foram observadas com objetiva 40.

Análise estatística

Os testes estatísticos foram realizados com o auxílio do

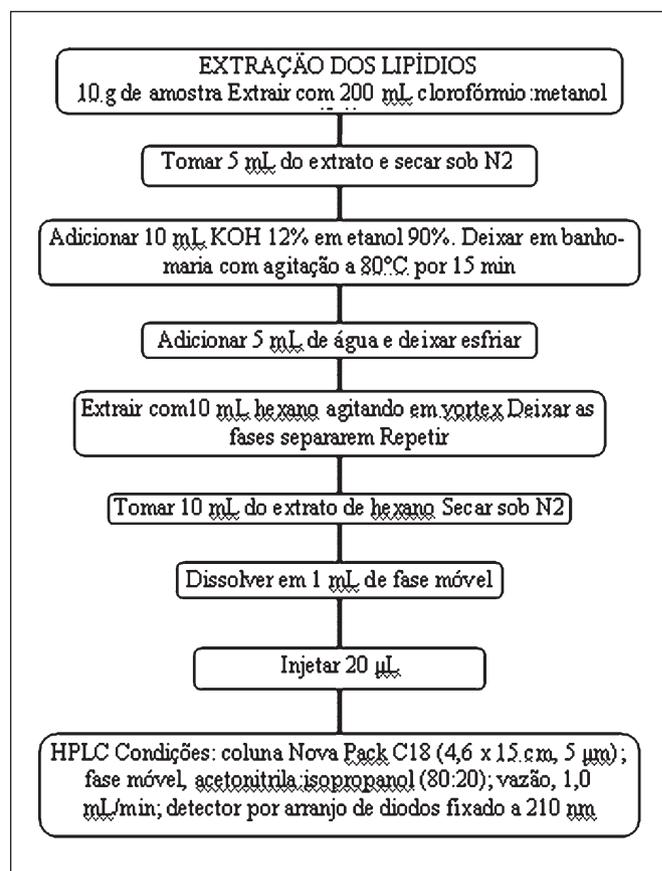


Figura 1. Fluxograma das etapas para determinação de colesterol por HPLC.

pacote estatístico Statistical Package for the Social Science versão 11.0¹⁹. Aplicou-se o teste t de Student, indicado para diferença de médias ao nível de significância de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Composição centesimal

As médias de composição centesimal da gema de ovo de avestruz desidratada pelo método spray-dryer e da gema desidratada por liofilização diferiram estatisticamente em todas as variáveis analisadas, exceto no conteúdo de umidade e resíduo mineral fixo (Tabela 1). A composição do pó recolhido do liofilizador apresentou-se com valores maiores para as variáveis proteínas e lipídios.

Os resultados obtidos quanto à composição centesimal denotam que devido ao aquecimento da amostra no método por spray-dryer, pode ocorrer uma maior propensão para oxidação lipídica e desnaturação protéica. Determinados processos (trituração, torrefação, secagem) tem como consequência a alteração profunda da estrutura compartimentada, provocando a ruptura dos glóbulos de gordura, favorecendo a ação de enzimas lipolíticas (lipases), a eliminação de água e aumentando a exposição ao oxigênio²⁰. Apesar das proteínas da gema do ovo ser menos sensíveis ao calor que as da clara que desnaturam na faixa de temperatura entre 61°C e 92,5°C, dependendo da proteína²¹, ainda sim pode ocorrer desnaturação, porém em percentuais bem menores que os geralmente observados nas proteínas da clara.

Moros et al.²², encontraram 47% de lipídios, 42,2% de proteínas, 3,5% de umidade e 4,3% de resíduo mineral fixo na análise da gema desidratada de ovo de galinha. Comparando-se estas mesmas variáveis com a gema de ovo de avestruz desidratada, recolhida do spray-dryer e do liofilizador, observa-se um maior percentual de umidade e um menor percentual de resíduo mineral fixo, lipídios e proteína.

Em estudo realizado por Obara et al.²³, comparando os ovoprodutos (clara, ovo integral e gema) liofilizados com os desidratados por spray-dryer, os primeiros apresentaram uma menor quantidade de água e uma maior quantidade de proteínas e lipídios, corroborando com os resultados obtidos no presente estudo.

Colesterol

O conteúdo de colesterol presente na gema do ovo de avestruz desidratada por spray-dryer foi de $13,61 \pm 0,49$ mg/g (mg de colesterol por gramas de amostra) diferindo estatisticamente do conteúdo de colesterol presente na gema desidratada por liofilização que foi de $12,59 \pm 0,45$ mg/g.

Apesar do maior conteúdo lipídico apresentado na amostra de gema liofilizada, o conteúdo de colesterol apresentou-se menor. Esta diferença pode ter ocorrido devido à maior oxidação e conseqüentemente ao maior

Tabela 1. Comparação entre a composição centesimal da gema do ovo de avestruz desidratada por spray-dryer e por liofilização.

Composição centesimal	Gema desidratada – avestruz	
	Por liofilização	Por spray-dryer
Umidade (%)	$3,73 \pm 0,58^a$	$3,86 \pm 0,03^a$
Resíduo mineral fixo (%)	$3,36 \pm 0,49^a$	$3,71 \pm 0,13^a$
Proteína (%)	$33,99 \pm 0,43^a$	$33,61 \pm 0,70^b$
Lipídio (%)	$41,42 \pm 0,50^a$	$39,43 \pm 0,45^b$
Carboidrato (%)	$17,50 \pm 0,81^b$	$19,40 \pm 0,87^a$

*Médias seguidas de letras iguais numa mesma linha significa que não houve diferença estatística ($p > 0,05$) pelo teste t de Student.



Figura 2. Morfologia das partículas de gema desidratadas de ovo de avestruz. (A) Partículas da amostra desidratada por liofilização. (B) Partículas da amostra por spray-dryer.

acúmulo de óxidos de colesterol nos ovoprodutos oriundos da gema desidratados por spray-dryer²⁴ que nos ovoprodutos desidratados por liofilização²³. A secagem por atomização é um tratamento que pode não afetar a composição de tocoferol nem de retinol do ovo, mas pode causar uma intensa reação de Maillard²⁵ e acelerar a oxidação do colesterol^{23,25}.

Segundo Sturkie²⁶, o nível de colesterol no organismo das aves é mais dependente de sua síntese endógena do que de seu aporte dietético. Porém o local e a síntese de colesterol variam com a espécie, idade e alimentação. Aproximadamente dois terços da síntese ocorre no fígado, 25% na carcaça e 6% no intestino e na pele.

O conteúdo de colesterol determinado por HPLC para as amostras de gemas desidratadas de ovo de avestruz foi próximo dos obtidos por Aquino²⁷ para gemas *in natura* de ovo de avestruz em que a quantidade de colesterol presente é de 12,70 mg/g, corroborando com os resultados reportados por Horbanczuk et al.²⁸ que teve como média 13mg de colesterol por grama de gema *in natura* de ovo de avestruz, sendo que ambos resultados foram determinados pelo método colorimétrico.

O conteúdo de colesterol da gema seja *in natura* ou desidratada de ovo de avestruz, determinado por HPLC, é semelhante ao conteúdo de colesterol da gema *in natura* de ovo de galinha que varia entre 10,33 e 18,86 mg/g de gema *in natura*, obtido pelo método colorimétrico^{27, 29, 30}.

Tamanho das partículas

As partículas constituintes do pó liofilizado apresentaram formas irregulares e tamanhos variados (Figura 2a). O processo de atomização produziu partículas globosas e esféricas com paredes formadas por uma matriz sólida sem poros (Figura 2b).

O diâmetro das partículas menores liofilizadas variou entre 28 e 36µm enquanto que o das partículas maiores variou entre 100 e 109 µm. O diâmetro das partículas atomizadas variou entre 20 e 33µm.

A esfericidade das partículas atomizadas também foi observada na atomização de suco de acerola¹⁸ e na secagem de café solúvel³¹. De acordo com estudo de King et al.³² partículas esféricas tendem a secar uniformemente, evitando a formação de pontos de aquecimento excessivo da amostra. A matriz das partículas liofilizadas apresentou-se em pedaços devido à moagem a que os produtos foram submetidos após a secagem. As características das partículas liofilizadas observadas neste estudo também foram as mesmas observadas por Righetto¹⁸ e Carlos et al.³³ em amostras de sucos de frutas liofilizadas. Segundo Chang et al.³⁴, o aumento do tamanho das partículas resulta numa redução da área de superfície conferindo uma melhora na retenção e estabilidades das mesmas.

Apesar da diferença de tamanho entre as partículas liofilizadas (maiores) e atomizadas (menores) das amostras de

gema de ovo de avestruz, ambas apresentaram diâmetro entre 10-200µm conforme relatado por Fellows¹² para partículas desidratadas.

CONCLUSÃO

O tamanho e a forma das partículas desidratadas influenciaram a estabilidade das mesmas, pois o método de secagem por liofilização conservou melhor o teor lipídico e protéico da gema de ovo de avestruz, como também concentrou menos colesterol na amostra quando comparado à secagem pelo método de spray-dryer.

AGRADECIMENTOS

A Cooperativa de Criadores de Avestruz da Paraíba - COOVESTRUZ pelas amostras, como também pela concentração de esforços e incentivo, ao Laboratório de Armazenamento e Processamento de Produtos Agrícolas da Universidade Federal de Campina Grande pelo apoio e oportunidade em realizar este estudo e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico – CNPq pelo auxílio financeiro durante a execução deste trabalho.

REFERÊNCIAS

1. Cheftel JC, Cuq JL, Lorient D. Proteínas Alimentarias: bioquímica, propiedades funcionales, valor nutritivo y modificaciones químicas. Zaragoza: Ed. Acribia. 1989.
2. Nielsen H., Shukla, VKS. Solid phase extraction of lipids from spray-dried egg yolk by ethanol with subsequent removal of triacylglycerols by cold temperature crystallization. *Food Sci Tech*, 2004; 37: 613-8.
3. Mineki M., Tanahashi N, Shidara H. Physical and chemical properties of ostrich egg (*Struthio camelus domesticus*): Comparison with white leghorn hen egg. *J Japan Soc Food Sci Tech*, 2003; 6:266-71.
4. Di Meo C, Stanco G, Cutrignelli MI, Castaldo S, Nizza UM.. Physical and chemical quality of ostrich eggs during the laying season. *Br Poultry Sci*. 2003; 33:386-90.
5. Asturias L, Garita A. Estudio de factibilidad del establecimiento de una granja para la crianza y venta del avestruz (*Struthio camelus*) en Guatemala. Costa Rica: Editora Escuela de Agricultura de la Región Tropical Húmeda (EARTH), 2001.
6. United States Department of Agriculture (USDA). Food Safety and Inspection Service. http://www.fsis.usda.gov/Fact_Sheets/Egg_&_Egg_Product_Safety/index.asp. Acesso em: 19 set., 2005.
7. Pelaez R., Leon D, Peralta G, Coelho JR. Ovoproducto – transformación industrial. Lima: Editora Pontificia Universidad Católica del Peru, 2003.
8. Amiali M., Ngadi M.O, Raghavan VGS, Smith JP. Inactivation of *Escherichia coli* 0157:H7 in liquid dialyzed egg using pulsed electric fields. *Food and Bioprod Proc*.2004; 82: 151-6.
9. Bergquist DH. In: Staldemam WJ, Coterril O.J. Egg Science and technology. Ed. Avi Publishing Company. New York: Food Products Press, 1994.
10. Stadelman WJ, Coterril O.J. Egg Science and Technology. 2ª ed. New York: Ed. Avi Publishing Company, 1997.
11. Kitabatake N, Indo K, Doi E. Changes in interfacial properties of hen egg ovalbumin caused by freeze-drying and spray-drying. *J Agric Food*

- Chem.1989; 37: 905-10.
12. Fellows P. Tecnologia del procesado de los alimentos: principios e practicas. Zaragoza: Ed. Acribia, 1994.
 13. Mujumdar, A.S. Industrial drying. 30 ed. New Jersey: CRC Press. 2007.
 14. Martucci, ET. Produtos desidratados de ovos. Campinas. [Dissertação de mestrado]. Campinas, São Paulo: Universidade de Campinas, 1989. 133pp.
 15. A.O.A.C. Association Official Analytical Chemistis. Official methods of analysis of the Association Chemistis, 20 ed. Washington, 2002. .
 16. Folch J, Lees M, Slaon-Stanley GN. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Bio Chem*, 1957; 226: 497-509.
 17. Bragagnolo N, Rodrigues-Amaya, D.Otimização da determinação de colesterol por CLAE e teores de colesterol, lipídios totais e ácidos graxos em camarão rosa (*Penaeus brasiliensis*). *Ciência Tecnol. Alimen*. 1997; 17: 275-280.
 18. Righetto AM. Caracterização físico-química e estabilidade de suco de acerola verde microencapsulado por atomização e liofilização. [Tese de doutorado]. Campinas, São Paulo: Universidade Estadual de Campinas, 2003. 176pp.
 19. SPSS- Statistical package for the social science. INC. 11.0 for Windows [Computer program]; LEAD Technologies SPSS Inc., 2001.
 20. Silva FAM, Borges MFM, Ferreira MA. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. *Quím Nova*.1999; 22:94-103.
 21. Alleoni ACC. Albumen protein and functional properties of gelation and foaming. *Scient Agric*. 2006; 63: 291-8.
 22. Moros JE, Franco JM, Gallegos C. Rheology of spray-dried egg yolk stabilizaed emulsions. *International J Food Sci Tech*. 2002; 37: 297-307.
 23. Obara A, Obiedziński M, Koczak T. The effect of water activity on cholesterol oxidation in spray- and freeze-dried egg powders. *Food Chem*. 2006; 95:173-179.
 24. Kim H., Choe E. Effects of egg yolk powder addition to the flour dough on the lipid oxidation development during frying. *LWT- Food Sci Tech*. 2008; 41: 845-853.
 25. Caboni M.F, Boselli E, Messia MC, Velazco V, Fratianni A, Panfili G, Marconi E. Effect of processing and storage on chemical quality markers of spray-dried whole egg. *Food Chem*. 2005; 92:293-303.
 26. Sturkie PD. *Avian Physiology*. 4. ed. New York: Springer-Verlag, 1986.
 27. Aquino JS. Avaliação da viabilidade técnica da industrialização de ovos inférteis de avestruzes. [Dissertação de mestrado]. João Pessoa, Paraíba: Universidade Federal da Paraíba, 2007. 85pp.
 27. Horbánczuk JO, Sales J, Ziebra G, Reklewski T, Celeda T, Kozaczynski K. Lipid cholesterol content and fatty acid composition of ostrich eggs as influenced by subspecies. *Arch Geflügelkunde*. 1999; 63: 234-6.
 28. Bragagnolo N, Rodriguez-Amaya DB. Avaliação comparativa de três métodos para determinação de colesterol em gema de ovo. *Arq Bio Tec*. 1993; 36: 237-51.
 29. Guedes LS, Silva KM, Soares MGCB. Cholesterol and phospholipids content of yolk from fertilized and unfertilized hen eggs. *Brazilian J Med Bio Res*, 1992; 25:327-9.
 30. Esteves BN. Influência do processo de secagem por pulverização mecânica (spray-dryer) no tamanho de partícula e densidade aparente do café solúvel. [Dissertação de mestrado]. São Paulo, São Paulo: Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, 2006. 96 pp.
 31. King CJ, Kieckbusch TG, Greenwald CG. Food quality factors in spray dryer. In: Mujum, A.S. *Advances in drying*. Washington: Hemisphere, 1984.
 32. Carlos LA, Resende JV, Cal-Vidal J. Redução da higroscopicidade de pós liofilizados pela indução da cristalização em soluções-modelo de açúcares constituintes de frutas. *Brazilian J Food Tec*. 2005; 8: 163-73.
 33. Chang YI, Scire J, Jacobas B. Effect of particle size and microstructure properties on encapsulated orange oil. In: Reineccius, G.A.; Risch, S.J. *Flavor encapsulation*. ACS Symposium Series n.370. Washington DC: American Chemical Society, 1988.

Ação mutagênica do inseticida organofosforado temefós em células de medula óssea de camundongos

Mutagenic effects of the organophosphate insecticide temephos on mice bone marrow cells

RIALA6/1175

Maria Eliane Bezerra de MÊLO^{1*}, Kleison da Costa MERLO¹, Raul Rodrigo de Carvalho FERNANDES¹, Carlos Feitosa LUNA¹, George Tadeu Nunes DINIZ¹, Maria Teresa Janssen de Almeida CATANHO², Leda REGIS¹

*Endereço para correspondência: ¹Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães / Fundação Oswaldo Cruz, Recife, PE/Brasil. Av. Moraes Rego, s/n, Campus da UFPE, CEP 50670-420. Recife, PE/Brasil. e-mail: melomeb@cpqam.fiocruz.br
TEL/FAX: 0**81 2101-2578 / 0**81 2101-2640

²Centro de Ciências Biológicas / Depto. Biofísica e Radiobiologia da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) Av. Moraes Rego, s/n, Campus da UFPE, CEP 50670-420, Recife, PE/Brasil. TEL/FAX: 0**81 2126-8355 / 0**81 2126-8869

Recebido: 15/08/2008 – Aceito para publicação: 24/10/2008

RESUMO

Foram investigados os efeitos mutagênicos do organofosforado temefós através da observação da formação de micronúcleos em eritrócitos policromáticos (PCEMN) da medula óssea de camundongos. Em camundongos *Swiss Webster* de ambos os sexos, foram administradas diferentes doses de temefós (27,75; 55,5 e 111,0 mg/kg) por via bucal-gástrica e água destilada (10 mL/kg) no grupo controle negativo; e ciclofosfamida (CPA) (25 mg/kg) foi administrada pela via i.p. no grupo controle positivo. Foram analisadas dez mil células da medula óssea por grupo experimental. Os efeitos mutagênicos foram avaliados nos períodos de 24, 48 e 72h após ministrar a dose única e após nove doses de 111,0 mg/kg (1/semana). Em 24h após a dose única de CPA, a formação de PCEMN foi observada em 1,63% dos camundongos machos e 2,77% em fêmeas. Não houve formação de PCEMN no grupo controle negativo. O temefós induziu PCEMN em 2,61%, 3,50% e 3,69% de animais machos e 1,02%, 1,37% e 1,33% em fêmeas. Após 72h, CPA induziu PCEMN em 0,05% de camundongos de ambos sexos e o temefós em 0,92% de machos e 0,18% em fêmeas. Após nove doses de CPA, houve a formação de PCEMN em 0,15% de machos e em 0,8% de fêmeas; para o temefós, os valores observados foram respectivamente de 0,53% e 0,11%. A ação mutagênica de temefós foi demonstrada pela indução de micronúcleos em camundongos de ambos sexos.

Palavras-chave. temefós, organofosforado, mutagênico, teste de micronúcleo, eritrócitos policromáticos micronucleados.

ABSTRACT

The mutagenic effects of organophosphate temephos on mice bone marrow cells was investigated through the micronucleus formation test. Doses of temephos (27.75; 55.5 e 111.0 mg/kg) were orally administered to males and females *Swiss Webster* mice. Cyclophosphamide (CPA, 25 mg/kg) per via i.p. and water (10 mL/kg) were administered in mice as positive and negative control groups, respectively. Mutagenic effects were evaluated from 24h to 72h after giving a single dose, and after nine doses of 111.0 mg/kg weekly administered. Ten thousand bone marrow cells per experimental group were analyzed. In the positive controls, the percentages of polychromatic erythrocytes micronucleus (PCEMN) at 24h after a single dose were 1.63% in male and 2.77% in female mice. No PCEMN was observed in the negative controls group. Gradually increasing temephos doses induced PCEMN in 2.61, 3.50, and 3.69% males and 1.02, 1.37, and 1.33% females, respectively. After 72h, CPA caused 0.05% of PCEMN in both males and

females; and the temephos caused 0.92% in males and 0.18% in females. In mice administered with nine doses of CPA, PCEMN was detected in 0.15% males and 0.8% females, although PCEMN values were significantly higher in temephos receiving mice group. The mutagenic effects of temephos on both male and female mice were evidenced by chromosome alterations inducing micronucleus formation.

Key words. temephos, organophosphate, mutagenic, micronucleus test, micronucleate Polychromatic erythrocytes.

INTRODUÇÃO

O Brasil é, em nível mundial, um dos maiores consumidores de inseticidas, os quais são usados principalmente na agricultura^{1,2}. O uso continuado ou intermitente durante quase 6 décadas de milhares de toneladas de tais compostos, acarretou problemas decorrentes do seu modo de ação não seletiva, ao eliminar organismos alvo e não alvo, tanto invertebrados quanto vertebrados, causando impacto ambiental e desequilíbrio nos ecossistemas^{3,4,5}.

Há décadas, inseticidas químicos vêm sendo largamente utilizados para o controle de insetos transmissores de doenças^{1,2}. Desde a implantação do Plano para Erradicação do *Aedes aegypti* (PEAa) o uso de organofosforados em programas de saúde pública no Brasil foi ampliado consideravelmente pela adição de cerca de 5 mil toneladas de temefós por ano^{3,4,5}. Este composto é aplicado como larvicida, em ciclos bimestrais, em água estagnada e em reservatórios de água potável para uso doméstico, na concentração final de 1ppm. A adição de temefós em água para consumo humano tem como argumento baixa toxicidade aguda e a pouca persistência no ambiente^{6,7}.

O temefós, empregado como princípio ativo de produtos como Abate, Difos, Biothion, Abathion, Nimitex e Swebate, é um pesticida organofosforado usado extensivamente em várias partes do mundo no controle de vetores biológicos de diversas doenças e foi introduzido no mercado em 1965, pela American Cyanamid Company.

Análises dos danos causados pelo uso de compostos organofosforados à saúde humana têm sido, em sua maioria restrita aos efeitos agudos, entretanto sabe-se que os inseticidas sintéticos não são seletivos, agredem o meio ambiente e apresentam efeitos tóxicos agudos e crônicos sobre invertebrados e vertebrados, resultantes da exposição prolongada a diferentes moléculas de organofosforados, caracterizando, portanto um problema de Saúde Pública^{8,9,10}.

Os organofosforados são inibidores de colinesterase ativos em todos os grupos animais que usam a acetilcolina como neurotransmissor, com conseqüente acúmulo desta molécula no organismo, acarretando, cronicamente, alterações no funcionamento dos sistemas muscular, nervoso, endócrino e imunológico^{11,12,13,14}. Os efeitos agudos da exposição a estes compostos são mensurados em modelos animais, estabelecendo-se a dose letal de 50% (DL₅₀) para o grupo exposto em bioensaios. Entretanto, a extensão dos danos, sobretudo no que concerne aos efeitos crônicos e em especial os mutagênicos e/ou

genotóxicos é pouco conhecida^{8,15,16}.

Em virtude da correlação estabelecida entre mutagenicidade e carcinogenicidade, segundo a qual substâncias reconhecidas mutagênicas podem ser também carcinogênicas^{17,18,19} é relevante investigar o potencial mutagênico e/ou genotóxico de compostos organofosforados, como o temefós, em virtude dos riscos da periculosidade dos produtos aos quais os seres vivos estão expostos por períodos prolongados^{10,6}.

A análise genotóxica foi realizada através do teste de micronúcleo em células de medula óssea de camundongos (*Mus musculus*) *Swiss Webster* de ambos os sexos.

O teste de micronúcleo, desenvolvido por Von Ledebur & Schmid²⁰ e Heddle et al.,²¹ é utilizado para a detecção de agentes genotóxicos, com especial relevância para os programas de *screening* na vigilância à saúde,^{22, 23,24} em ensaios *in vivo* ou *in vitro*, tendo sido apontado como um método para determinar a capacidade genotóxica (clastogênica) de uma substância e, conseqüentemente, seu potencial carcinogênico. O micronúcleo representa uma perda estrutural ou numérica de fragmentos cromossômicos ou cromossomos inteiros, induzida por agentes genotóxicos (clastogênicos)^{21,24}.

Neste estudo foram investigados os efeitos genotóxicos (clastogênicos) nas células da medula óssea de camundongos de ambos os sexos, através da formação de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEMN), expostos as diferentes doses de temefós 95,5% (grau técnico).

Mediante a escassez, na literatura, a respeito do potencial mutagênico e/ou genotóxico do temefós, o objetivo e a relevância desse estudo consistem em produzir conhecimentos sobre os efeitos mutagênicos em células de mamíferos, induzidos pela exposição ao inseticida organofosforado temefós.

Espera-se que os conhecimentos gerados deste estudo, contribuam aos serviços de Saúde, no sentido de re-avaliar as práticas dos programas oficiais de controle de vetores, assim como, os potenciais riscos destes produtos para a saúde humana.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais experimentais

Nos experimentos foram utilizados 180 camundongos (*Mus musculus*) albinos *Swiss Webster* de ambos os sexos, com 40 dias de vida e peso médio de 30 a 32g, fornecidos pelo biotério

de criação do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ-Recife PE, onde foram mantidos em gaiolas apropriadas, aclimatados a temperatura de 20°C, com ciclos de iluminação (claro / escuro) a cada 12 horas. Foi oferecido diariamente ração balanceada e água filtrada, sem restrição nem interrupção. Antes da realização dos experimentos os animais passaram por um período de 8 dias em “quarentena” no biotério experimental, sob as mesmas condições ambientais e nutricionais que estavam no biotério de criação, até a hora do experimento.

Produtos químicos

Temefós, grau técnico 95,5% w/w (FERSOLR - 0259/05), inseticida organofosforado. A solução estoque foi preparada em etanol P.A. (32,14 mg/mL) e a solução de uso em água destilada estéril. A partir da DL₅₀ (444 mg/kg) foi determinada, através de testes prévios, a dose de 111 mg/kg como a dose máxima tolerada (DMT) por camundongos de ambos os sexos. Foram utilizadas nos experimentos as doses de 27,75; 55,5 e 111mg/kg.

Ciclofosfamida (SIGMA®) fármaco antineoplásico citostático, universalmente empregado em testes para detecção de genotoxicidade, foi utilizada como padrão de controle positivo na dose de 25 mg/kg, em virtude dos resultados apresentados em experimentos preliminares. A solução de uso foi preparada em água destilada estéril a 1%.

Protocolo experimental

Os ensaios consistiram em administrar nos camundongos, via oral (gavagem), o temefós como substância teste. A Ciclofosfamida, via i.p., como padrão de controle positivo e água destilada estéril, via oral (gavagem), como controle negativo. Todos os animais receberam um volume total de 0,2 mL das respectivas soluções das substâncias.

Os camundongos foram divididos em 36 grupos formados por 05 animais / dose / sexo, para cada produto.

Os tratamentos foram administrados aos camundongos divididos em 6 grupos experimentais:

Grupo 1 – efeitos avaliados 24h após tratamento único. 1a: 5 machos e 5 fêmeas tratados com temefós, dose 27,75 mg/kg de peso corporal; 1b: 5 machos e 5 fêmeas receberam ciclofosfamida 25 mg/kg; 1c: 5 machos e 5 fêmeas receberam água destilada estéril 10 mL/kg.

Grupo 2: Efeitos avaliados 24h após tratamento único. 2a: 5 machos e 5 fêmeas tratados com temefós, dose 55,5 mg/kg de peso corporal; 2b: 5 machos e 5 fêmeas receberam Ciclofosfamida 25 mg/kg; 2c: 5 machos e 5 fêmeas receberam água destilada estéril 10 mL/kg.

Grupo 3: Efeitos avaliados 24h após tratamento. 3a: 5 machos e 5 fêmeas tratados com temefós, dose 111,0 (DMT) mg/kg de peso corporal; 3b: 5 machos e 5 fêmeas receberam Ciclofosfamida 25 mg/kg; 3c: 5 machos e 5 fêmeas receberam água destilada estéril 10 mL/kg.

Grupo 4: Efeitos avaliados 48h após tratamento. 4a: 5 machos e 5 fêmeas tratados com temefós, dose 111,0 (DMT)

mg/kg de peso corporal; 4b: 5 machos e 5 fêmeas receberam Ciclofosfamida 25 mg/kg; 4c: 5 machos e 5 fêmeas receberam água destilada estéril 10 mL/kg.

Grupo 5: Efeitos avaliados 72h após tratamento. 5a: 5 machos e 5 fêmeas tratados com temefós, dose 111,0 (DMT) mg/kg de peso corporal; 5b: 5 machos e 5 fêmeas receberam Ciclofosfamida 25 mg/kg; 5c: 5 machos e 5 fêmeas receberam água destilada estéril 10 mL/kg.

Grupo 6: Foram administradas 9 doses do produto-teste, uma por semana. Os efeitos foram avaliados 24h após administração da 9ª dose. 6a: 5 machos e 5 fêmeas tratados com temefós, dose 111,0 (DMT) mg/kg de peso corporal; 5b: 5 machos e 5 fêmeas receberam Ciclofosfamida 25 mg/kg; 5c: 5 machos e 5 fêmeas água destilada estéril 10 mL/kg.

Obtenção das células da medula óssea

Os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical, os fêmures foram extirpados, dissecados, as epífises proximais foram cortadas para a extração da medula óssea. A medula foi extraída injetando-se 1,0 mL de soro fetal bovino no canal medular dos fêmures, colocando-se a suspensão de células dentro de um tubo de centrifuga contendo 2,0 mL de soro fetal bovino.

Teste de micronúcleos em células de medula óssea de camundongos²⁴

A suspensão de células da medula óssea foi homogeneizada várias vezes com pipeta Pasteur fina e, em seguida, centrifugada a 1.000 r.p.m. durante 5 minutos. Dos 3 mL da suspensão celular, descartou-se 2 mL do sobrenadante. Ressuspendeu-se o sedimento e foram feitos os esfregaços (4 lâminas / animal), com 3 gotas da suspensão celular em lâminas limpas e secas, deslizando-se uma sobre a outra. Após secagem total das preparações citológicas, as lâminas foram colocadas em berço para coloração e fixadas em metanol PA, durante 10 minutos.

As lâminas foram coradas 24 horas após a fixação do material, através de uma bateria de coloração, composta por 4 cubas onde as lâminas foram submersas em seqüência: 1ª cuba com corante Leishman puro (3 minutos); 2ª cuba com solução Leishman em água destilada (1:6) durante 15 minutos, e em seguida lavadas várias vezes em água corrente; 3ª cuba contendo acetona PA (10 minutos). As preparações citológicas foram protegidas por lamínulas fixadas com bálsamo do Canadá / xilol (1:1).

Foram analisadas, em sistema duplo cego, 2.000 células / animal em microscópio óptico (10 x 100x), perfazendo um total de 10.000 células / grupo, sendo contabilizados os eritrócitos policromáticos (PCE) e os eritrócitos policromáticos micronucleados (PCE MN).

Análise estatística

Foi aplicado o teste do qui-quadrado de proporções do Soft Epi - Info - 6.04, ao nível de significância de 5%. Na escolha

do teste levou-se em consideração o esquema experimental, e as transformações necessárias para que se fizessem comparações múltiplas dos resultados.

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Fundação Oswaldo Cruz – Rio de Janeiro, registrado e licenciado sob o número L-0054/08 – Val. 30/06/2012.

RESULTADOS

Um dia após tratamento, foram detectados 1,63% de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEMN) nos camundongos machos e 2,77% nas fêmeas do grupo controle positivo (CPA 25 mg/kg). Não foram observados PCEMN nos grupos controle negativo em nenhum dos momentos estudados nos experimentos (Figura 1).

Quanto aos animais tratados com temefós, nas doses 27,75, 55,5 e 111,0 mg/kg, e avaliados 24h após dose única, foram encontrados, respectivamente, 2,61%, 3,5% e 3,69% de PCEMN em machos, com percentuais crescentes para doses progressivamente maiores (Figura 1). Estes valores são significativamente maiores ($p = 0,0001$; $p < 1$) do que no controle positivo (CPA) ($p = 0,0177$; $p < 1$). Nos grupos de fêmeas, os percentuais de PCEMN (1,02%, 1,37% e 1,33% para doses crescentes de temefós) foram estatisticamente menores ($p = 0,1604$; $p < 1$) do que os observados no controle positivo ($p = 0,01771$; $p < 1$).

Nos grupos examinados 48h após tratamento, o mesmo percentual de PCEMN (0,05%) foi observado em camundongos machos e fêmeas que receberam CPA. Nos grupos tratados com temefós (111,0 mg / kg), os efeitos foram levemente mais acentuados em machos (0,18%) do que em fêmeas (0,11%). Entretanto estes valores não diferem estatisticamente ($p < 1$) dos observados no controle positivo (Figura 2). Após 72h do tratamento, os percentuais de PCEMN no grupo CPA foram os mesmos observados às 48h para ambos os sexos (0,05%) (Figura 3). Nos grupos tratados com temefós (111,0 mg/kg) os efeitos foram estatisticamente mais intensos, do que no controle positivo, apenas nos camundongos machos (0,92%, $p = 0,0001$).

A avaliação de grupos submetidos à exposição prolongada, feita 24 h depois do 9º tratamento, mostrou que o CPA (9 doses de 25 mg/kg) induziu 0,15% de PCEMN nos camundongos machos e 0,3% nas fêmeas (Figura 4). Os resultados observados nos grupos tratados com temefós (9 doses de 111,0 mg/kg) mostram, para os machos (0,53%) de PCEMN com valores significativamente maiores do que no controle positivo ($p = 0,0244$; $p < 1$) e 0,11% de PCEMN no grupo de fêmeas, estatisticamente menores do que o controle positivo ($p = 0,0205$; $p < 1$) com significância estatística entre machos e fêmeas (Figura 4).

Houve divergência de proporcionalidade entre camundongos machos e fêmeas, onde os camundongos machos apresentaram maior proporção. Com significância

estatística ao nível de 5% ($p < 0,0001$), tanto após as 72h da dose única, quanto após as 9 doses de 111,0 mg/kg.

DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo mostram que o organofosforado temefós produz alterações do material genético de camundongos, demonstradas pela formação de micronúcleo em eritrócitos policromáticos (PCE) da medula óssea de animais de ambos os sexos, expostos às doses de 27,75; 55,5 e 111,00 mg/kg (DMT) via oral e avaliados 24h após tratamento. A dose de 27,75 mg/kg é quatro vezes menor do que a DMT para a linhagem de camundongos utilizada neste estudo. Nos grupos de machos expostos ao temefós a relação dose-efeito foi clara, e os percentuais de PCE com micronúcleo (PCEMN) foram, nas 3 doses avaliadas, estatisticamente mais altos do que os observados com a ciclofosfamida (CPA), como controle positivo. Nos machos, a indução de PCEMN pelo temefós foi observada mesmo em PCE recolhidos da medula óssea até 72h após dose única de 111 mg/kg. As fêmeas foram, por outro lado, menos susceptíveis à CPA e mais tolerantes ao temefós do que os machos. É muito freqüente, na literatura científica, constatações de diferenças entre sexo, quanto à resposta a agentes patogênicos, biológicos ou químicos, que podem ser atribuídos a aspectos comportamentais (diferentes graus de exposição aos agentes, por exemplo) ou biológicos, para os quais nem sempre há explicações convincentes. Os nossos resultados demonstram claramente uma maior tolerância das fêmeas ao temefós, mas os dados não indicam as prováveis causas deste fato. Nos grupos de fêmeas, a indução de PCEMN tanto pelo temefós quanto pela CPA foi constatada quando os PCE foram colhidos as 24 e 48h após administração de dose única. A avaliação dos efeitos 24h após a última aplicação de uma série de 9 doses administradas semanalmente, confirmou os efeitos do temefós em camundongos nos dois sexos, mas não houve aumento das taxas de PCEMN quando comparadas com as induzidas por dose única do organofosforado. A análise estatística mostrou diferença significativa ($p = 0,0001$) ao nível de 5%, entre dose única de 111 mg/kg e as 9 doses (111 mg/kg), administradas semanalmente (Figuras 1 e 4).

Ficou evidente que o temefós possui efeito mutagênico em ambos os sexos, para as três concentrações testadas, permitindo ser detectado mesmo 72h após tratamento único.

Em nossos experimentos não foram detectados PCE micronucleados nos controles negativos (tratados com água), embora haja relatos na literatura científica de observação de taxa espontânea de PCE micronucleados, da ordem de 3/1000 células examinadas^{22,23}. O uso da CPA é recomendado nos protocolos de testes para detecção de genotoxicidade, como controle positivo, para assegurar a confiabilidade dos experimentos, realizados conforme os padrões estabelecidos.

Os resultados deste estudo corroboram conclusões, obtidas por outros autores, referentes à ação genotóxica

(clastogênica), induzida pelo organofosforado temefós. Em estudos utilizando testes padronizados para mensurar mutagenicidade/genotoxicidade, Aiub et al⁸ concluíram que o temefós mostrou-se mutagênico: através do ensaio Cometa (SCGE), induzindo lesões grosseiras no DNA; no sistema SOS cromoteste para a linhagem PQ37 de *Escherichia coli* e através do teste de Ames com as linhagens de *Salmonella typhimurium*. Inclui-se em testes com concentrações similares às utilizadas rotineiramente para combate ao *Aedes aegypti*^{3,5}. Pavão e Leão (2005)¹⁰ a partir de análise através de método químico-quântico

de caracterização de carcinogênicos, concluíram que o temefós, assim como outros inseticidas utilizados no combate ao *Ae. aegypti*, apresenta um forte caráter eletrofílico, uma das características de agentes químicos carcinogênicos.

Estudos anteriores já haviam demonstrado que outros organofosforados, dentre eles, o malation, são um potentes agentes genotóxicos (clastogênicos), causando sérias alterações citogenéticas e provocando danos em células germinativas⁹, e induzindo, além de aberrações cromossômicas, aumento na frequência de micronúcleos¹⁶

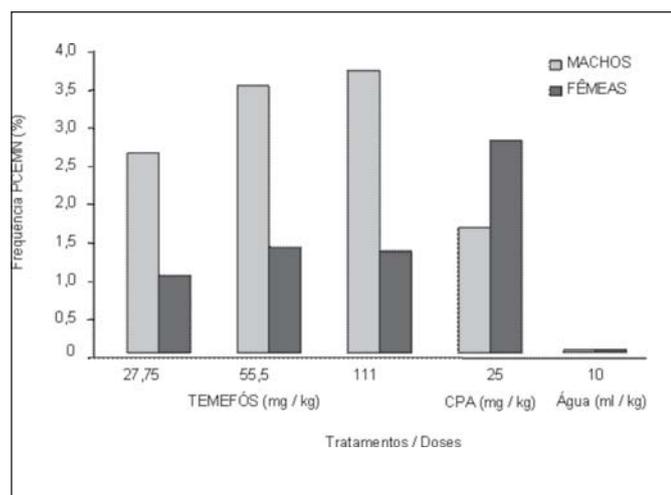


Figura 1. Frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEMN) na medula óssea de camundongos machos e fêmeas tratados com temefós (grau técnico 95,5%), ciclofosfamida (CPA) como controle positivo (25 mg/kg), ou água destilada como controle negativo, em dose única. Os efeitos foram avaliados 24 horas após exposição via oral às substâncias.

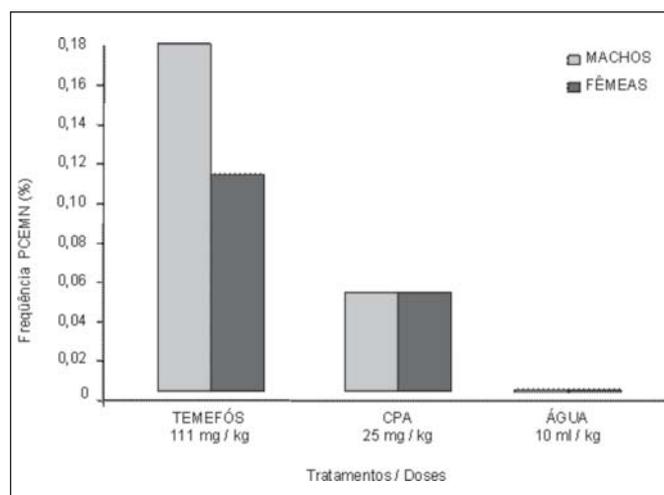


Figura 2. Frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEMN) na medula óssea de camundongos machos e fêmeas tratados com temefós (grau técnico 95,5%) ou com ciclofosfamida (CPA) como controle positivo (25 mg/kg), ou com água destilada como controle negativo, em dose única. Os efeitos foram avaliados 48 horas após exposição via oral às substâncias.

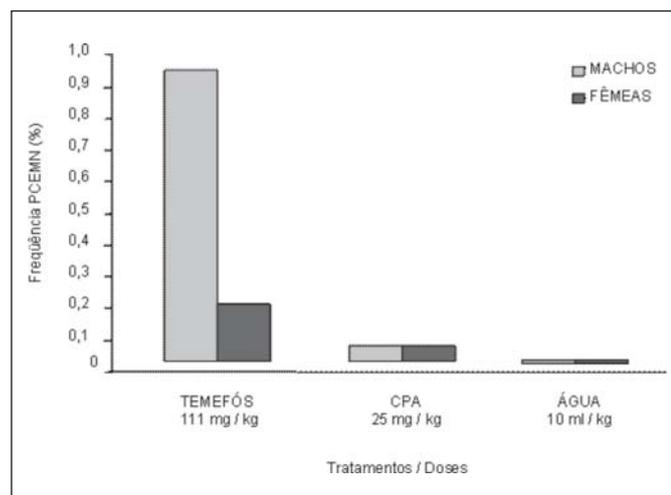


Figura 3. Frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEMN), em células de medula óssea de camundongos machos e fêmeas, expostos ao Temefós (grau técnico 95,5%) ou a Ciclofosfamida (CPA) como controle positivo (25 mg / kg), e a água destilada, como controle negativo em dose única. Os efeitos foram avaliados 72 horas após exposição às substâncias.

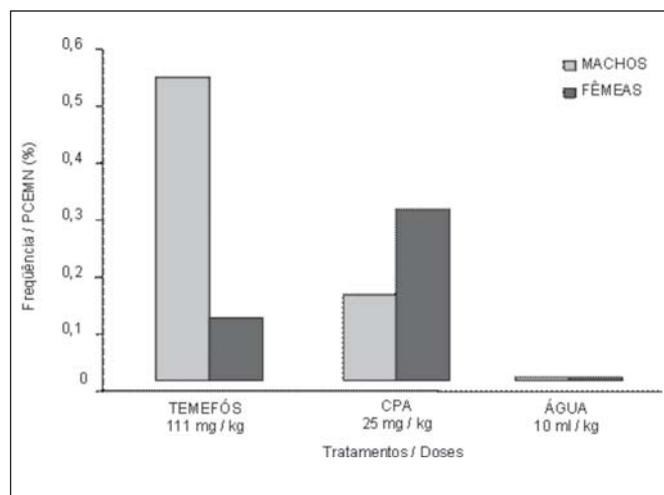


Figura 4. Frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEMN), em células de medula óssea de camundongos machos e fêmeas, expostos ao Temefós (grau técnico 95,5%) ou a Ciclofosfamida (CPA) como controle positivo (25 mg / kg), e a água destilada, como controle negativo em dose única. Os efeitos foram avaliados 24 horas após 9 doses de 111mg/kg (1 dose / semana) de exposição às substâncias.

Estes dados, entre outros disponíveis na literatura, alertam sobre o potencial risco para a saúde humana que representa o uso contínuo e rotineiro, durante mais de uma década de milhares de toneladas de produtos à base de temefós, em criadouros do vetor da dengue e que são, em sua grande maioria, recipientes com água armazenada para uso humano, impondo à população a ingestão e o contato dérmico com água contendo este organofosforado.

Frente aos potenciais riscos e danos que inseticidas organofosforados possam causar à saúde humana, bem como à fauna não alvo, pelo uso esporádico, sistemático e/ou constante, no âmbito doméstico, na agricultura ou em campanhas de Saúde Pública, enfatizamos ser imprescindível, como medida preventiva, considerar o potencial mutagênico e/ou genotóxico de produtos utilizados para o controle de insetos.

AGRADECIMENTOS

A Gilvan Mariano (designer gráfico)

REFERÊNCIAS

1. Forget G. Pesticides and the third world. *J Toxicol Environ Health* 1991;32:11-31.
2. Zaim M, Guillet, P. Alternative inseticidas: an urgent need. *Trends Parasitol*. 2002;18(4):161-3.
3. Fundação Nacional de Saúde (BR). Coordenação Regional de Pernambuco. Relatório de situação das atividades de epidemiologia, sistema de informação e entomologia relacionadas ao PEAA, no estado de Pernambuco. Recife. A Fundação; 2001.
4. Secretaria Estadual de Saúde. Diretoria de Epidemiologia e Vigilância Sanitária. Dengue: - Relatório de Ações da Subcomissão de Epidemiologia. Recife: A Secretaria; 1987.
5. Secretaria Estadual de Saúde. Diretoria de Epidemiologia e Vigilância Sanitária. Estruturação do Plano de Erradicação de Aedes Aegypti no Brasil (PEAA), em Pernambuco. Recife: A secretaria; 1997.
6. Taylor P. Anticholinesterase agents. In: Brunton L, Lazo J, Parker K. Goodman & Gilman's. The pharmacological basis of therapeutics. 8th ed. New York: Editor; McGraw Hill; 1991.p.131-149.
7. World Health Organization. WHO Specifications and evaluations for public health pesticides: temephos [monografia na internet]. Genebra: A organização; 2007 [cited 2008 may 8]. Available from <http://www.who.int/whopes/quality/Temephos_eval_June_2007_corr_aug160807.pdf>
8. Aiub C A F, Coelho E C A, Sodr  E, Pinto L F R, Felzenszwalb I. Genotoxic evaluation of the organophosphorous pesticide temephos. *Genet Mol Res*. 2002;1(2):159-166.
9. Giri S, Prasad S. B, Giri A, Sharma G D. Genotoxic effects of malathion: an organophosphorus insecticide, using three mammalian bioassays in vivo. *Mutat Res*. 2002;514:223-31.
10. Pavão A C, Leão M. Riscos de carcinogênese química no controle de *Aedes aegypti*. In: Augusto L G S, Carneiro M R, Martins P H. Abordagem ecossistêmica em saúde: Ensaio para o controle de dengue. Recife: Editora Universitária da UFPE. 2005 p. 213-225.
11. Cavaliere M J, Calore E E, Perez N M, Puga F R.. Miotoxicidade por organofosforados. *Rev Saúde Pública*. 1996;30(3):267-72
12. Eyer P. Neuropsychopathological changes by organophosphorus compounds: a review. *Hum Exp Toxicol*. 1995;14:857-864.
13. Koifman S, Koifman R J, Meyer A. Human reproductive system disturbances and pesticide exposure in Brazil. *Cad Saúde Pública*. 2002 18(2):435-445.
14. Repetto R, Baliga S. S. Review article: Pesticide and immunosuppression: the risks to public health. *Health Policy Plan*. 1997; 12(2):97-106.
15. Ashby J. Comparison of techniques for monitoring human exposure to genotoxic chemicals. *Mutat Res*. 1988;204:543-551.
16. Degraeve N, Moutschen J. Genetic and cytogenetic effects induced in the mouse by an organophosphorus insecticide: malathion. *Environ Res*.1984;34:170-4.
17. Cairns J. Somatic stem cells and kinetics of mutagenesis and carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci*. 2002;99:10567-10570.
18. Loeb L, Loeb K R, Anderson J P. Multiple mutations and cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 2003;100:776-781.
19. Sarasin A. An overview of the mechanisms of mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat Res*. 2003;544:99-106.
20. Von Ledebur M, Schmid W. The micronucleus test. methodological aspects. *Mutat Res*. 1973;9:9-117.
21. Heddle J A, Hite M, Kirkhart B, Mavournin K, Mac Gregor J T, Newell G T, Salamone M F. The induction micronuclei as measure of genotoxicity. A report of the U.S. Environmental protection agency gene-tox program. *Mutat Res*. 1983;123:61-118.
22. Hayashi M, Mac Gregor J T, Gatehouse D G, Adler Ilse-Dore, Blakey D H, Dertinger S D. In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. II Some aspects of protocol design including repeated treatments integration with toxicity testing, and automated scoring. *Environ Mol Mutagen*. 2000;35(3):234-52.
23. Krishna G, Hayashi, M. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Mutat Res*. 2000;455:155-166.
24. Schmid W. The Micronucleus test. *Mutat Res*. 1975;31:9-15.

Detecção de *Bacillus cereus* em leite e avaliação da germinação dos esporos após tratamento térmico

Detection of *Bacillus cereus* in milk samples and assessment of the spores germination after milk thermal treatment

RIALA6/1176

Mílina Martinelli WATANUKI^{1*}, Cláudio Rosa GALLO²

*Endereço para correspondência: Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição, ESALQ/USP Av. Pádua Dias, 11. CEP 13418-900. C.P. 09. Piracicaba, SP/Brasil, e-mail: milenamw@yahoo.com.br

¹Ciência e Tecnologia de Alimentos, Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", ESALQ/USP, Piracicaba, SP/Brasil.

²Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/ESALQ/USP. Piracicaba, SP/Brasil.

Recebido: 28/04/2008 – Aceito para publicação: 18/09/2008

RESUMO

A análise microbiológica tem sido ferramenta fundamental para a obtenção de dados sobre a qualidade, higiene e segurança na produção de alimentos e essa medida tem sido adotada na indústria alimentícia para o controle de qualidade. Foram analisadas 75 amostras de leite, com o intuito de investigar a presença de *Bacillus cereus* em amostras de leite fluido. A capacidade de germinação de esporos e a multiplicação da bactéria foram averiguadas após o tratamento térmico das amostras do leite e, então, mantidas a temperatura ambiente e sob refrigeração por até 12 horas. Das 75 amostras, 46 (61,3%) mostraram-se contaminadas por *B. cereus* antes de serem submetidas à fervura. Amostras mantidas a temperatura ambiente após o aquecimento apresentaram contagens bacterianas superiores à contagem inicial, o que indica a ocorrência da germinação dos esporos e a multiplicação das células vegetativas. As alíquotas dessas mesmas amostras, mantidas sob refrigeração (7°C), não apresentaram população bacteriana elevada. Estes fatos enfatizam a importância da refrigeração do leite após o tratamento térmico, para assegurar a qualidade do produto a ser oferecido à população.

Palavras-chave. germinação, esporos, tratamento térmico, leite, *Bacillus cereus*.

ABSTRACT

The microbiological analysis has been the fundamental tool for achieving data on food production quality, sanitation, hygiene and safety, and these procedures have been adopted by food industry for setting the quality control. A total of 75 milk samples were analyzed in order to determine the occurrence of *Bacillus cereus* and to assess the spores germination and the bacteria growth after performing milk thermal treatment. One portion of the boiled milk samples was kept at room temperature, and another was maintained at 7°C for up 12 hours. In 46 (61.3%) out 75 analyzed samples, *B. cereus* was found in milk samples before being boiled. The boiled milk samples maintained at room temperature presented higher bacteria counting than those found in the initial counting, indicating the occurrence of spores germination multiplication of the vegetative cells. In those boiled samples kept at 7°C no much bacteria increase was observed. These findings emphasize the importance in storing the boiled milk samples at refrigeration temperature, for avoiding the further bacteria proliferation.

Key words. germination, spores, thermal treatment, milk, *Bacillus cereus*.

INTRODUÇÃO

O leite é um dos alimentos mais completos, mas sua composição química e a microbiota que o acompanha o torna um produto altamente perecível, necessitando para sua conservação, de adequados tratamentos higiênicos e tecnológicos¹.

No Brasil, a produção leiteira ainda apresenta obstáculos na cadeia produtiva, especialmente em relação às condições higiênico-sanitárias, que comprometem a qualidade final do produto, causam modificações físico-químicas e sensoriais, que limitam a durabilidade do leite e seus derivados, além de representarem problemas econômicos e de saúde pública².

Tendo em vista a importância do leite na alimentação de indivíduos de todas as faixas etárias, torna-se necessário que sua qualidade seja garantida³. Por esse motivo, a qualidade desse produto tem merecido a atenção de numerosos pesquisadores e autoridades ligadas à área de saúde e tecnologia de alimentos, principalmente pelos riscos de veiculação de microrganismos patogênicos e deterioradores⁴.

Dentre os vários microrganismos que podem contaminar o leite "in natura" por meio das fezes e camas dos animais, poeira, equipamentos e utensílios deficientemente higienizados, destacam-se as bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus*, especialmente *Bacillus cereus*. São bactérias habitantes naturais do solo que estão frequentemente presentes no leite cru^{1,5,6}, sendo a resistência ao calor uma característica comum, pelo fato de esporularem⁷.

A presença do *B. cereus* no leite é uma das maiores preocupações na indústria de laticínios⁸. Esse microrganismo pode causar alterações sensoriais no leite^{8,9,10}, além de ser responsável por surtos de intoxicação alimentar.

Em doenças de origem alimentar causada por *B. cereus*, duas síndromes distintas são conhecidas, uma de natureza diarreica devido ao consumo de leite e seus derivados, produtos cárneos, molhos, sopas e vegetais, e outra emética, associada à ingestão da toxina produzida em arroz frito e cozido, massas e macarrões. Ambas são autolimitantes e a recuperação ocorre dentro de 24 horas^{6,11}.

Nestes tipos de enfermidade, o alimento implicado geralmente foi tratado com calor, e os esporos sobreviventes são a origem das síndromes. O tratamento térmico estimula a germinação dos esporos que, na ausência da microbiota competitiva, encontra condições favoráveis para proliferar no produto. Nos últimos anos, o reconhecimento de cepas psicotróficas de *B. cereus* na indústria leiteira tem conduzido a uma vigilância aumentada deste patógeno¹².

O presente trabalho procurou detectar *B. cereus* em amostras de leite cru, pasteurizado (A, B e C) e UAT (ultra-alta temperatura) disponíveis no mercado, bem como avaliar a germinação de esporos e a multiplicação dessa bactéria logo após o processo de tratamento térmico, com manutenção das amostras à temperatura ambiente e sob refrigeração. Ao realizar estes procedimentos, semelhantes aos executados normalmente

pelos consumidores, pretenderam-se analisar e avaliar os riscos que tais processos representam à saúde pública.

MATERIAIS E MÉTODOS

Matéria-prima

Foram analisadas 10 amostras de leite cru, 10 amostras de leite pasteurizado tipo A, 25 amostras de leite pasteurizado tipo B, 25 amostras de leite pasteurizado tipo C e 5 amostras de leite UAT. Todas as 75 amostras foram coletadas em diversos estabelecimentos do comércio varejista da região de Piracicaba, estado de São Paulo.

Tratamento das amostras

Em todas as amostras foi realizada análise microbiológica para detecção de *B. cereus*. Após a retirada da alíquota necessária para tal análise, procedeu-se ao tratamento térmico do restante da amostra. O tratamento térmico consistiu de fervura do leite em bquer sob a chama de bico de Bunsen. A chama foi desligada após a subida do leite no interior do bquer. Procurou-se realizar este procedimento por ser semelhante ao executado pelos consumidores deste alimento em suas residências.

Os recipientes contendo as amostras que foram submetidas ao processo de fervura permaneceram em repouso à temperatura ambiente e tampados (resfriamento natural). Decorridas 1, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 horas da fervura, a presença de *B. cereus* foi analisada nos tempos 1, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 horas.

A temperatura e o pH das amostras de leite foram determinados no momento das análises. A análise de *B. cereus* nas amostras do leite mantidas a temperatura ambiente por intervalos de tempos diferentes foi feita com o intuito de avaliar a segurança microbiológica desse procedimento.

Também visando analisar o efeito da refrigeração na manutenção das amostras após o processo de fervura, alíquotas de 250mL foram refrigeradas a 7°C após 20 minutos da fervura e analisadas após 6, 8, 10 e 12 horas para a contagem de *B. cereus*.

Contagem de *B. cereus*

O número presuntivo de *B. cereus* foi determinado pelo método de contagem direta em placas¹³. Foram realizados plaqueamentos pela técnica de espalhamento em superfície no meio Agar Manitol-Gema de Ovo-Polimixina (MYP-A) utilizando-se alça de Drigalsky, espalhando-se 0,1mL do leite e de cada diluição em placas de Petri. As placas foram incubadas a 30°C/24-48 horas para a contagem das colônias típicas (colônias esféricas, com bordas perfeitas, planas, secas e cerosas, rodeadas por um grande halo róseo de precipitação). Todas as colônias típicas de *B. cereus* foram isoladas para serem submetidas às provas bioquímicas para a caracterização da espécie.

Os seguintes exames morfológicos e bioquímicos foram realizados, visando confirmar a presença de *B. cereus*: coloração

de Gram, coloração de esporos, utilização anaeróbia de glicose, decomposição de tirosina, redução de nitrato e reação de Voges Proskauer.

As colônias formadas por bastonetes Gram-positivos, esporulados, móveis, capazes de fermentar a glicose anaerobicamente com produção de ácido, reduzir o nitrato a nitrito, produzir acetilmetilcarbinol a partir da glicose e decompor tirosina foram consideradas como de *B. cereus*¹³.

Uma vez identificados, os isolados caracterizados como *B. cereus* tiveram suas contagens expressas como unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL) das amostras de leite examinadas. Foi calculado o número de UFC/mL em função do número de colônias típicas, diluição inoculada e percentagem de colônias confirmadas¹⁴.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nas contagens de *B. cereus* estão apresentados na Tabela 1, revelando a presença deste patógeno em 46 das 75 amostras de leite analisadas (incidência de 61,33%).

Verifica-se uma variação acentuada na ocorrência desse microrganismo em função do tipo de leite, com as maiores incidências ocorrendo nos leites tipo B e C, que apresentaram, respectivamente, 88% e 80% das amostras contaminadas. Estes valores foram superiores a percentagem de contaminantes encontrados das amostras de leite cru (40%), que não é submetido a nenhum tipo de tratamento térmico a fim de diminuir a população contaminante inicial. Não foi detectada a presença de *B. cereus* nas amostras de leite pasteurizado tipo A e nas amostras de leite UAT analisadas antes do tratamento térmico.

Essas diferenças na ocorrência da contaminação por *B. cereus* se devem, provavelmente, às melhores condições de higiene na ordenha e a refrigeração da matéria-prima, adotadas na produção de leite tipo A, o que contribui para a redução da contaminação e para o controle da multiplicação dos microrganismos eventualmente presentes. As diferenças na incidência de contaminação por *B. cereus* nas amostras de leite cru e leites pasteurizados do tipo B e C podem ser decorrentes de falhas no processo de pasteurização, contaminação pós-pasteurização e/ou esporos de *B. cereus* provenientes do leite cru (matéria-prima excessivamente contaminada). Também deve-se considerar que no processo de pasteurização comercial do leite, efetuado a 70-75°C durante 15 segundos, as células vegetativas dos microrganismos, exceto alguns termodúricos, são inativadas. Portanto, a presença de *B. cereus* nas amostras analisadas poderia ser devida unicamente aos esporos presentes na matéria-prima que sobreviveram e até foram ativados durante a pasteurização com a conseqüente germinação e posterior multiplicação no leite; ou então, à recontaminação do produto pós-pasteurização por células ou esporos aderidos aos equipamentos e formando biofilmes.

A Tabela 2 mostra os dados compilados da incidência de *B. cereus* e respectivas médias e desvio padrão nos diferentes

tipos de leite.

Com relação aos valores encontrados, a maior incidência do microrganismo ocorreu nas amostras de leite pasteurizado tipo C, seguido pelas amostras de leite pasteurizado tipo B.

Os relatos de incidência de contaminação por *Bacillus* em leite têm despertado grande demanda por pesquisas.

Silveira et al.¹⁵ analisaram amostras de leite pasteurizado tipos A, B e C na cidade de São Paulo e encontraram presença do *B. cereus* em 28,7% de 430 analisadas.

Já Griffiths¹⁶, no Canadá, avaliou a ocorrência de *Bacillus* spp em amostras de leite cru e pasteurizado, constatou que, de 150 amostras analisadas, 105 (70%) apresentaram uma microbiota representativa do gênero *Bacillus*, sendo cepas de *B. cereus* detectadas em 37,3% das amostras de leite cru e 36,5% das de leite pasteurizado. Granum, Brynestad e Kramer¹⁷ verificaram que, de 85 colônias de *B. cereus* isoladas de produtos lácteos (leite desnatado, leite semi-desnatado e creme de leite), 59% se revelaram enterotoxigênicas e 15% psicrotróficas.

Rangasamy, Iver e Roginski¹⁸, ao estudarem 91 amostras de leite e produtos lácteos coletados em Vitória, Austrália, encontraram *B. cereus* em 26,4% das amostras analisadas, exceto em amostras de leite UAT. Schoken-Iturrino, Filho e Dimenstein⁷ analisaram 32 amostras de leite longa vida de quatro marcas diferentes na região de Ribeirão Preto, SP, onde evidenciaram a presença de bactérias do gênero *Bacillus* em 19 (59,37%).

Te Giffel et al.¹⁹ investigaram 334 amostras de leite pasteurizado semi-desnatado, sendo encontrada, em 40% das

Tabela 1. Ocorrência de *Bacillus cereus* em amostras de leites crus, pasteurizados e UAT coletados no comércio da região de Piracicaba/SP, durante os meses de janeiro a junho de 2007.

Tipos de leite	Amostras analisadas	Amostras contaminadas	
		Nº	%
Cru	10	4	40
A	10	0	0
B	25	22	88
C	25	20	80
UAT	5	0	0
Total	75	46	61,33

Tabela 2. Incidência de *B. cereus* nas amostras de leite analisadas.

Tipos de leite	Média (UFC/mL)	Desvio-padrão
Cru	7,2 x 10 ²	2,2 x 10 ³
A	< 10	0
B	8,4 x 10 ²	2,1 x 10 ³
C	1,3 x 10 ⁴	5,0 x 10 ⁴
UAT	< 10	0

amostras, a presença presuntiva de *B. cereus* em baixas contagens, variando de 50 a 5000 UFC/mL.

Lin et al.²⁰ realizaram o procedimento de rastreamento de contaminação por *B. cereus* em usina de leite através de amostragem do leite em vários pontos durante o processamento do mesmo, além de coleta de amostras de superfícies do ambiente por meio de *swab*. Os autores encontraram baixo número de células vegetativas de *B. cereus* no leite cru, porém foi detectado números na faixa de 10^5 UFC/mL de esporos dessa bactéria. Essa contagem foi similar à das células vegetativas encontradas no leite pasteurizado. Os resultados obtidos sugerem que a maior fonte de contaminação por *B. cereus* em leite pasteurizado vem a ser os esporos de *B. cereus* do leite cru. A contaminação pós-pasteurização através das linhas de processamento ou ambiental teria pouca importância na contaminação do produto. Com o desenvolvimento das técnicas de caracterização molecular Svensson et al.²¹ utilizaram, com sucesso, a técnica de RAPD – PCR para uma prolongada investigação de fontes de contaminação em usina de leite. Grandes grupos (*clusters*) de isolados geneticamente relacionados foram encontrados no silo de armazenamento pré-pasteurização e no produto final durante os dois anos da duração da coleta, indicando um provável foco de contaminação persistente neste silo.

Rezende²² citado por Sanchez²³ analisou 120 amostras de leite integral UAT produzidas no Brasil, na procura por espécies do grupo *B. cereus*. Seus resultados indicaram uma positividade em 34,17% do total de amostras analisadas, sugerindo a necessidade de melhorias nas condições higiênico-sanitárias adotadas no processo térmico comercial do produto.

Estudo realizado por Cardoso²⁴ revelou a presença do *B. cereus* em 48,3% de 240 amostras de leite A, B e C analisados na região de Campinas. Foram detectadas baixas populações, na faixa de 10^2 UFC/mL, com maior frequência no leite tipo C. Não houve detecção de cepas psicrotólicas nas amostras analisadas. Para Cardoso²⁴, esse resultado é compatível com aqueles obtidos por autores internacionais em que a presença de *B. cereus* em leite pasteurizado oscila entre 36% e 56%. Rezende, Rossi e Amaral²⁵ ao analisarem 120 amostras de quatro diferentes marcas de leite UHT encontraram bactérias do grupo do *Bacillus cereus* em 34,1% das amostras estudadas.

Ao compararmos com a literatura os valores de incidência do *B. cereus* nas amostras de leite pasteurizado do presente trabalho, verifica-se que das 60 amostras analisadas, em 42 o *B. cereus* estava presente, ou seja, 70% das amostras de leite pasteurizado estavam positivas para este microrganismo, indicando uma ocorrência elevada para esse tipo de leite. Já para as amostras de leite UAT, a incidência ficou bem abaixo da literatura consultada, uma vez que em 100% das amostras analisadas estavam com uma contagem média de *B. cereus* <10 UFC/mL. Com relação às amostras de leite cru, os valores encontraram-se próximo (40%) de outros pesquisadores.

Em seguida, as amostras foram submetidas à fervura para dar seguimento a segunda etapa do trabalho. A média da temperatura de fervura de todos os tipos de leite foi de 100,01°C e a temperatura das amostras mantidas à temperatura ambiente após 1 hora de fervura foi de 31,59°C.

Nota-se que, após as amostras serem submetidas à fervura houve um aumento significativo na população do

Tabela 3. Contagens médias de *B. cereus*, temperatura e pH médio em cada tempo analisado.

Tipos de leite	Variável	1h	2h	4h	6h	8h	10h	12h
Cru	T(°C)	33,0	29,0	27,5	28,3	27,0	27,0	27,0
	UFC/mL	3,3x10	3,3x10	2,3x10 ²	2,2x10 ²	8,4x10 ²	1,1x10 ⁴	6,6x10 ⁴
	pH	6,2	6,2	6,1	5,6	5,4	5,4	5,4
A	T(°C)	31,1	29	28,8	28,8	28,1	27,2	26,7
	UFC/mL	<10	<10	<10	<10	<10	8,8x10	3,5x10 ³
	pH	6,2	6,2	6,2	5,9	5,8	5,9	5,7
B	T(°C)	30,9	29,3	30,0	29,5	28,0	27,0	26,6
	UFC/mL	0,3x10	0,6x10	0,5x10	4,2x10 ²	1,2x10 ⁴	1,2x10 ⁵	7,4x10 ⁵
	pH	6,3	6,3	6,4	6,3	6,2	6,2	6,2
C	T(°C)	30,8	29,3	27,8	27,7	27,7	26,8	26,0
	UFC/mL	1,7x10	1,7x10	1,4x10 ²	8,6x10 ³	1,5x10 ⁴	1,5x10 ⁵	5,9x10 ⁵
	pH	6,4	6,4	6,3	6,1	6,0	5,9	5,9
UAT	T(°C)	32	30,8	30,6	31,0	30,5	29,3	29,0
	UFC/mL	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
	pH	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8	5,9

microrganismo a partir da sexta hora (notadamente nos leites pasteurizados B e C), uma vez que com a fervura, os esporos sobreviventes germinaram, aumentando, conseqüentemente, o número de células vegetativas. A Tabela 3 apresenta as contagens médias de *B. cereus* e os respectivos valores médios de temperatura e pH em cada tempo analisado, para as amostras mantidas à temperatura ambiente após o processo de fervura.

Analisando a Tabela 3, nota-se que nas amostras de leites pasteurizados tipos B e C, bem como nas amostras de leite cru analisadas a manutenção a temperatura ambiente por 10 a 12 horas após o processo de fervura resultou em populações de *B. cereus* de 10^4 e 10^5 UFC/mL. Estes números elevados de *B. cereus* podem se constituir em risco para a saúde do consumidor. As amostras de leite pasteurizado tipo A analisadas atingiram contagens máximas de *B. cereus* de $3,5 \times 10^3$ UFC/mL após 12 horas do processo de fervura e mantidas à temperatura ambiente. Estes números baixos de contaminantes provavelmente não se constitui em risco para a saúde. As amostras de leite UAT analisadas não se apresentaram contaminadas por *B. cereus* em nenhum dos tempos em que foram analisadas, o que demonstra a eficácia do processo de ultrapasteurização do leite tipo longa vida. Observa-se que, as medidas de temperatura e pH não variaram entre as amostras analisadas a partir da 2ª hora após a fervura e se encontram em faixa considerada adequada para o crescimento de *B. cereus*.

Na Tabela 4 podem ser observadas as contagens médias de colônias *B. cereus* e os respectivos valores médios de

temperatura e pH das amostras analisadas após a fervura e manutenção a 7°C da 6ª até a 12ª hora.

Fica evidente o benefício da manutenção das amostras de leite após a fervura sob refrigeração, uma vez que em nenhuma das amostras analisadas, a população de *B. cereus* foi acima de $8,1 \times 10^2$ UFC/mL.

É interessante frisar que a temperatura observada nos refrigeradores dos pontos de comercialização onde as amostras de leite pasteurizado tipos A, B e C foram obtidas, encontrava-se entre 10 e 12°C, portanto, acima da temperatura recomendada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para leite e derivados, que deve ser 7-8°C.

CONCLUSÃO

Apesar da legislação brasileira atual não estabelecer padrões para a contagem de *B. cereus* em leite fluido, de acordo com os resultados obtidos, verificou-se que amostras de leites pasteurizados tipos B e C apresentaram-se com populações de 10^4 - 10^5 UFC/mL. Estes índices de contaminação considerados elevado para leites caracterizados como pasteurizados evidenciam a precariedade higiênica na cadeia produtiva do leite. Amostras de leite cru, pasteurizados tipos B e C mantidas à temperatura ambiente após a fervura (resfriamento lento) atingiram números de *B. cereus* capazes de desencadear um quadro gastroentérico. Este fato é minimizado mantendo o

Tabela 4. Contagens médias de *B. cereus*, temperatura e pH médio das amostras analisadas da 6ª a 12ª hora após a fervura e sob refrigeração.

Tipos de leite	Variável	6h	8h	10h	12h
Cru	T(°C)	10,0	9,0	8,0	8,0
	UFC/mL	$5,0 \times 10$	$5,3 \times 10$	$7,6 \times 10$	$7,3 \times 10^2$
	pH	5,5	5,5	5,5	5,5
A	T(°C)	10,2	10,0	9,4	9,0
	UFC/mL	<10	<10	<10	<10
	pH	5,4	5,5	5,5	5,5
B	T(°C)	10,2	9,5	9,0	8,3
	UFC/mL	<10	$0,2 \times 10$	$2,8 \times 10^2$	$8,1 \times 10^2$
	pH	5,2	5,3	5,2	5,2
C	T(°C)	9,7	9,5	9,0	8,5
	UFC/mL	$0,5 \times 10$	$1,3 \times 10$	$7,8 \times 10$	$1,8 \times 10^2$
	pH	5,3	5,3	5,3	5,3
UAT	T(°C)	9,0	9,0	9,0	8,0
	UFC/mL	<10	<10	<10	$0,3 \times 10$
	pH	5,7	5,8	5,8	5,9

produto em condições de temperatura abaixo de 10°C, em combinação com pH e atividade de água, aliado ao emprego de uma matéria-prima de boa qualidade e a realização correta dos procedimentos industriais.

Como recomendação, em função dos resultados obtidos na presente pesquisa, deve ser enfatizada a necessidade de rápido resfriamento do leite após a fervura e manutenção do mesmo a temperatura de refrigeração, para evitar que esporos sobreviventes de *B. cereus* germinem levando a multiplicação das células vegetativas com riscos de toxinfecção alimentar.

REFERÊNCIAS

1. Bartoszewicz M, Hansen BM, Swiecicka I. The members of the *Bacillus cereus* group are commonly present contaminants of fresh and heat – treated milk. *Food Microb.* 2008.
2. Freitas JA, Oliveira JP, Galindo GAR. Avaliação da qualidade higiênico-sanitária do leite exposto ao consumo na região metropolitana de Belém-PA. *Rev Inst Adolfo Lutz.*2005; 264(2): 212-8.
3. Tavares SG. Avaliação das condições microbiológicas de leite pasteurizado tipos A, B e C, comercializados na cidade de Piracicaba, SP (Dissertação de mestrado) Piracicaba, São Paulo: Universidade de São Paulo, 1996. 84 pp.
4. Quintana RC, Carneiro LC. Avaliação do leite *in natura* comercializado clandestinamente no município de Morrinhos, GO. *Rev Inst Adolfo Lutz.*2006; 65(3):194-8.
5. Christiansson A, Bertilsson J, Svensson B. *Bacillus cereus* spores in raw milk: factors affecting the contamination of milk during the grazing period. *J Dairy Sci.*1998; 82:305-14.
6. Rosslund E, Andersen Borge GI, Langsrud A, Sorhaug T. Inhibition of *Bacillus cereus* by strains of *Lactobacillus* and *Lactococcus* in milk. *Int J Food Microbiol.*2003; 89:205-12.
7. Schoken-Iturrino RP, Filho AN, Dimenstein AR Ocorrência de bactérias esporuladas dos gêneros *Bacillus* e *Clostridium* em amostras de leite longa vida. *Hig Aliment.*1996; 10(42): 25-7
8. Lin S, Schraft H, Odumeru JA, Griffiths MW. Identification of contamination sources of *Bacillus cereus* in pasteurized milk. *Int J Food Microbiol.*1998;43:159-71.
9. Becker H, Schaller G, Wiese W. Von, Terplan G. *Bacillus cereus* in infant foods and dried milk products. *Int J Food Microbiol.*1994;23: 1-15.
10. Mäntynen V, Lindström K. A Rapid PCR-Based DNA Test for enterotoxic *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol.*1998; 64(5):1634-9.
11. Agata N, Ohta M, Yokoyama K. Production of *Bacillus cereus* emetic toxin (cereulide) in various foods. *Int J Food Microbiol.*2002; 73:23-7.
12. Granum PE. *Bacillus cereus*. In: Doyle, MP, Beuchat, LR, Montville, TJ, editors. *Microbiología de los alimentos: fundamentos y fronteras*. Zaragoza: Acribia; 1997. p. 343-353.
13. Silva N da, Junqueira VCA, Silveira, NFA, Taniwaki, MH, Gomes, AR. *Bacillus cereus*. In: Silva N da, Junqueira VCA, Silveira, NFA, Taniwaki, MH, Gomes, AR *Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos*. São Paulo: Livraria Varela; 2007. p.149-160.
14. International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF). *Bacillus cereus*. In:ICMSF. *Microrganismos de los Alimentos: características de los patógenos microbianos*. Zaragoza: Acribia; 1996. p. 25-42.
15. Silveira VV, Sakuma H, Duarte M, Rodas MAB, Saruwatari JK, Chicourel EL Avaliação das condições físico-químicas e microbiológicas do leite pasteurizado consumido na cidade de São Paulo. *Rev Inst Adolfo Lutz.*1989; 49(1): 19-25.
16. Griffiths MW. *Bacillus cereus* in liquid milk and other milk products. *Bul Int Dairy Fed.*1992; 275: 36-9.
17. Granum PE, Brynestad S, Kramer JM. Analysis of enterotoxin production by *Bacillus cereus* from dairy products, food poisoning incidents and non-gastrointestinal infections. *Int J Food Microbiol.*1993; 17(4): 269-79.
18. Rangasamy PN, Iyer M, Roginski H. Isolation and characterization of *Bacillus cereus* in milk and dairy products manufactured in Victoria. *Aust J Dairy Technol.*1993; 48(2): 93-5.
19. Te Giffel MC, Beumer RR, Granum PE, Rombouts FM. Isolation and characterization of *Bacillus cereus* from pasteurized milk in household refrigerators in the Netherlands. *Int J Food Microbiol.*1997;34(3):307-18.
20. Lin S, Schraft H, Odumeru JA, Griffiths MW. Identification of contamination sources of *Bacillus cereus* in pasteurized milk. *Int J Food Microbiol.*1998; 43:159-71.
21. Svensson B, Monthán A, Shaheen R, Andersson MA, Salkinoja-Salonen M, Christiansson A. Occurrence of emetic toxin producing *Bacillus cereus* in the dairy production chain. *Int Dairy J.*2006; 16:740-76.
22. Rezende NCM. Ocorrência de bactérias do grupo *B. cereus* e de microrganismos indicadores em leite UHT integral (Dissertação de mestrado). Jaboticabal, São Paulo: Universidade Estadual Paulista, 1998. 82pp.
23. Sanchez CPP. Ocorrência de *Bacillus cereus*, avaliação de sua resistência térmica em sistema contínuo e seu controle em leite UHT (Tese de doutorado). Campinas, São Paulo: Universidade Estadual de Campinas, 2005. 255pp.
24. Cardoso ALMP. Ocorrência, multiplicação e produção de toxina diarreica por cepas mesófilas e psicrotróficas de *Bacillus cereus*, em leite pasteurizado (tese de doutorado). Campinas, São Paulo: Universidade Estadual de Campinas, 2000. 95pp.
25. Rezende NCM, Rossi JOD, Amaral LA. Ocorrência de bactérias do grupo do *Bacillus cereus* em leite UHT integral (ultra-high-temperature). *Rev Bras Ciênc Vet.* 2000; 7(3): 162-6.

Aspectos sanitários da comercialização de pescado em feiras livres da cidade de São Paulo, SP/Brasil

Sanitary aspects of fish commercialization in street markets of the city of São Paulo, SP/Brazil

RIALA6/1177

Miriam Lopes da SILVA¹, Glavur Rogério MATTE¹, Maria Helena MATTE^{1*}

*Endereço para correspondência: ¹Laboratório de Saúde Pública, Departamento de Prática de Saúde Pública, Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo. Av. Dr Arnaldo, 715, São Paulo, SP/Brasil CEP 01246-904. Telefone: (0**11)3061 7753. Fax: (0**11)3083 3501. E-mail: mhmatte@usp.br

Recebido: 26/08/2008 – Aceito para publicação: 30/09/2008

RESUMO

O comércio de peixe e produtos derivados tem crescido substancialmente nas últimas décadas. Contudo, os procedimentos de preparo, de manipulação e de conservação, realizados sem precauções sanitárias, os tornam potencial risco ao consumidor, principalmente aos apreciadores de pratos à base de peixe cru. Foram avaliadas as práticas higiênico-sanitárias cotidianas realizadas pelos feirantes e a qualidade microbiológica de peixes comercializados em feiras livres. Vinte amostras de peixe foram avaliadas por meio de análises microbiológicas e os dados obtidos foram comparados aos aspectos higiênico-sanitários das respectivas feiras-livres. Para avaliação dos aspectos sanitários foi utilizado o roteiro baseado em legislação específica, enquanto que as análises microbiológicas foram feitas de acordo com as normas estabelecidas pela ANVISA. Das 20 amostras de pescado, nove (45,0%) foram consideradas impróprias para o consumo de peixe cru em função dos níveis de coliformes termotolerantes e/ou da presença de *Escherichia coli* e *Vibrio cholerae* não-O1/não-O139. Os resultados sugerem que manipulação e higiene inadequadas, observadas em feiras livres, podem facilitar a transmissão de agentes patogênicos aos consumidores.

Palavras-chave. peixe, feiras livres, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, DTA, saúde pública.

ABSTRACT

The sale of fish products and their derivatives has increased substantially in recent decades. However, preparation, handling and preservation protocols undertaken without hygienic considerations often make these hazardous to consumers, mainly to those who appreciate the raw fish dishes. Sanitary practices and microbiological quality of fish in street markets was evaluated. Twenty fish samples were analyzed microbiologically and resulting data were correlated to sanitary aspects of respective street markets. A checklist protocol based on specific legislation was used and microbiological analyses were undertaken according to norms established by ANVISA. Of the twenty samples, nine (45.0%) were considered unfit for consumption as raw fish because of levels of thermotolerant coliforms and/or the presence of *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* non-O1/non-O139. Results suggest that manipulation and inadequate hygiene observed in street markets can facilitate the transmission of pathogens to consumers.

Key words. fish, street markets, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, food-borne, public health.

INTRODUÇÃO

Peixes e frutos do mar representam um terço do consumo mundial de proteína¹ sendo que nas últimas quatro décadas o consumo mundial *per capita* de pescado cresceu em média de 9 para 16 kg/ano. Esse aumento foi registrado também no Brasil, onde a média de consumo esteve entre 5 e 10 kg/ano, no período de 2001 a 2003². A produção pesqueira mundial e brasileira ultrapassou, em 2004, a soma de 141 milhões e um milhão de toneladas, respectivamente^{3,4}. A ampliação da produção pesqueira corresponde ao aumento do consumo de peixes principalmente em países em desenvolvimento, como alternativa ou em substituição a outras fontes de proteínas^{5,6}. Além disso, fatores como práticas alimentares mais saudáveis, controle de peso, globalização cultural, dentre outros, vêm contribuindo para que o consumo de peixe cru, antes restrito aos países orientais, aumente nos últimos anos^{7,8}.

Dentre algumas das qualidades que constroem a boa reputação da carne de peixe estão o alto nível protéico, a fácil digestibilidade, a baixa taxa de gordura e ainda a benéfica presença dos ácidos graxos poliinsaturados ômega-3^{9,10}. Apesar das inúmeras qualidades, o peixe é muito suscetível à deterioração microbiana devido à atividade de água elevada, ao teor de gorduras facilmente oxidáveis e ao pH próximo da neutralidade (pH 6,6-6,8), fatores que favorecem o desenvolvimento de bactérias¹¹, que podem causar doença no homem.

Diversos países conhecem o impacto na saúde e o peso monetário que as Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs) representam em suas comunidades^{12,13,14,15}. Nos países em desenvolvimento, como o Brasil, as DTAs são corriqueiras e, talvez por isso, desvalorizadas principalmente, entre a população de baixo nível sócio-econômico¹⁶. Apesar de subestimados, uma vez que não existem dados confiáveis sobre o número de casos de DTAs no Brasil^{17,18}, os custos com hospitalizações, entre 1999 e 2004, chegaram a 280 milhões de reais, com média de 46 milhões de reais por ano¹⁷.

Além disso, fatores como tempo de armazenagem e refrigeração inapropriadas, manipulação e preparação inadequadas, podem favorecer a proliferação de microrganismos. Esses fatores podem estar presentes em toda a cadeia de processamento desde a captura ou despesca, passando pelo ponto de venda, até a mesa do consumidor, tornando-o um risco para a saúde, principalmente, de quem o consome cru^{1,19}.

Peixes podem ser adquiridos em diversas formas de comércio, especializados ou não, como peixarias, sacolões, supermercados e feiras livres. Essa última, apesar de tradicional, é o tipo de varejo com maior fragilidade no que diz respeito à conservação desse alimento, uma vez que não possuem equipamentos que assegurem a refrigeração e a manipulação ideais, enquanto exposto à venda.

A feira livre é uma herança da tradição moura, trazida pelos ibéricos, enriquecida pelos africanos, que está presente na maioria das cidades brasileiras²⁰. Atualmente, a feira livre em São Paulo é uma modalidade de varejo semanal, ao ar livre,

organizada e fiscalizada pela prefeitura e voltada para o abastecimento de gêneros alimentícios, estando presentes em praticamente toda a malha urbana, das zonas residenciais nobres aos bairros mais periféricos²¹.

O objetivo do presente estudo foi avaliar os aspectos higiênico-sanitários de feiras livres através da observação das práticas cotidianas dos feirantes e da qualidade microbiológica dos pescados.

MATERIAL E MÉTODOS

As amostras foram realizadas mensalmente, pelo período de 6 meses, em cinco feiras de quatro regiões da cidade de São Paulo. Os dados, estruturados por meio de roteiro previamente estabelecido, foram coletados através da observação não participante da estrutura das feiras livres e práticas dos feirantes. O roteiro foi elaborado com base nas exigências contidas no Decreto 45.674 de 29/12/2004, que dispõe sobre o funcionamento das feiras livres no município de São Paulo, e enfatizado nas exigências do Grupo 11 (G11), no qual estão inseridos os pescados de toda espécie, frescos ou resfriados²², totalizando 20 itens baseados no tripé equipamento/feirante/pescado (Quadro 1). Para cada observação positiva foi atribuído 0,5 e 0,25 créditos aos itens constantes na coluna "A" e "B", respectivamente, de maneira que cada amostra pudesse alcançar 10 créditos. Às observações negativas não foram atribuídos créditos.

Paralelamente, foram adquiridas amostras de peixes usualmente empregados no preparo de pratos à base de peixe cru, com aproximadamente 500g. As amostras mantidas na embalagem original fornecida pelo feirante foram acondicionadas em recipiente isotérmico, imediatamente encaminhadas para o laboratório e processadas no mesmo dia da aquisição, de acordo com as normas da *American Public Health Association* (APHA) e analisadas por meio dos padrões microbiológicos recomendados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)^{23,24}.

RESULTADOS

Foram realizadas 20 amostras em cinco feiras, sendo no mínimo 2 amostras em cada barraca e sempre que possível em datas diferentes. Por questões logísticas a região norte não foi amostrada.

Aspectos higiênico-sanitários

Quanto aos aspectos gerais do ambiente da feira, não foram observadas instalações sanitárias em 100% delas. A disponibilidade de água, armazenada pelo feirante, foi constatada em 100% das barracas, porém, em todas elas, o mesmo recipiente de água era destinado à limpeza do pescado, utensílios e mãos. A desorganização e a falta de higiene nas bancas de pescado foram também observadas em todos locais

amostrados. A matrícula do feirante afixada em local visível foi observada em 5 (25%) das barracas. Em todos os locais amostrados os feirantes manipularam o peixe e dinheiro ao mesmo tempo.

Não foi possível observar o tipo de calçado utilizado e o resultado das observações quanto ao uso da vestimenta está apresentado na Figura 1. Quanto à proteção nos cabelos, foram observados feirantes usando cabelos compridos e sem proteção em 15% dos locais amostrados, sendo que em 10% sem qualquer contenção. Cabelos curtos com uso de gorro/boné foram observados em 25% e cabelos curtos, porém, sem proteção em 60% dos locais amostrados. Cinco (25%) feirantes estavam usando luvas descartáveis, dos quais, 4 tinham aspecto sujo. Dos 15 (75%) feirantes que não usavam luvas, 11 apresentavam as mãos sujas, das quais 20% portavam unhas compridas e esmaltadas. Dessas, 10% faziam uso de anéis. Portanto 75% dos feirantes tocaram o peixe com as mãos sujas no momento da venda.

A comercialização de pescado exposto sem proteção de vitrine foi observada em 11 (55%) dos locais amostrados (Quadro 2). A existência de vitrine foi observada em 9 (45%) dos locais amostrados, porém, 3 (15%) delas não eram usadas de forma adequada. Em 100% dos locais observados havia pescado exposto já fracionado e em 10% destas, eram oferecidos na forma de *sashimi* (pedaços finos de peixe cru), embalados em

bandeja de isopor, protegidos por filme plástico, sem rótulo. Em 100% dos locais amostrados o peixe não estava coberto por gelo, em 60% (12/20) o pescado era mantido sob uma camada de gelo, em 30% (6/20) era mantido sob anteparo de plástico rígido e em 10% (2/20) esse anteparo era de isopor. A procedência dos peixes não foi observada em nenhum dos locais amostrados, sendo informada pelo feirante quando questionado. Em nenhum dos locais amostrados havia identificação de todos os produtos expostos à venda. O uso de utensílios adequados foi observado em 100% dos locais, porém superfícies de corte e facas encontravam-se mal conservadas e sujas em 100% das observações.

Aspectos bacteriológicos

Foram adquiridas 9 amostras de salmão, 8 de atum, 1 de badejo e 2 amostras de *sashimi*, oferecidas em bandejas, com três espécies de peixes cada, porém sem identificação do conteúdo. Dentre as 20 amostras analisadas 13 (65%) continham microrganismos indicadores, patógenos e/ou potencialmente patogênicos. A contagem de coliformes termotolerantes variou entre $<3 \times 10^0$ a $4,3 \times 10^3$ NMP.g⁻¹ e apresentou valores superiores a 10^2 NMP.g⁻¹ em 5 (25%) das amostras. *Escherichia coli* foi isolada de 2 (10%) amostras analisadas, sendo que uma das amostras positivas para *E. coli* possuía valores para coliformes termotolerantes dentro dos limites preconizados pela

Quadro 1. Roteiro utilizado na avaliação de aspectos higiênico-sanitários para atribuição de créditos aos aspectos observados.

Pontos Observados	A	B
Equipamento	Existência de sanitários	-
	Água potável disponível	Para higiene dos produtos Para higiene dos feirantes
	Ambiente organizado	-
	Ambiente limpo	-
	Matrícula de feirante visível Pessoa exclusiva para cobrar	- -
Feirante	Uso do avental	Uso adequado
	Uso de proteção nos cabelos	Asseio/higiene Uso adequado
	Uso de luva descartável	Contido/solto Uso adequado Asseio/higiene
Pescado	Existência de vitrine	Utilização adequada Conservada e limpa
	Oferta adequada do produto	-
	Produto refrigerado	-
	Produto com procedência/identificação	-
	Uso de utensílios adequados	Utensílios conservados Utensílios limpos
Atribuição de créditos às respostas: afirmativas - coluna "A" = 0,5 e coluna "B" = 0,25; negativas = 0.		

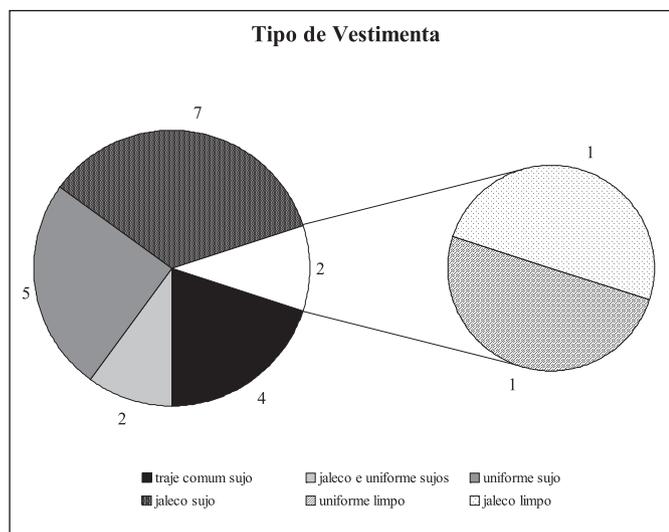


Figura 1 Resultado da observação da vestimenta utilizada pelos feirantes segundo, tipo e aspecto higiênico.

legislação²⁴, portanto 6 (30%) das amostras estavam impróprias para o consumo. *Vibrio cholerae* não-O1/não-O139 foi isolado em 3 (15%) das amostras de peixe analisadas. *Vibrio* spp. foi também isolado em 3 (15%) das amostras. *Staphylococcus aureus* foi isolado, porém dentro dos limites de tolerância estabelecidos pela legislação. *Salmonella* e *Vibrio parahaemolyticus* não foram encontrados no presente estudo. Dentre os 6 locais amostrados, onde foi observado o uso adequado da vitrine, os resultados bacteriológicos foram negativos em dois deles. Em uma mesma feira, onde foi isolado *Vibrio cholerae* não-O1/não-O139, de barracas diferentes foram identificadas outras espécies de *Vibrio* de interesse em saúde pública, em diferentes datas de coleta. Nas barracas onde foram isolados coliformes termotolerantes acima dos limites preconizados pela legislação, na primeira coleta, mantiveram o resultado na segunda coleta (Quadro 2). *Escherichia coli* foi isolada em duas amostras, sendo uma onde a barraca possuía vitrine de proteção e outra sem vitrine, porém em ambas o manipulador não usava luvas descartáveis e as mãos estavam sujas.

DISCUSSÃO

Segundo a legislação vigente, a organização e a manutenção da higiene do local de trabalho são de responsabilidade do feirante²⁵, porém, as feiras livres mostram uma generalizada falta de organização, refletindo em falta de higiene. Além disso, equipamentos públicos como, sanitários, água potável e energia elétrica, não estão disponíveis²⁶, para feirantes e/ou consumidores, proporcionando maior risco de contaminação cruzada. A presença de instalações sanitárias

em feiras livres está prevista na legislação municipal desde 1988²⁷ e foi de responsabilidade da prefeitura até 1998, quando passou a ser encargo dos feirantes²⁸ sem nunca ter sido implantada pelo poder municipal.

No G11 é recomendado que haja água potável disponível para limpeza de utensílios e mercadoria, de fonte diferente daquela utilizada para a higiene das mãos, porém isso não foi observado. A utilização de um único recipiente de água para o uso durante a comercialização do pescado é outra prática que possibilita a contaminação cruzada e, portanto acrescenta risco à saúde do consumidor. Até mesmo a água utilizada para a produção de gelo, pode ser fonte de coliformes termotolerantes e *E. coli*^{29,30}.

Manipuladores de alimentos possuem um papel importante na disseminação de microrganismos, por essa razão, embora não esteja previsto em lei, incluímos no protocolo a observação sobre a existência de uma pessoa exclusiva para a manipulação de dinheiro. O estudo observou que feirantes do G11 não acatam integralmente a padronização de vestimentas²² e falham quanto ao asseio e higiene pessoais, bem como, no cuidado com a manipulação do pescado.

A utilização incorreta dos parâmetros tempo e temperatura é o fator mais importante para a preservação da qualidade dos alimentos, uma vez que contribuem diretamente no desenvolvimento de microrganismos. Segundo a legislação, em feiras livres o pescado deve ser transportado em veículo isotérmico, mantido sob refrigeração em vitrines fechadas por meio de gelo picado, produzido com água potável proveniente de estabelecimentos legalizados. A maioria das amostras de pescado estava exposta ao ambiente (sem vitrine ou com vitrine inadequada), sujeita ao contato com insetos, sujidades, manipulação de terceiros, dentre outras fontes de contaminação. Outro problema observado foi o fracionamento do pescado que só é permitido na presença do consumidor, porém eram oferecidos em filés, em posta ou em pedaços, inclusive na forma de *sashimi* (pedaços finos de peixe cru), previamente embalados, desprovidos de quaisquer informações ao consumidor. A prática de não manter o pescado com cobertura de gelo picado, foi verificada nesse estudo e em outros^{26,31}, demonstrando que essa norma vem sendo desrespeitada há muito tempo. De modo geral foi observado que utensílios e equipamentos utilizados pelos feirantes estão em conformidade com a legislação, porém invariavelmente, estes se encontravam mal conservados e/ou sujos, potencializando o risco de contaminação.

Peixes e frutos do mar representam um importante veículo de infecção gastrointestinal em todo mundo^{32,33,34}. No Brasil, peixes e frutos do mar foram implicados em 1% e 0,37%, respectivamente, dos surtos de DTAs¹⁷. É provável que estes números não reflitam a realidade e se devam a falta de notificação, uma vez que o Sistema Nacional de Vigilância Epidemiológica de DTA (VE-DTA) ainda não esteja totalmente implantado. Desde a implantação do Sistema Nacional VE-DTA em 1999 até 2004, foram notificados 3.737 surtos de doenças de

Quadro 2. Número de créditos atribuídos na avaliação de aspectos higiênico-sanitários e resultado microbiológico, das amostras, segundo feira livre e barraca.

IDENTIFICAÇÃO DA FEIRA	BARRACA	N.º DA AMOSTRA	EQUIPAMENTO						FEIRANTE						PESCADO						TOTAL DE CRÉDITOS	ESPÉCIES ISOLADAS		
			Existência de sanitários		Água disponível	Ambiente organizado	Ambiente limpo	Matrícula visível	Pessoa para cobrar	Uso de Avental		Proteção nos cabelos		Luva descartável		Existência de vitrine		Oferta adequada	Cobertura de gelo	Procedência/identificação			Utensílios adequados	
			Produto	Feirante						Adequação	Limpeza	Adequação	Contenção	Adequação	Limpeza	Adequação	Conservação						Conservação	Conservação
					0	0,50	0	0,25	0									0,25	0	0,25				
1	a	1	0	0,50	0	0	0	0	0,50	0	0,50	0,50	0	0	0	0	0	0	0	0,50	0	4,25	Coliformes*	
			0	0					0,25	0,25	0	0,25												0,25
	2	0	0	0,50	0	0	0	0	0,50	0	0	0,50	0	0	0	0	0	0	0	0,50	0	2,75	Coliformes*, <i>E.coli</i>	
			0	0					0	0	0	0												0,25
	b	1	0	0	0,50	0	0	0	0,50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,50	0	2,00	<i>V. cholerae</i>	
				0	0				0	0,25	0	0												0
	2	0	0	0,50	0	0	0	0	0,50	0	0,50	0,50	0	0	0	0	0	0	0	0	0,50	0	3,50	<i>Vibrio spp.</i>
			0	0					0,25	0	0	0												
	c	1	0	0	0,50	0	0	0,50	0	0,50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,50	0	2,25	<i>V. cholerae</i>
0				0	0					0	0	0,25	0											
2		0	0	0,50	0	0	0,50	0	0,50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,50	0	2,25	-	
	0		0	0					0	0	0,25	0												0
3	0	0	0,50	0	0	0,50	0	0,50	0,50	0,50	0,50	0	0	0	0	0	0	0	0	0,50	0	4,75	<i>S. aureus</i> , <i>Vibrio spp.</i>	
		0	0					0,25	0	0	0,25													0,25
2	a	1	0	0,50	0	0	0	0	0	0,50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,50	0	1,75	-	
			0	0					0	0,25	0	0												0
	2	0	0	0,50	0	0	0	0	0	0,50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,50	0	1,75	Coliformes*	
			0	0					0	0,25	0	0												0
	b	1	0	0	0,50	0	0	0	0,50	0,50	0	0,50	0	0	0	0	0	0	0	0,50	0	2,75	Coliformes*	
				0	0				0,25	0	0	0												0
2	0	0	0,50	0	0	0	0	0,50	0	0,50	0,50	0	0	0	0	0	0	0	0,50	0	3,00	Coliformes*		
		0	0					0,25	0	0	0												0,25	0
3	0	0	0,50	0	0	0	0	0,50	0	0,50	0,50	0	0	0	0	0	0	0	0,50	0	3,00	<i>Vibrio spp.</i>		
		0	0					0,25	0	0	0												0,25	0
3	a	1	0	0,50	0	0	0,50	0	0,50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,50	0	2,50	-	
			0	0					0,25	0	0	0,25												0
	2	0	0	0,50	0	0	0,50	0	0,50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,50	0	2,50	-	
			0	0					0,25	0	0	0,25												0
b	1	0	0	0,50	0	0	0	0,50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,50	0	1,75	<i>V. cholerae</i>		
			0	0				0,25	0	0	0												0	0
2	0	0	0,50	0	0	0	0	0,50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,50	0	1,75	<i>E. coli</i>		
		0	0					0,25	0	0	0												0	0
4	a	1	0	0,50	0	0	0,50	0	0	0	0	0,50	0	0	0	0	0	0	0	0,50	0	2,50	-	
			0	0					0	0	0	0												0
2	0	0	0,50	0	0	0,50	0	0	0	0	0,50	0	0	0	0	0	0	0	0,50	0	2,50	-		
		0	0					0	0	0	0												0	0
5	a	1	0	0,50	0	0	0	0	0,50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,50	0	1,50	<i>S. aureus</i>	
			0	0					0	0	0	0												0
	2	0	0	0,50	0	0	0	0	0,50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,50	0	1,50	-	
			0	0					0	0	0	0												0

origem alimentar, com quase 3,5 milhões de hospitalizações e 38 mortes, com uma média de 568.341 casos por ano¹⁷.

O isolamento de patógenos e/ou organismos indicadores é usado para avaliar a qualidade e inocuidade do alimento, permitindo o controle sanitário. Padrões microbiológicos para pescado determinados pela ANVISA prevêm para peixes e preparações à base de pescado, dois grupos distintos²⁴: o primeiro para pescados e produtos de pesca consumidos cozidos e o segundo para “pratos prontos para o consumo”, a base de pescado, servidos crus. Para o primeiro grupo é determinado o padrão microbiológico para estafilococos coagulase positiva limitado a 10^3 CFU.g⁻¹ e ausência de *Salmonella* spp. em 25g. Os padrões microbiológicos do segundo grupo são os mesmos para *Salmonella* spp., a presença de estafilococos coagulase positiva de no máximo 5×10^3 CFU.g⁻¹, além da contagem de coliformes termotolerantes, que não deve exceder 10^2 CFU.g⁻¹, do limite para *Vibrio parahaemolyticus* que é de 10^3 CFU.g⁻¹ e ausência de *E. coli* e *Vibrio cholerae*. A análise foi baseada no segundo grupo, uma vez que o consumo de pratos orientais, dentre os quais, aqueles à base de peixe cru, como *sushis* e *sashimis* está notadamente se popularizando entre os brasileiros^{35,36,37} e portanto faz parte desse grupo, os consumidores que correm maior risco de adquirir DTA.

Se o resultado da análise das amostras for comparado aos critérios descritos no primeiro grupo, todas as amostras estariam em condições satisfatórias para o consumo. Entretanto, se a análise considerar como base os padrões descritos no segundo grupo, 9 (45%) amostras estariam inapropriadas para o consumo humano, devido à presença de coliformes termotolerantes, *E. coli* e *Vibrio cholerae* não-O1/não-O139 que produz um amplo espectro de doença diarreica, variando de branda à severa idêntica a cólera³⁸. A ausência de *V. parahaemolyticus* nas amostras de peixe analisadas, também foi registrada em estudo realizado com amostras de *sushis* comercializadas em Fortaleza³⁹. Em amostras de peixes de água doce comercializado na região de Teresina - PI, 44,1% estavam impróprias para consumo devido à presença de coliformes termotolerantes e em 41,1% delas foram isoladas *E. coli*⁴⁰. Em outro estudo, na análise de *sashimis*, comercializados em *shopping centers*, foram encontrados valores de contagem de coliformes fecais entre $<1,00 \times 10^4$ a $4,00 \times 10^3$ UFC/g de amostra e não foi isolada *E. coli*³⁵.

O resultado para baixas contagens de estafilococos não foi surpresa, uma vez que esses microrganismos não são considerados bons competidores frente a outras bactérias e, por essa razão, raramente causam intoxicação quando presentes em alimentos crus, nos quais a flora normal não tenha sido destruída. A ausência de *Salmonella* spp. em pescados foi também verificada em outro estudo³⁵. *Salmonella* spp. não é reconhecida como parte da microbiota normal em ambientes aquáticos, ainda que haja evidências de que certos sorotipos de *Salmonella* spp. podem fazer parte da microbiota endógena em ambientes aquáticos tropicais¹⁹. Embora o número de registros do envolvimento de peixes na transmissão de

Salmonella spp. seja pequeno, e os valores das contagens de *Staphylococcus* spp. estejam dentro dos padrões, a possibilidade de contaminação não pode ser desprezada devido à importância desses microrganismos para a saúde pública.

O isolamento de espécies de *Vibrio* de interesse em saúde pública, das mesmas barracas, em diferentes datas de coleta, pode indicar que o microrganismo está circulando nesse ambiente. A recorrência de coliformes termotolerantes acima dos limites preconizados pela legislação nas mesmas amostras, em datas diferentes, indica que o pescado pode estar sendo contaminado pelo próprio feirante, devido aos maus hábitos de higiene. *E. coli* isolada em amostras, onde os feirantes manipularam o peixe com as mãos sujas, reforçam essa suposição. De modo geral, os créditos atribuídos foram baixos, principalmente devido às condições de higiene do ambiente e equipamentos, bem como procedimentos de manipulação e também aspecto de asseio dos feirantes (Quadro 2).

O Decreto 48.172, de 06/03/2007 foi publicado após o término das coletas de dados, revogando o Decreto anterior, no qual o protocolo foi baseado. Quanto às alterações introduzidas no novo Decreto, nos chamou a atenção a obrigatoriedade do uso de toldo na cor vermelha para o G11, uma vez que essa cor interfere nas observações organolépticas do pescado, e a omissão da obrigatoriedade de cobertura de gelo picado⁴¹.

CONCLUSÃO

As práticas observadas nas feiras livres, de modo geral, acrescentam risco à saúde do consumidor, tendo em vista a precariedade na manipulação do produto, bem como na conservação e asseio dos utensílios. O isolamento de *E. coli* e *Vibrio cholerae* não-O1/não-O139 demonstra o papel importante que peixes, principalmente consumidos crus, possuem como veículos de transmissão de DTAs e a presença de *sashimi* em feiras livres mais do que demonstrar a popularização desse tipo de alimento, enfatiza esse problema.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao suporte financeiro obtido junto ao Centro Colaborador em Vigilância Sanitária da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo. São Paulo, SP/Brasil (CECOVISA/FSP/USP). Convênio CA nº 06/99-44-ANVS/MS – processo nº 2001.1.1048.6.9.

REFERÊNCIAS

1. Diaz JH. Is fish consumption safe? J La State Med Soc.2004; 156(1): 42-9.
2. Valdimarsson G. An FAO perspective. In: Ryder, J.; Ababouch, L. (eds.) Fifth World Fish Inspection and Quality Control Congress. The Hague, Netherlands, 20-22 October 2003. FAO Fisheries Proceedings. N°. 1. Rome, FAO. 2005. 162p.

3. [FAO] Food and Agriculture Organization of the United Nations. The State of World Fisheries and Aquaculture 2006. [documento on line] Rome; 2007 [acesso em 27 março 2007]. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0699e/a0699e.pdf>.
4. [FAOSTAT]: FAO Fisheries and Aquaculture Department. Yearbooks of Fishery Statistics: summary tables [documento on line] 2005. [acesso em 20 setembro 2005]. Disponível em: ftp://ftp.fao.org/fi/stat/summary/summ_05/default.htm.
5. Sehgal HS, Sehgal GK. Aquacultural and socio-economic aspects of processing carps into some value-added products. *Bioresour Technol*.2002; 82(3): 291-3.
6. Croci L, Suffredini E. [Microbiological risk associated with seafood consumption]. *Ann Ist Super Sanita*.2003;39(1): 35-45.
7. Hamada-Sato N, Usui K, Kobayashi T, Imada C, Watanabe E. Quality assurance of raw fish based on HACCP concept. *Food Control*.2005;16:301-7.
8. Hawkes C. Uneven dietary development: linking the policies and processes of globalization with the nutrition transition, obesity and diet-related chronic diseases. *Global Health*.2006; 2(4): 1-18.
9. Holub DJ, Holub BJ. Omega-3 fatty acids from fish oils and cardiovascular disease. *Mol Cell Biochem*.2004; 263(1-2): 217-25.
10. Bautista MC, Engler MM. The Mediterranean diet: is it cardioprotective? *Prog Cardiovasc Nurs*.2005; 20(2): 70-6.
11. Franco BDGM, Landgraf M. Microbiologia dos alimentos. São Paulo: Editora Atheneu; 2002. Fatores intrínsecos e extrínsecos que controlam o desenvolvimento microbiano nos alimentos; p. 13-26.
12. Buzby JC, Roberts T, Lin CTJ, MacDonald JM. Bacterial Foodborne Disease: medical costs and productivity losses. Washington (DC); United States Department of agriculture. Food and Consumer Economics Division, Economic Research Service. 1996. Agricultural Economics Report N°. 741. Washington, DC.1996. 100p.
13. Mead PS, Slutsker L, Dietz V, McCaig LF, Bresee JS, Shapiro C, et al. Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis*.1999;5(5): 607-25.
14. Wheeler JG, Sethi D, Cowden JM, Wall PG, Rodrigues LC, Tompkins DS, et al. Study of infectious intestinal disease in England: rates in the community, presenting to general practice, and reported to national surveillance. *The Infectious Intestinal Disease Study Executive*. *BMJ*.1999;318:1046-50.
15. Hall G, Kirk MD, Becker N, Gregory JE, Unicomb L, Millard G, et al. OZFOODNET WORKING GROUP. Estimating foodborne gastroenteritis, Australia. *Emerg Infect Dis*.2005;11(8):1257-64.
16. O’Ryan M, Prado V, Pickering LK. A millennium update on pediatric diarrheal illness in the developing world. *Semin Pediatr Infect Dis*.2005;16(2):125-36.
17. Carmo GMI, Oliveira AA, Dimech CP, dos Santos DA, de Almeida MG, Berto LH, et al. Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos no BRASIL, 1999 - 2004. *Bol Eletr Epidemiol*.2005;5(6):1-7.
18. Germano PML, Miguel M, Miguel O, Germano MIS. Prevenção e controle das toxinfecções de origem alimentar. *Hig aliment*.1993;7(27):6-11.
19. Huss HH, Reilly A, Embarek PKB. Prevention and control of hazards in seafood. *Food Control*.2000;11(2):149-56.
20. Mascarenhas G. Feiras livres: Informalidade e espaços de sociabilidade. In: Colóquio Internacional 2005: comércio, culturas e políticas pblicas em tempos de globalização; 2005 nov 22-25; Rio de Janeiro, (BR). Rio de Janeiro. [documento on line] 2005. Disponível em <http://www.ess.ufrj.br/site_coloquio/mesa2_05.pdf> [2007 fev 26].
21. Prefeitura do Município de São Paulo [homepage na internet]. São Paulo: Secretaria Municipal de Subprefeituras, Supervisão de Abastecimento - Relação das feiras livres de São Paulo; 2006 [atualizado em 13 setembro 2006; acesso em 13 setembro 2006]. Disponível em <http://portal.prefeitura.sp.gov.br/secretarias/abastecimento/organizacao/estrutura/0021>.
22. São Paulo (Município). Decreto 45.674 de 29 de dezembro de 2004. Dispe sobre o funcionamento das feiras livres no município de São Paulo e consolida as normas pertinentes ao assunto. D.O.M., São Paulo, 30 de dezembro de 2004.
23. Silva N, Junqueira VCA, Silveira NFA. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. 2ª ed. São Paulo (SP): Varela; 2001. p. 259-67.
24. Brasil. Resolução nº12, de 02 jan 2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Regulamento Técnico Sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, 10 jan 2001.
25. São Paulo (Município). Lei 10.315 de 30 de abril de 1987. Dispõe sobre a limpeza pública do Município de São Paulo, e d outras providências. D.O.M., São Paulo, 30 de abril de 1987.
26. Audi SG. Avaliação das condições higiênic-sanitárias das feiras-livres do município de São Paulo – SP. São Paulo (SP); 2002. [Dissertação de Mestrado - Faculdade de Saúde Pública da USP].
27. São Paulo (Município). Decreto 25.545 de 14 de março de 1988. Dispõe sobre o funcionamento das feiras livres no município de São Paulo e d outras providências. D.O.M., So Paulo, 15 de março de 1988 p. 23 a 25.
28. São Paulo (Município). Lei 12.605 de 06 de maio de 1998. Dispõe sobre a instalação de cabinas sanitárias públicas removíveis, nas feiras de alimentação e d outras providências. D.O.M., São Paulo, 07 de maio de 1998 p. 1.
29. Vieira RHSF, Souza OV, Patel TR. Bacteriological quality of ice used in Mucuripe market, Fortaleza, Brazil. *Food Control*.1997;8:83-5.
30. Falcão JP, Dias AMG, Corrêa EF, Falcão DP. Microbiological quality of ice used to refrigerate foods. *Food Microbiol*.2002;19:269-76.
31. Capistrano DL, Germano PML, Germano MIS. Feiras livres do município de São Paulo sob o ponto de vista legislativo e sanitário. *Hig aliment*.2004;18(116-117): 37-42.
32. Cato, JC. Economic values associated with seafood safety and implementation of seafood Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP) programmes. *FAO Fisheries Technical Paper* 1998; n 381. Rome, FAO.1998.70p.
33. Dalton CB, Gregory J, Kirk MD, Stafford RJ, Givney R, Kraa E, et al. Foodborne disease outbreaks in Australia, 1995 to 2000. *Commun Dis Intell*.2004; 28: 211-24.
34. Adak GK, Meakins SM, Yip H, Lopman BA, O’Brien SJ. Disease risks from foods, England and Wales, 1996-2000. *Emerg Infect Dis*.2005; 11(3): 365-72.
35. Soares CM, Germano PML. Análise da qualidade microbiológica de *sashimis*, comercializados em *shopping centers* da cidade de São Paulo, Brasil. *Hig aliment*.2004;18(116/117): 88-92.
36. Mársico ET, Oliveira CM, Ferreira PV, Antunes L, Sobreiro LG. Avaliação da qualidade de *sushis* e *sashimis* comercializados em *shopping centers*. *Hig aliment*.2006;20(147):63-5.
37. Germano PML, Oliveira JCF, Germano MIS. O pescado como causa de toxinfecções bacterianas. *Hig aliment*.1993;7(28):40-5.
38. Choi SM, Lee DG, Kim MS, Park YH, Kim YJ, Lee S, et al. Bacteremic cellulitis caused by non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae* in a patient following hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*.2003;31(12):1181-2.
39. Albuquerque WF, Evangelista-Barreto NS, Silva AIM, Vieira RHSF. Ocorrência de *Vibrio Parahaemolyticus* e *Estafilococos* coagulase positiva, em *sushis* comercializados em alguns estabelecimentos de Fortaleza-CE. *Hig aliment*.2006; 20(146): 58-61.
40. Muratori MCS, Costa APR, Viana CM, Rodrigues PC, de Podest Jr. RL. Qualidade sanitária de pescado “in natura”. *Hig aliment*.2004;18(116-117): 50-4.
41. São Paulo (Município). Decreto 48.172 de 06 de março de 2007. Dispõe sobre o funcionamento das feiras livres no município de São Paulo. D.O.M., São Paulo, 06 de março de 2007.

Avaliação do perfil bacteriológico de salsichas tipo “hot dog” comercializadas em embalagens a vácuo e a granel em supermercados dos municípios Rio de Janeiro e Niterói, RJ/Brasil

Bacteriological study in bovine and chicken hot dog type - sausages sold in vacuumed packing-case and in bulk retail commercialized in Rio de Janeiro city and Niteroi, RJ/Brazil supermarkets

RIALA6/1178

Lucimar Lima MARTINS^{1*}, Iacir Francisco dos SANTOS¹, Robson Maia FRANCO¹, Luiz Antônio Trindade de OLIVEIRA¹, Juliana BEZZ¹.

*Endereço para correspondência: Rua Pedro Menegolla, 91/202, Bela Vista, CEP: 99700-000, Erechim,RS/Brasil, e-mail: lucilimartins@yahoo.com.br

¹Departamento de Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense/UFF, Rio de Janeiro,RJ/Brasil.

Recebido: 30/06/2008 – Aceito para publicação: 03/10/2008

RESUMO

As enfermidades transmitidas por alimentos (ETA) são mundialmente conhecidas como um dos principais problemas de saúde coletiva. Em função dos embutidos cárneos terem se destacado como de grande consumo pela população, foi avaliado o perfil bacteriológico de salsichas tipo “hot dog”, adquiridas em diferentes supermercados dos municípios de Rio de Janeiro e Niterói, RJ. As amostras foram submetidas às seguintes análises bacteriológicas: enumeração de coliformes a 35°C e termotolerantes; contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva; contagem de *Clostridium* spp. sulfite redutores a 46°C e isolamento e identificação de *Salmonella* spp. As metodologias utilizadas foram as convencionais com modificações pertinentes. Comparando-se os resultados obtidos com a legislação em vigor, 33% das amostras foram consideradas impróprias ao consumo, em vista do isolamento de todos os microrganismos pesquisados. De acordo com os resultados observados, pode-se concluir que as amostras de salsichas tipo “hot dog” avaliadas representam potencial risco a saúde pública.

Palavras-chaves. salsichas, microrganismos, enfermidades transmitidas por alimentos.

ABSTRACT

The food-borne diseases are one of the main problems of public health worldwide. Taking into account the high consumption rank of meat sausages among consumers, the study on bacteriological profile in hot dog type- sausages was performed. The presence of pathogens was investigated in sausages samples commercialized in supermarkets in Rio de Janeiro city and Niteroi, RJ. The following bacteriological analyses were carried out: for coliforms bacteria counting at 35°C and 45°C; coagulase positive *Staphylococcus* spp. counting; sulfite reductor *Clostridium* counting at 46°C and *Salmonella* spp. detection. Conventional methods with pertinent modifications were employed for performing these analyses. Based on the current legislation, 33.0% of the analyzed samples were considered inappropriate for consuming, because of the occurrence of those microorganisms above cited. These data indicate that the analyzed sausages samples might be a potential source for causing food-borne diseases, being a high risk to public health.

Key words. sausages, microorganism, food-borne diseases.

INTRODUÇÃO

Os produtos cárneos de salsicharia ocupam posição de destaque nas indústrias alimentícias e, em seu conjunto, destacam-se nas estatísticas brasileiras, pois dados não oficiais apontam uma produção em torno de 1,2 milhões de toneladas/ano. Estes produtos apresentam um amplo consumo popular, com tendência a um contínuo crescimento, pois é atrativo para o seu consumo o baixo custo e curto tempo de preparo¹.

As enfermidades bacterianas transmitidas por alimentos são muito prevalentes no Brasil e no mundo, podendo ocorrer sob a forma de surto ou individualmente. A contaminação bacteriana de alimentos representa sério problema de segurança alimentar, sendo responsável por mais de 90% das ocorrências de Enfermidades Transmitidas por Alimentos – ETA².

A enumeração de coliformes termotolerantes nos alimentos fornece com maior segurança que a de coliformes totais, informações sobre as condições higiênicas do produto e melhor indicação eventual da presença de enteropatógenos. Outros indicadores como os *Staphylococcus* spp., são uma indicação de perigo potencial à saúde pública devido à enterotoxina estafilocócica (termoestável), bem como à sanitização questionável, principalmente quando o processo de produção envolve manipulação do alimento; já os *Clostridium* spp., que são formadores de esporos, podem permanecer nos alimentos quando a maioria dos microrganismos entéricos for destruída. Além disso, o *Clostridium perfringens* é a espécie de grande importância para saúde pública, pois os microrganismos desta espécie produzem várias substâncias solúveis de efeitos tóxicos e a intoxicação alimentar por tais germes é uma das ETA mais comuns, principalmente em produtos cárneos^{3,4,5}.

A presença de *Salmonella* spp. em alimentos, por sua vez, torna-os impróprios para o consumo, uma vez que esse é um microrganismo reconhecidamente implicado em surtos de infecção alimentar. É importante salientar que o processamento tecnológico dos produtos cárneos cozidos normalmente destrói *Salmonella* spp. e outros patógenos não esporuláveis. Contudo, contaminações após cozimento podem ocorrer e, em temperaturas favoráveis ocorre o desenvolvimento do microrganismo em questão⁶.

O estilo de vida dos consumidores tem mudado muito nos últimos anos, onde a tendência acentua-se cada vez mais para o consumo de alimentos de preparo fácil e rápido, onde as salsichas tipo “hot dog” de carne bovina (tipo tradicional) e de aves (tipo frango) merecem destaque pela sua grande aceitabilidade. Contudo os embutidos cárneos são sujeitos à contaminação microbiana, o que diminui seu prazo de validade e, através de sua ingestão, podem atuar como veículos de patógenos.

Sendo assim, o estudo do perfil bacteriológico é de extrema importância do ponto de vista de saúde pública, pois registros indicam que em mais de 74% dos incidentes de ETA em que o veículo alimentar é estabelecido, pratos a base de

carne de frango ou bovina são os incriminados, por esta razão um dos objetivos deste trabalho foi avaliar o perfil bacteriológico de salsichas tipo “hot dog” tradicional e de frango, comercializadas em embalagens a vácuo e a granel, obtidas no comércio varejista dos municípios Rio de Janeiro e Niterói – RJ frente à presença potencial de patógenos visando contribuir com dados bacteriológicos para o produto em questão.

MATERIAL E MÉTODOS

Um total de 100 amostras de salsichas “hot dog” de carne bovina (tipo tradicional) e de frango (tipo frango) comercializadas em embalagens a vácuo e a granel foram obtidas de forma aleatória em 20 estabelecimentos comerciais varejistas localizados nas Zonas Sul e Norte do município do Rio de Janeiro e na Zona Sul e Centro do município de Niterói/RJ, os referidos estabelecimentos têm como público alvo consumidores de diferentes classes sociais.

A obtenção das amostras obedeceu às especificações da Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001⁷, constituindo-se uma amostragem indicativa, sendo procedida da seguinte forma: as amostras embaladas a vácuo foram obtidas em embalagens originais de 500g não violadas, e as amostras a granel foram solicitadas em balcões de pesagem, observando a quantidade mínima de 500 gramas por unidade amostral, onde cada tipo (tradicional ou frango) era obtido no mesmo estabelecimento sob as duas formas de comercialização. No momento de aquisição das amostras os termômetros dos balcões de exposição registravam temperaturas compatíveis com a conservação de produtos refrigerados. As amostras foram transportadas ao laboratório em caixas isotérmicas com gelo reciclável, sendo conservadas em temperaturas de refrigeração. O processo de análise iniciava-se no dia de obtenção das mesmas.

As análises bacteriológicas foram realizadas no Laboratório de Controle Microbiológico de Produtos de Origem Animal do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense – UFF, segundo as determinações contidas na RDC nº 12 de 02/01/01⁷, e com base nas técnicas descritas pelo Laboratório Nacional de Referência Animal – LANARA⁸.

As amostras foram submetidas às seguintes análises: enumeração de coliformes a 35°C e coliformes termotolerantes pela determinação do Número Mais Provável (NMP) a partir de diluições de 10⁻¹ a 10⁻¹⁰, contagem de *Staphylococcus* spp. coagulase positiva a partir de diluições de 10⁻¹ a 10⁻⁴, contagem *Clostridium* spp. sulfito redutores a 46°C e *Clostridium perfringens* a partir de diluições de 10⁻¹ a 10⁻³ e detecção de *Salmonella* spp.

A análise estatística dos dados das análises bacteriológicas foi feita segundo o critério de ocorrência ou não ocorrência⁹.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das análises bacteriológicas realizadas foram comparados com os padrões estabelecidos pela Resolução RDC nº 12 de 02/01/01⁷ (Brasil, 2001), e podem ser visualizados na Tabela 1.

Os alimentos de origem animal podem desempenhar um importante papel na veiculação de coliformes a 35°C e coliformes termotolerantes. Tem sido relatada a presença destes microrganismos em diferentes produtos cárneos, inclusive naqueles implicados em surtos de toxinfecção alimentar. Das 100 amostras de salsichas “hot dog” analisadas, verificou-se a presença de coliformes termotolerantes em dezessete. Os

valores de NMP (Número Mais Provável) de coliformes termotolerantes ultrapassaram os limites estabelecidos pela legislação em 16/17 amostras positivas. Com base nestes resultados tais amostras podem ser enquadradas como produtos em condições higiênicas insatisfatórias, contudo deve-se ressaltar que a ocorrência de coliformes a 45°C é bastante variável, pois está diretamente relacionada às condições de higiene nas quais a matéria-prima foi obtida, o produto processado, estocado, manipulado e comercializado.

Tal variação pode ser observada a partir dos resultados obtidos em diferentes estudos realizados no Brasil. Chaves et al.¹⁰ realizaram um estudo com lingüiças frescas suínas onde 15 (75%) amostras analisadas denunciavam más condições de

Tabela 1. Resultado das análises bacteriológicas realizadas em amostras de salsichas tipo “hot dog” comercializadas em embalagens a vácuo e a granel de acordo com a Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001⁷.

Procedimento analítico	Amostras analisadas		Amostras positivas		Amostras dentro do padrão		Amostras fora do padrão	
	V*	G**	V	G	V	G	V	G
Enumeração de Coliformes a 45°C	50	50	6(12%)	11 (22%)	44 (88%)	40 (80%)	6 (12%)	10 (20%)
Contagem de <i>Staphylococcus</i> spp. coagulase positiva	50	50	16 (32%)	22 (44%)	34 (68%)	28 (56%)	7 (14%)	14 (28%)
Contagem de <i>Clostridium</i> spp. sulfito redutores a 46°C	50	50	0	5 (10%)	50 (100%)	45 (90%)	0	5 (10%)
Deteção de <i>Salmonella</i> spp.	50	50	0	3 (6%)	50 (100%)	47 (94%)	0	3 (6%)

(*) amostras comercializadas em embalagens a vácuo; (**) amostras comercializadas a granel.

Tabela 2. Perfil bacteriológico das amostras de salsichas tipo “hot dog” comercializadas a vácuo e a granel.

Número de microrganismos	Coliformes a 45°C NMP*/g		<i>Staphylococcus</i> spp. coagulase positiva UFC**/g		<i>Clostridium</i> spp.C sulfito redutores a 46° UFC/g		<i>Salmonella</i> spp.	
	V***	G****	V	G	V	G	V	G
10 ¹ a 10 ²			1	3				
10 ² a 10 ³		1	7	4				
10 ³ a 10 ⁴		5	4	6				
10 ⁴ a 10 ⁵		1	1	7		2		
10 ⁵ a 10 ⁶	1	4	2	2		3		
10 ⁶ a 10 ⁷	1		1					
10 ⁷ a 10 ⁸								
10 ⁸ a 10 ⁹	2							
10 ⁹ a 10 ¹⁰	2							
Presença								3
Total	6	11	16	22	0	5	0	3

(*) Número Mais Provável; (**) Unidade Formadora de Colônia; (***) Número de amostras comercializadas em embalagens a vácuo; (****) Número de amostras comercializadas a granel.

higiene pela presença de coliformes termotolerantes. Almeida Filho e Sigarini¹¹, ao realizarem um estudo comparativo entre lingüiças de frango frescas, produzidas sob inspeção federal e artesanalmente, 20% das lingüiças produzidas artesanalmente foram consideradas impróprias para o consumo por conterem coliformes termotolerantes acima dos padrões regulamentares. Salvatori et al.⁶ realizaram um estudo com 70 embutidos frescos e 23 produtos cárneos maturados. Todos os produtos analisados continham coliformes termotolerantes, contudo apenas cinco amostras (5,37%) de embutidos frescos apresentaram coliformes a 45°C acima do limite estabelecido. Convém salientar que os estudos citados foram realizados com tipos de embutidos diferentes daqueles analisados nesta pesquisa, e com isto alguns fatores devem ser considerados.

Nas amostras de salsichas “hot dog” comercializadas a granel ocorreu a maior proporção de coliformes a 45°C o que, segundo Oliveira et al.⁵ deixa evidente que as condições higiênicas e de manipulação destas amostras eram precárias, podendo causar surtos de origem alimentar de grande relevância, pois o fato de serem comercializadas a granel inclui maiores riscos de contaminação, principalmente devido a excessiva manipulação.

Na enumeração de coliformes a 45°C, os valores de NMP apresentaram as seguintes variações (Tabela 2): coliformes a 45°C de $4,3 \times 10^2$ a $2,4 \times 10^9$ NMP/g. Onde as amostras comercializadas a vácuo obtiveram as maiores contagens, o que denuncia uma provável contaminação durante as etapas de produção e/ou o favorecimento do crescimento microbiano por falhas na cadeia do frio, pois a embalagem desempenha, entre outros, o papel de proteger o produto de possíveis contaminações nos pontos de comercialização desde que mantidos os preceitos de boas práticas de fabricação e comercialização. Sendo importante ressaltar, que para referido tipo de embalagem os consumidores tendem a reportar a um produto de maior qualidade e menor risco, consumindo-os muitas vezes sem qualquer tipo de tratamento térmico.

Outro fato que torna bastante relevante os resultados encontrados neste estudo, em relação ao número de células viáveis encontradas nos alimentos pesquisados, é que, de acordo com a literatura, o desenvolvimento de síndromes gastroentéricas pela maioria dos sorogrupos de *E. coli* é causada a partir da ingestão de 10^6 a 10^{10} células viáveis/g de alimento. Desta forma, de acordo com os resultados observados neste estudo, pode-se concluir que as amostras analisadas são produtos passíveis de levar ao desenvolvimento de quadros de infecção alimentar, representando um risco à saúde coletiva.

De acordo com resultados encontrados nesta pesquisa, com relação à contagem de *Staphylococcus* spp. coagulase positiva 38/100 amostras de salsichas “hot dog” foram positivas, destas 21 encontravam-se acima do limite máximo estabelecido pela legislação, apresentando-se, portanto, em condições higiênicas insatisfatórias. De acordo com Cunha Neto et al.¹², a presença de *Staphylococcus* spp. coagulase positiva indica a possível presença de enterotoxina; entretanto, a ausência ou

presença de pequeno número deste microrganismo, não determina que estes produtos não possam ocasionar intoxicação alimentar, pois dados de literatura têm demonstrado a existência de enterotoxinas produzidas por estafilococos não produtores de coagulase, e que sabidamente estas espécies podem alcançar os alimentos, uma vez que tanto o homem como animais são portadores usuais destas estirpes¹³.

Nesta pesquisa, as contaminações por *Staphylococcus* spp. coagulase positiva foram da ordem de $\geq 10^2$ a 10^6 UFC/g de alimento. É importante ressaltar que de acordo com literatura, entre estes tipos de microrganismos, pode haver cepas enterotoxigênicas e que contagens superiores a 10^5 microrganismos/g são suficientes para ocasionar a produção de enterotoxinas. Outro ponto relevante no que diz respeito às altas contagens observadas nas amostras analisadas, é que o alimento sujeito à contaminação pós-processamento, com tipos enterotoxigênicos de *Staphylococcus* spp., acarreta sérios riscos devido à ausência de microrganismos competidores que poderiam inibir o desenvolvimento dos *Staphylococcus* spp. assim como a produção de enterotoxinas.

Os *S. aureus* e os coliformes a 45°C foram os microrganismos de maior prevalência nesta pesquisa, e de acordo com Oliveira et al.¹⁴ são os principais responsáveis por surtos de toxinfecção alimentar quando associados a condições higiênicas insatisfatórias dos manipuladores e utensílios, o que justifica as maiores ocorrências nas amostras comercializadas a granel.

Nesta pesquisa ocorreu o isolamento de *Clostridium* spp. sulfito redutores a 46°C/*Clostridium perfringens* em cinco das 50 amostras de salsichas “hot dog” comercializadas a granel, onde as contagens ultrapassaram o limite de tolerância aceitável (a determinação quantitativa variou de $\geq 2,7 \times 10^4$ a $6,6 \times 10^5$ UFC/g), classificando-as como amostras em condições higiênico-sanitárias insatisfatórias e, portanto, potenciais veículos de agente etiológico capaz de determinar intoxicação alimentar.

Diversos pesquisadores demonstraram uma frequência variável de *C. perfringens*. Chaves et al.¹⁰, trabalhando com lingüiça frescal comercializada no Rio de Janeiro/RJ, verificaram a ausência de *Clostridium* spp. sulfito redutores a 46°C nas amostras avaliadas. Stagnitta et al.¹⁵, avaliando carne e derivados cárneos, em São Luis – Argentina, encontraram *C. perfringens* em 26,35% das 315 amostras de lingüiça frescal, em 19% das 100 amostras de hambúrgueres e em 24% das 100 amostras de carne moída analisadas. Desta forma, apesar da grande variação de ocorrência, os resultados evidenciam a importância das carnes e derivados cárneos como possíveis veículos de intoxicação alimentar por *C. perfringens*.

Os alimentos implicados nos surtos de intoxicação alimentar por *C. perfringens* são com frequência cozidos, onde o tratamento térmico dos alimentos é presuntivamente insuficiente para destruir os esporos termorresistentes, o que torna os resultados desta pesquisa importantes do ponto de vista microbiológico e epidemiológico. De acordo com as características descritas pelo LANARA⁸ das 25 cepas de

Clostridium spp. sulfito redutores a 46°C analisadas bioquimicamente, 23 foram caracterizadas como *C. perfringens* tipo A, que de acordo com a literatura consultada é o tipo mais frequentemente isolado e também o mais envolvido em surtos de intoxicação alimentar.

A legislação prevê a ausência de *Salmonella* spp. em qualquer tipo de produto alimentício. Nesta pesquisa detectou-se a presença de *Salmonella* spp. em três das 50 amostras de salsichas “hot dog” comercializadas a granel. Desta forma, estas amostras foram consideradas impróprias para o consumo, pois são passíveis de causar graves surtos de infecções alimentares.

Em estudos, diversos autores têm detectado a presença de *Salmonella* spp. em embutidos, reportando uma prevalência de contaminação que varia de 0 a 9,1%¹⁶. Em conformidade com os resultados obtidos nesta pesquisa, tanto na análise geral, cuja prevalência foi de 3% no total de 100 amostras de salsichas “hot dog” analisadas, como na análise dos grupos, onde nas amostras de salsichas comercializadas a vácuo se deu à ausência do microrganismo em questão; já nas amostras comercializadas a granel, encontrou-se 6% de ocorrência de *Salmonella* spp.

Outros resultados corroboram com os deste trabalho. Marques et al.¹⁷, avaliando lingüiça frescal em Três Corações/MG, observaram ausência de *Salmonella* spp. nas 20 amostras analisadas. Siriken et al.¹⁸, analisando embutidos pasteurizados e fermentados, observaram a presença de *Salmonella* spp. em 7% das 100 amostras estudadas. Deve ser mencionado que esta variação além de estar relacionada com a sanidade dos animais, com as condições de higiene e adequadas temperaturas das plantas de processamento durante a produção, manipulação, estocagem e comercialização, outros fatores como local de origem das amostras em estudo e metodologia aplicada devem ser considerados¹⁹.

A salmonelose é a enfermidade transmitida por alimento de maior ocorrência no Brasil e em diversos outros países. A carne de frango e seus derivados são considerados os mais importantes reservatórios de salmonelas e frequentemente têm sido incriminados com veículos nos surtos de salmoneloses. É importante considerar que as carnes bovina e suína, assim como os seus derivados também apresentam altas prevalências de *Salmonella* spp.^{20,21,22}

Concordando com a assertiva acima as amostras de salsichas “hot dog” que apresentaram maior ocorrência de salmonelas neste estudo foram as derivadas de frango tendo como fator contribuinte o fato de serem comercializadas a granel. Sendo importante ressaltar o papel dos portadores humanos na manipulação de alimentos, pois em diversos relatos de surtos estes são os principais responsáveis pela ocorrência dos mesmos.

CONCLUSÕES

De acordo com os objetivos iniciais deste estudo, os resultados obtidos no presente trabalho permitiram inferir as seguintes conclusões:

- A avaliação do perfil bacteriológico das salsichas “hot dog” tipo tradicional e de frango comercializadas no mercado varejista nos municípios do Rio de Janeiro e Niterói/RJ, frente à presença potencial de patógenos enquadram estes alimentos como veículos potenciais de ETA;
- O *Staphylococcus* spp. coagulase positiva foi o microrganismo de maior ocorrência nas amostras analisadas, denunciando provável envolvimento dos manipuladores na contaminação dos alimentos, associado ao fato das amostras a granel apresentarem-se mais contaminadas, cabendo ressaltar que a educação sanitária e o treinamento dos manipuladores são as melhores ferramentas para assegurar a qualidade dos alimentos e a saúde do consumidor;
- Para as amostras analisadas neste estudo esperava-se encontrar um reduzido número de microrganismos, por se tratar de um produto cozido além de outras características peculiares, contudo observou-se a presença de microrganismos sensíveis às temperaturas aplicadas no processo de produção, o que denuncia falha de processamento, contaminação cruzada, manipulação inadequada, condições de estocagem adversas entre outras possíveis causas.

AGRADECIMENTOS

A CAPES pelo apoio financeiro e aos professores do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária UFF pelo apoio científico

REFERÊNCIAS

1. Fortuna JL, Franco RM. Uma revisão epidemiológica das principais alterações microbiológicas em produtos cárneos embutidos. *Hig Aliment*.2005;19(129):35-42.
2. Pavia PC, Borges RG, Panetta JC. Frequência de quadros gastroentéricos em aeronautas: pressuposta ligação com toxinfecções alimentares. *Hig Aliment*.2000;14(75):13-23.
3. Franco BDG, Landgraf M. *Microbiologia dos Alimentos*. São Paulo: Editora Atheneu, 1996.
4. Fernandes FF, Miranda ZB. Estudo comparativo entre a mortadela tipo Bolonha e a imitação de mortadela sob diversos aspectos. *Hig Aliment*.2001;15(89):54-66.
5. Oliveira AMC, Lucena SCA, Sales TFMS, Silva VB, Costa MLM. Avaliação de alimentos comercializados no carnaval da cidade do Recife – 2001. In: XXI Congresso Brasileiro de Microbiologia. Foz do Iguaçu – PR, 2001. Anais. p. 397.
6. Salvatori RV, Bessa MCC, Itapema MR. Qualidade sanitária de embutidos coletados no mercado público central de Porto Alegre-RS. *Ciênc Rural*.2003;33(4):771-3.
7. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 10 jan. 2001. Seção 1, nº 7-E, p. 45-53.
8. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para controle de Produtos de Origem Animal e Água. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 18 set. 2003. Seção 1, p. 14.

9. Rodrigues PC. Bioestatística. Niterói: EDUFF, 1993.
10. Chaves GMC, Gonçalves PMR, Franco RM, Carvalho JCAP. Avaliação bacteriológica de linguiça fresca suína comercializada no município do Rio de Janeiro, RJ. Hig Aliment.2000;14(73):48-52.
11. Almeida Filho ES, Sgarini CO. Características microbiológicas de linguiça fresca, produzida sob inspeção federal e sob condições artesanais, comercializada no município de Cuiabá-MT. Hig Aliment. 2002;16(100):102-6.
12. Cunha Neto A, Silva CGM, Stamford TLM. *Staphylococcus* enterotoxigênicos em alimentos *in natura* e processados no estado de Pernambuco, Brasil. Ciênc Tecnol Aliment.2002; 22(3):263-71.
13. Pereira ML, Pereira JL, Serrano AM, Bergdoll MS. Estafilococos: até onde sua importância em alimentos? Hig Aliment.2000;14(68-69):32-9.
14. Oliveira AM, Gonçalves MO, Shinohara NKS, Stamford TLM. Manipuladores de alimentos: um fator de risco. Hig Aliment.2003;17 (114/115):12-8.
15. Stagnitta PV, Micalizzi B, Guzmán AMS. Prevalence of Enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in meats in San Luis, Argentina. Anaerobe Food Microbiol.2002;8:253-8.
16. Mattick KL, Bailey RA, Jorhensen F, Humphrey TJ. The prevalence and number of *Salmonella* in sausage and their destruction by frying, grilling or barbecuing. J Appl Microbiol.2002;93:541-7.
17. Marques SC, Brcko CC, Junqueira AC, Boari CA, Valle RHP. Avaliação higiênico-sanitária de linguiças tipo frescal comercializadas no município de Três Corações – MG. Hig Aliment.2003;17(104/105): 108-10.
18. Siriken B, Pamuk S, Özakin C, Gedikoglu S, Eyigör M. A note on the incidence of *Salmonella* spp., *Listeria* spp., and *Escherichia coli* O157:H7 serotypes in Turkish sausage (Soudjouck). Meat Sci.2006;72: 177-81.
19. Uyttendaele M, Vankeirsbilck S, Debevere J. Recovery of heat-stressed *E. coli* O157:H7 from ground beef and survival of *E. coli* O157:H7 in refrigerated and frozen ground beef and in fermented sausage kept at 7°C and 22°C. Food Microbiol.2001;18:511-9.
20. Baeumler AJ, Hargis BM, Tsois RM. Tracing the origins of *Salmonella* outbreaks. Science.2000; 287:50-2.
21. Giovannini A, Prencipe A, Conte A, Marino L, Petrini A, Pomilio F, Rizzi V, Migliorati G. Quantitative risk assessment of *Salmonella* spp. infection for the consumer of pork products in Italian region. Food Control.2004;15:139-44.
22. Mrema N, Mpuchane S, Gashe BA. Prevalence of *Salmonella* in raw minced meat, raw fresh sausages and raw burger patties from retail outlets in Gaborone, Botswana. Food Control.2006;17:207-12.

Avaliação microbiológica, parasitológica e da rotulagem de hortaliças minimamente processadas comercializadas no município de Ribeirão Preto, SP/Brasil

Microbiological and parasitic quality and labeling adequacy of minimally-processed vegetables, commercialized in Ribeirão Preto, SP/Brazil

RIALA6/1179

Sonia de Paula Toledo PRADO^{1*}, Eliana Guimarães Abeid RIBEIRO¹, Divani Maria CAPUANO¹, André Luiz de AQUINO¹, Gutemberg de Melo ROCHA², Alzira Maria Morato BERGAMINI¹

*Endereço para correspondência: ¹Instituto Adolfo Lutz, Laboratório I de Ribeirão Preto, Rua Minas, 877, CEP 14.085-410, Ribeirão Preto SP/ Brasil, e-mail: sptprado@hotmail.com. Fone: (016) 3625-5046, Ramal 206.

²Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP/ Brasil

Recebido: 24/09/2008 – Aceito para publicação: 19/11/2008

RESUMO

O consumo de hortaliças minimamente processadas tem aumentado nos últimos anos no Brasil, principalmente em função da conveniência e da praticidade que o produto oferece. A contaminação microbiológica, a presença de parasitos e os dizeres da rotulagem foram avaliados em 70 amostras de hortaliças folhosas minimamente processadas, adquiridas em supermercados de Ribeirão Preto-SP, no período de janeiro a julho de 2006. Foram pesquisados os microrganismos aeróbios psicrotróficos, coliformes a 35°C e 45°C, *Salmonella* spp. e *Escherichia coli*. Para a avaliação da rotulagem foram utilizadas as legislações em vigor (Resoluções RDC nº 259/2002, 359 e 360/2003, da ANVISA/MS e Lei nº 10.674/2003). Das 70 amostras analisadas, 20% estavam em desacordo com a legislação em vigor nas análises microbiológicas, 18,6% quanto aos parâmetros microscópicos e 100% quanto à avaliação dos dizeres de rotulagem. Oocistos de *Cryptosporidium* spp. foram recuperados em 2,8% das hortaliças pela técnica de imunofluorescência direta. Os resultados obtidos indicam que os produtos minimamente processados podem apresentar riscos à saúde dos consumidores, e evidencia a necessidade da implantação de programas de qualidade que propiciem a melhoria na sua qualidade higiênico-sanitária.

Palavras-chave. hortaliças minimamente processadas, qualidade microbiológica, parasitos, *Cryptosporidium* spp., dizeres de rotulagem.

ABSTRACT

Demands for minimally-processed vegetables have been increasing lately, mainly due to the convenience and the ready-to-eat food practicability offered by these products. A study on microbiological contamination, presence of parasites, and labeling adequacy was conducted in minimally - processed green foliage vegetables samples sold in Ribeirão Preto supermarkets. From January to July 2006, 70 samples were processed for surveying aerobic psychrotrophic bacteria, total and fecal coliforms, isolation and identification of *Salmonella* spp. and *Escherichia coli*. The description data contained in the vegetable package label were evaluated according to the food labeling regulations (RDC nº 259/2002, 359 and 360/2003 resolutions and Law nº 10.674/2003). Of 70 analyzed samples, 20% were in disagreement with the microbiological food legislation, 18.6% with the microscopic parameters and 100% presented unsuitable labeling, and that is in disagreement with the legislation. *Cryptosporidium* spp. oocysts were recovered from 2.8% vegetables using direct immunofluorescence technique. Improved quality assurance programs are needed in order to offer the best food sanitary conditions to consumers.

Key words. minimally-processed leafy vegetable, microbiological quality, parasites, *Cryptosporidium* spp., labeling report.

INTRODUÇÃO

Os hábitos alimentares estão mudando rapidamente em decorrência principalmente do estilo de vida da população aliado a crescente preocupação com a saúde e a segurança alimentar. Dentre eles, a preferência pelo consumo de alimentos frescos, tem levado a uma crescente popularidade de frutas, vegetais e hortaliças minimamente processadas.

Nos Estados Unidos os produtos minimamente processados são comercializados desde 1930, tendo um crescimento efetivo a partir de 1950 com o surgimento das redes de alimentação rápida (“fast food”). No Brasil, esse tipo de comércio iniciou-se no final da década de 70, devido à chegada das redes de “fast food” ao país. Todavia, somente a partir de meados dos anos 90, a pesquisa e o desenvolvimento de tecnologia de processamento mínimo de frutas e hortaliças iniciou-se de forma consistente¹.

Produtos rotulados como minimamente processados estão fortemente associados ao conceito de alimento pronto para o consumo direto, similar ao *in natura* e são oferecidos ao consumidor já embalados. O processamento mínimo envolve operações de seleção, pré-lavagem, corte ou fatiamento, sanitização, enxágue, centrifugação, embalagem e refrigeração, que visam à manutenção do produto fresco, saudável, seguro e, na maioria das vezes, pronto para o consumo. Contudo, a manutenção das características originais é um desafio, uma vez que o corte leva à destruição das células vegetais e alterações no metabolismo celular, resultando numa redução drástica da vida útil do produto. A pré-lavagem e o acondicionamento em bandejas com filme plástico, com o objetivo de modificar a atmosfera interna, podem aumentar o teor de umidade, levando a uma rápida deterioração², e por serem muito manipulados, podem ter sua microbiota aumentada e alterada e, eventualmente, veicular microrganismos patogênicos³.

Além da garantia de um produto com condições higiênico-sanitárias satisfatórias, a verificação da conformidade dos dizeres da rotulagem é obrigatória por se tratar de um alimento embalado na ausência do consumidor e pronto para a comercialização. O rótulo deve ser fiel ao produto que o contém e ser escrito de forma clara e legível, não induzindo a equívocos, além de conter todas as informações previstas na legislação, servindo de elo de comunicação entre o produtor e o consumidor. O direito a tais informações também está previsto no Código de Defesa do Consumidor (CDC) - Lei nº 8.078/1990⁴.

Por se tratar de um segmento de mercado que vem apresentando aumento de consumo pela população, com crescimento acelerado e franca expansão de marcas comercializadas, é de extrema relevância para a saúde pública a realização de estudos que contribuam na avaliação das condições higiênico-sanitárias e da rotulagem deste tipo de alimento.

O presente trabalho foi realizado com os objetivos de

avaliar a contaminação por *Salmonella*, microrganismos indicadores de higiene e *Escherichia coli*, pesquisar a presença de parasitos e verificar a conformidade dos dizeres da rotulagem das embalagens de hortaliças minimamente processadas, comercializadas no município de Ribeirão Preto, SP.

MATERIAL E MÉTODOS

Entre os meses de janeiro e julho de 2006, foram avaliadas 70 hortaliças folhosas minimamente processadas, higienizadas e prontas para o consumo, de nove diferentes marcas, adquiridas em todos os supermercados de Ribeirão Preto que comercializavam estes produtos. As hortaliças analisadas foram: 16 alfaces, 14 couves, 9 repolhos (branco e roxo), 7 acelgas, 5 chicórias, 5 espinafres, 3 almeirões, 3 rúculas, 1 agrião, 1 rúcula + agrião e 6 saladas mistas, sendo que para amostras da mesma marca, consideraram-se lotes e prazos de validade distintos. As amostras foram transportadas ao laboratório em caixas isotérmicas e mantidas sob refrigeração até o início das análises, as quais foram realizadas no Instituto Adolfo Lutz de Ribeirão Preto, SP.

Análise microbiológica

Os procedimentos analíticos para a determinação da contagem total de aeróbios psicrotróficos, do Número Mais Provável (NMP/g) de bactérias do grupo coliforme a 35°C, a 45°C e de *Escherichia coli* e pesquisa de *Salmonella* spp. foram efetuados de acordo com o recomendado por Downes & Ito⁵.

Colônias suspeitas de *E. coli* e de *Salmonella* foram repicadas em meio de identificação presuntiva (meio IAL)⁶. A partir da leitura dos IAL, foram realizadas provas bioquímicas para confirmação das bactérias.

O cálculo do NMP/g de coliformes (35°C e 45°C) e de *E. coli* foi efetuado com o auxílio da tabela de Hoskins⁷.

Análise microscópica

O principal enfoque foi a pesquisa de parasitos, realizada de acordo com Oliveira & Germano⁸, com modificações pertinentes ao processo de lavagem e considerando como unidade amostral 200 a 250 gramas de cada hortaliça. Quando as hortaliças apresentavam folhas íntegras, estas eram esfregadas uma a uma com pincel chato nº 16 em 300mL de solução de detergente neutro (Extran MA 02®). As verduras picadas foram deixadas imersas na solução detergente por 20 minutos e lavadas por enxaguadura em saco plástico, agitando-o manualmente por 1 minuto.

Na recuperação de oocistos de *Cryptosporidium* spp., 100 a 150 gramas de cada amostra foram lavadas em 300mL de água destilada, sendo a água da lavagem separada em duas alíquotas. Um volume de 100mL foi submetido à filtração através de membrana de acetato de celulose estéril (diâmetro 45mm, porosidade 3,0µm), sendo que após a filtração, a membrana passou por um processo de raspagem e lavagem com 2mL de

Tween 80 a 0,1% em PBS. O líquido resultante da lavagem da membrana foi centrifugado a 2.600 rpm por 15 minutos, e o sedimento examinado por imunofluorescência direta utilizando-se o kit da Merifluor *Cryptosporidium/Giardia* (Meridian Bioscience Diagnostics, Cincinnati, Ohio), conforme as instruções do fabricante. As lâminas foram observadas em microscópio de fluorescência, considerando-se como resultado positivo a presença de oocistos com características morfológicas peculiares (tamanho e formato) e o padrão de intensidade da fluorescência da parede dos oocistos, verde-maçã brilhante. O restante da água de lavagem (200mL) foi deixado em repouso em cálice cônico de vidro por 24 horas. Após este tempo, 50mL do sedimento foi submetido à centrifugação a 2.500rpm por 8 minutos. Com o sedimento obtido foram confeccionados esfregaços em lâminas de vidro, que foram corados pela técnica de Ziehl-Neelsen modificada. As lâminas foram observadas sob microscopia de imersão.

Avaliação da rotulagem

Para a avaliação das informações contidas na rotulagem foram utilizadas as Resoluções RDC nº 259, de 20/09/2002⁹, RDC nº 359¹⁰ e 360¹¹, de 23/12/2003, da ANVISA/MS e Lei nº 10.674, de 16/05/2003¹². Foram verificadas em todas as amostras as seguintes informações obrigatórias: denominação de venda, lista de ingredientes, conteúdo líquido, identificação da origem e do lote, prazo de validade e modo de conservação, e as informações úteis (telefone, e-mail ou site e caixa postal), quando presentes, além da verificação da presença das expressões “contém glúten”

ou “não contém glúten”. Segundo a ANVISA/MS, essa classe de produtos deve seguir as instruções do Regulamento Técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados¹¹ que tornou obrigatória a declaração da Informação Nutricional nos alimentos embalados na ausência do consumidor e prontos para o consumo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 70 amostras de hortaliças analisadas, 14 (20%) estavam em desacordo com a legislação em vigor nas análises microbiológicas, 13 (18,6%) quanto aos parâmetros microscópicos e 100% quanto à avaliação dos dizeres de rotulagem.

Avaliação microbiológica

Observa-se na Tabela 1 que 14 (20%) amostras analisadas estavam em desacordo com a Resolução RDC nº 12/2001, ANVISA/MS¹³, quanto aos padrões microbiológicos mínimos tolerados (Coliformes a 45°C e *Salmonella* spp.)

A população de microrganismos aeróbios psicrotróficos variou entre 4,0 e 10,9 log UFC/g, sendo que contagens > 6,0 log UFC/g foram encontradas em 57 (81,4%) amostras, enquanto os coliformes a 35°C variaram entre 0,4 e > 5,4 log NMP/g, e populações ≥ 4,0 log UFC/g foram verificadas em 36 (51,4%) amostras. Padrões microbiológicos para microrganismos aeróbios psicrotróficos e coliformes a 35°C não estão previstos na legislação brasileira em vigor¹³, porém estas bactérias em

Tabela 1. Resultados da avaliação microbiológica das hortaliças minimamente processadas em desacordo com a legislação em vigor. Ribeirão Preto, SP/Brasil.

Amostras	Coliformes a 35°C* log (NMP/g)	Coliformes a 45°C log (NMP/g)	<i>E. coli</i> * log (NMP/g)	<i>Salmonella</i> spp (em 25 g)	Aeróbios Psicrotrófilos* log (UFC/g)
Couve	>5,4	2,4	NA**	ausência	7,5
Couve	>5,4	2,7	2,7	ausência	8,4
Couve	>5,4	4,0	3,7	ausência	9,1
mix –salada***	>5,4	4,0	< -0,5	ausência	9,1
Couve	>5,4	2,4	2,0	ausência	10,5
Couve	>5,4	4,0	0,9	ausência	8,4
Rúcula e agrião	>5,4	2,0	-0,04	ausência	8,7
Acelga	>5,4	2,7	2,7	ausência	8,4
Couve	>5,4	4,4	3,3	ausência	8,7
Acelga	>5,4	2,6	< -0,5	ausência	7,7
Couve	>5,4	3,0	3,0	ausência	8,7
Rúcula	4,0	3,0	3,0	ausência	7,1
Couve	4,7	2,6	2,3	ausência	7,6
Couve	>5,4	2,9	< -0,5	ausência	8,4

*Determinações não contempladas pela RDC nº 12/2001

**NA: não avaliado

***repolho branco, repolho roxo e acelga picados

valores elevados contribuem para a redução da vida de prateleira do produto¹⁴, além de representar risco de contaminação por patógenos psicrotróficos como a *Listeria monocytogenes*¹⁵. Também tem sido preconizado que alimentos com populações acima de 6,0 log UFC/g podem apresentar alterações organolépticas, riscos de deteriorações e toxinfecções, além da perda do valor nutricional, tornando-se, portanto, impróprio para o consumo humano¹⁶.

Os coliformes a 45°C variaram de <-0,5 a 4,4 log NMP/g, presentes em 34 (48,6%) amostras avaliadas. No Brasil, no município de Botucatu/SP, Rall et al.¹⁷ analisaram 170 amostras de vegetais minimamente processados e encontraram 60,6% das amostras em desacordo com a legislação vigente quanto à presença de coliformes a 45°C, sendo, portanto, valores superiores aos obtidos neste estudo (20%). Por outro lado, em 2001 na Índia Pingulkar et al.¹⁸ não observaram a presença destes coliformes em saladas de vegetais “ready-to-eat”.

Escherichia coli variou de <-0,5 a 3,7 log NMP/g, presente em 21 amostras, diferindo do resultado relatado por da Silva et al.¹⁹ em Porto Alegre/RS, que examinaram 56 vegetais minimamente processados, sendo que 8 encontravam-se contaminados por *E.coli*.

Os nossos resultados foram negativos para a presença de *Salmonella* spp e estão de acordo com Mendes et al.²⁰ em Fortaleza (CE), porém discordam do estudo conduzido por Fröder et al.²¹ na cidade de São Paulo/SP, onde a presença de *Salmonella* spp foi verificada em 3% das amostras de salada de vegetais minimamente processadas. Na Polônia, Wójcik-Stopczyńska²² não detectou este patógeno nas amostras de vegetais examinadas.

Dentre as 70 amostras de hortaliças analisadas, 13 (18,6%) estavam em desacordo quanto aos parâmetros microscópicos. Como demonstra a Tabela 2, 11 (15,7%) amostras estavam em desacordo com a Portaria nº 326/1997, da SVS/MS²⁴ e 2 (2,8%) em desacordo com a Resolução RDC nº 175/2003, da ANVISA/MS²³, por apresentarem oocistos de *Cryptosporidium* spp.

A Resolução RDC nº 175/2003, da ANVISA/MS considera impróprios para o consumo humano somente os produtos que apresentam matéria prejudicial à saúde humana, como insetos ou outros animais reconhecidos como vetores mecânicos, tais como baratas, moscas, rato/ratazana, pombos e morcegos, vivos ou mortos, inteiros ou em partes; excrementos; objetos rígidos, pontiagudos e/ou cortantes e parasitos, por causarem agravos à saúde do consumidor.

A Portaria nº 326/1997, da SVS/MS estabelece como apto para o consumo humano o alimento que atende ao padrão de identidade e qualidade pré-estabelecido, nos aspectos higiênico-sanitários e nutricionais, e define como contaminação a presença de substâncias ou agentes estranhos, de origem biológica, química ou física que sejam considerados nocivos ou não para a saúde humana. Além dos parasitos foram observados nas amostras, insetos da Ordem Hemiptera, Família Aphididae (afídeos ou pulgões) e fragmentos de insetos não reconhecidos como vetores mecânicos. A presença das referidas matérias estranhas indica que estas hortaliças não foram produzidas de acordo com a adoção e/ou manutenção das Boas Práticas de Fabricação.

A maioria dos relatos existente sobre hortaliças

Análise microscópica

Tabela 2. Frequência de hortaliças minimamente processadas em desacordo com as legislações em vigor, quanto aos parâmetros microscópicos. Ribeirão Preto, SP/Brasil.

Amostras	Resolução RDC nº 175/2003		Portaria nº 326/1997									
	<i>Cryptosporidium</i> spp.	<i>Entamoeba</i> spp.	Ovos e/ou larvas de ancilostomídeos		Larvas de nematóides		Insetos inteiros		Fragmentos insetos			
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Couve	01	(1,4)	02	(2,9)	02	(2,8)	-	-	-	-	-	-
Repolho	-	-	01	(1,4)	-	-	-	-	-	-	-	-
Rúcula e agrião	-	-	-	-	01	(1,4)	-	-	-	-	-	-
Rúcula	01	(1,4)	-	-	-	-	-	-	01	(1,4)	-	-
Agrião	-	-	-	-	-	-	01	(1,4)	-	-	-	-
Alface	-	-	-	-	-	-	-	-	02	(2,9)	-	-
Salada mista*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	01	(1,4)
Total	02	(2,8)	03	(4,3)	03	(4,3)	01	(1,4)	03	(4,3)	01	(1,4)

(-) não detectado

* Repolho branco/roxo e acelga picados

minimamente processadas refere-se à contaminação microbiológica, sendo escassos os estudos enfocando a pesquisa de parasitos. Na região do ABC, S. P., Rapanello et al.²⁵, encontraram parasitos em 7,5% dos 40 vegetais minimamente processados avaliados, sendo que 14,3% das amostras de agrião apresentaram ovos de *Ascaris lumbricoides* e larvas de nematóides e 7,2% das amostras de repolho, larvas de nematóides.

Neste estudo, oocistos de *Cryptosporidium* spp. foram recuperados em duas amostras (2,8%), apenas pela técnica de imunofluorescência direta. Ambas as hortaliças (rúcula e couve) também apresentaram coliformes a 45°C acima do limite tolerado pela legislação em vigor, além da presença de *Escherichia coli* em número elevado, com valores de 3,0 log NMP/g encontrados na rúcula e 2,3 log NMP/g na couve. Vale salientar ser este o primeiro relato de *Cryptosporidium* spp. em hortaliças minimamente processadas no Brasil.

Os poucos estudos existentes sobre a pesquisa de *Cryptosporidium* em verduras referem-se a hortaliças *in natura*, com frequências variando entre 1,2% a 14,5% nos trabalhos conduzidos no exterior, e 1% a 12% nos do Brasil^{26,27,28}.

Cryptosporidium spp. é um protozoário intestinal que infecta várias espécies animais e o homem, causando doença diarreica, principalmente em indivíduos imunocomprometidos. É um patógeno relevante em saúde pública, sendo responsável nas últimas décadas por numerosos surtos de veiculação hídrica ao redor do mundo, o que levou a mudanças significativas na legislação sobre a qualidade da água em vários países, incluindo o Brasil²⁹. Os oocistos eliminados nas fezes dos hospedeiros infectados possuem alta resistência a

condições adversas ambientais e aos processos convencionais de tratamento da água, o que favorece a contaminação da água e dos alimentos, representando uma preocupação constante para a indústria de alimentos³⁰.

A identificação dos parasitos encontrados neste estudo foi baseada nos caracteres morfométricos dos mesmos, o que dificulta a diferenciação entre parasitos de origem humana, de animais e de vida livre. A identificação adequada dos mesmos demanda técnicas laboratoriais mais aprimoradas e dispendiosas como cultura, biologia molecular, microscopia eletrônica, inviáveis na nossa realidade laboratorial. Apesar desta limitação metodológica, a detecção de parasitos neste estudo, demonstra condições higiênicas insatisfatórias, sendo sugestivo de falhas em alguma etapa do processamento mínimo das hortaliças.

Avaliação da rotulagem

A avaliação dos dizeres da rotulagem constatou que 100% das amostras estavam em desacordo com pelo menos uma das legislações utilizadas. Considerando a Resolução RDC nº 259/2002, da ANVISA/MS, 68 (97,1%) rótulos avaliados estavam em desacordo quanto à apresentação das informações obrigatórias, conforme pode ser observado na Figura 1.

A legislação exige que para os produtos cujo prazo de validade seja inferior a três meses, a validade deve ser expressa com pelo menos o dia e o mês, o que não ocorreu em 55,7% dos rótulos. Apenas um rótulo (1,4%) não apresentava o modo de conservação, que nesse caso seria a recomendação da manutenção das hortaliças sob refrigeração e também um rótulo (1,4%) não declarou o conteúdo líquido.

A Lei Federal nº 10.674/2003 tornou obrigatória a

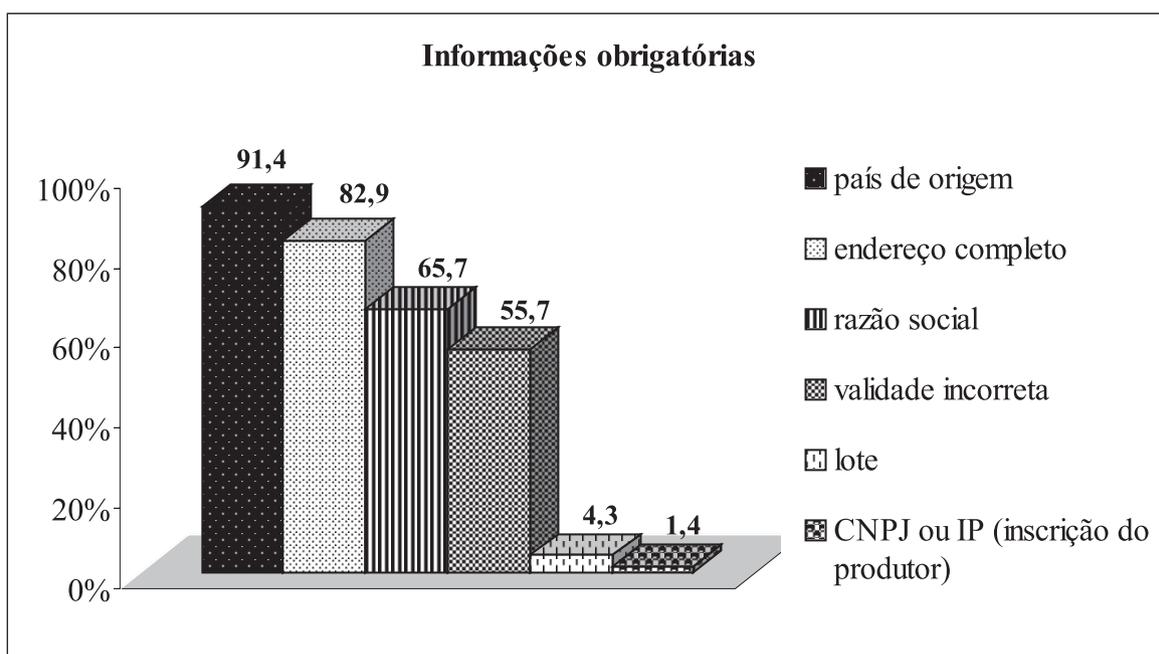


Figura 1. Porcentagens de rótulos com informações obrigatórias em desacordo com a Resolução RDC nº 259/2002, da ANVISA/MS. Ribeirão Preto, SP/Brasil.

apresentação na rotulagem das expressões “contém glúten” ou “não contém glúten”, em caracteres com destaque, nítidos e de fácil leitura como medida de prevenção da doença celíaca. No presente estudo, 52 (74,3%) rótulos não apresentavam a expressão “não contém glúten” e em 6 (8,6%) esta expressão estava sem destaque, ambos os casos em desacordo com a legislação em vigor.

Segundo a ANVISA/MS, a Resolução RDC nº 360/2003 deve ser aplicada aos produtos minimamente processados. Observou-se que 12 (17,1%) rótulos avaliados não apresentavam as informações nutricionais e 42 (60,0%) daqueles que apresentavam não atendiam totalmente a todos os requisitos da legislação, demonstrando o desconhecimento por parte dos produtores. Apesar dessa legislação existir desde 23 de dezembro de 2003, as empresas tiveram até 31 de julho de 2006 para se adequarem e estavam, portanto, dentro do prazo estipulado pelas autoridades sanitárias no período de realização do presente estudo.

Em relação às informações úteis ao consumidor, 64 (91,4%) rótulos apresentavam telefone, 6 (8,6%) e-mail e/ou site e 1 (1,4%) caixa postal.

Segundo Dantas et al.³¹, a embalagem/rótulo exerce papel fundamental na intenção de compra do consumidor, pois além de chamar a atenção do consumidor, fornece informações, afetando, assim, a percepção da qualidade. Em seu estudo concluiu-se que 77% dos consumidores de couve minimamente processadas tinham o costume de ler os rótulos das embalagens e, dentre os aspectos observados, 95% tinham o hábito de observar a data de validade, 89% o preço, 69% a marca e 67% as informações nutricionais. Portanto, a rotulagem serve de identidade e possibilita a rastreabilidade do produto, tornando o agricultor mais responsável pelo que produz e o comprador mais seguro em relação ao produto que consome, o que contribui para fortalecer a confiança e os laços comerciais.

CONCLUSÕES

A constatação de microrganismos indicadores de condições higiênicas inadequadas e de parasitos evidencia a necessidade urgente da implantação de procedimentos padronizados em todas as etapas do processamento das hortaliças minimamente processadas, além de programas de treinamento aos manipuladores e produtores desses alimentos.

A avaliação dos dizeres da rotulagem constatou o não cumprimento das legislações em vigor, o que compromete a segurança alimentar, a rastreabilidade do produto e a confiança nas relações comerciais.

Sugere-se a implementação mais eficaz das Boas Práticas Agrícolas (BPA), Boas Práticas de Fabricação (BPF) e dos princípios do sistema de Análise de Perigos em Pontos Críticos de Controle (APPCC) em toda a cadeia produtiva, que possam assegurar a qualidade desses produtos.

Os resultados obtidos nesse estudo poderão colaborar

no estabelecimento de parâmetros para a normatização e regulamentação dos produtos do setor, visto que se encontra em fase de avaliação pelos órgãos competentes a Norma Técnica para produtos hortifrutícolas minimamente processados e frescos cortados, além de subsidiar em curto prazo ações fiscalizadoras mais efetivas das autoridades sanitárias, garantindo que os consumidores não sejam lesados.

REFERÊNCIAS

1. Moretti CL, editor. Manual de Processamento Mínimo de Frutas e Hortaliças. Brasília: Embrapa hortaliças; 2007.
2. Bolin HR, Huxsoll CC. Effect of preparation procedures and storage parameters on quality retention of salad cut lettuce. *J Food Sci.*1991;56: 60-7.
3. Oliveira ECM, Valle RHP. Aspectos microbiológicos de produtos hortícolas minimamente processados. *Hig Aliment.*2000;44: 50-4.
4. Lei nº 8.078, de 11 de setembro de 1990. Presidência da República, Casa Civil. Dispõe sobre a proteção do consumidor e dá outras providências. *Diário Oficial [da] União, Brasília, DF.* nº 176, 12 de setembro de 1990. Suplemento, p. 1-12.
5. Downes FP, Ito K. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. Washington, D.C., 4th ed., APHA, 2001.
6. Pessoa GVA, Silva EAM. Milieu pour l'identification présomptive rapide des entérobactéries, des *Aeromonas* e des vibrions. *Ann Microbiol.*1974;341-7.
7. International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF). Microorganisms in foods: their significance and methods of enumeration. Toronto: University of Toronto, 1978, 434p.
8. 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.
9. Resolução RDC nº 259, de 20 de set. 2002 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) do Ministério da Saúde. [Acesso em: 1 set. 2006]. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2002/259_02rdc.htm.
10. Resolução RDC nº 359, de 23 de dez. 2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) do Ministério da Saúde. [Acesso em: 19 ago. 2006]. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/359_03rdc.htm.
11. Resolução RDC nº 360, de 23 de dez. 2003a da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) do Ministério da Saúde. [Acesso em: 19 ago. 2006]. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/360_03rdc.htm.
12. Lei nº 10.674, de 16 de maio de 2003. Obriga a que os produtos alimentícios comercializados informem sobre a presença de glúten, como medida preventiva e de controle da doença celíaca. *Diário Oficial da União, Brasília, DF,* 19 maio 2003b. p.1.
13. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) do Ministério da Saúde. Aprova o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília,* 10 de janeiro de 2001a, Seção 1, 45-53.
14. Berbari SAG, Paschoalino JE, Silveira, NFA. Efeito do cloro na água de lavagem para desinfecção de alface minimamente processada. *Ciênc Tecnol Aliment.*2001;21(2):197-201.
15. Bruno LM; Queiroz AAM, Andrade APC, Borges MF. Avaliação microbiológica de hortaliças e frutas minimamente processadas comercializadas em Fortaleza (CE). *B CEPPA* 2005; 23(1): 75-84.
16. Caruso JGB, Camargo R. Microbiologia de Alimentos. In: Camargo, R., editores. Tecnologia dos produtos agropecuários – alimentos. São Paulo: Nobel; 1984. p.35-49.
17. Rall VLM, Balestrin ECC, Ferreira MC, Rall R, Cardoso KFG. Pesquisa de patógenos e avaliação higiênico-sanitária de produtos minimamente

- processados comercializados na cidade de Botucatu. In: Anais do XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia. Santos (SP), 2005. *cd-rom*.
18. Pingulkar K, Kamat A, Bongirwar D. Microbiological quality of fresh leafy vegetables, salad components and ready-to-eat salads: an evidence of inhibition of *Listeria monocytogenes* in tomatoes. *Int J Food Sci Nutr*.2001; 52(1):15-23.
 19. Silva SRP, Verdin SEF, Pereira DC, Schatkoski AL, Rott MB, Corção G. Microbiological quality of minimally processed vegetables sold in Porto Alegre, Brazil. *Braz J Microbiol*.2007; 38(4): 594-8.
 20. Mendes LG, Cunha FA, Menezes EA, Souza GC, Soares KP, Neto JGL, Amorim, LN. Qualidade microbiológica de hortaliças minimamente processadas comercializadas na cidade de Fortaleza-CE. In: Anais do XV Encontro Nacional de Analistas de Alimentos. Fortaleza (CE), 2007. *cd-rom*.
 21. Fröder H, Martins CG, De Souza KL, Landgraf M, Franco BD, Destro MT. Minimally processed vegetables salads: microbial quality evaluation. *J Food Prot*.2007;70(5):1277-80.
 22. Wójcik-Stopczyńska B. Microbiological quality of minimally processed vegetable salads. *Rocz Panstw Zakl Hig*.2004;55(2):139-45.
 23. Resolução RDC nº 175, de 08 de julho de 2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) do Ministério da Saúde. Regulamento Técnico de Avaliação de Matérias Macroscópicas e Microscópicas Prejudiciais à Saúde Humana em Alimentos Embalados. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 09 de julho de 2003c, Seção 1.
 24. Portaria nº 326, de 30 de julho de 1997 da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Regulamento Técnico sobre Condições Higiénico-Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 01 de agosto de 1997, Seção 1.
 25. Rapanello E, Fuzihara T, Nunes SM, Daros V, Vanucci L. Avaliação da qualidade higiênico-sanitária de agrião, alface e repolho minimamente processados e alface *in natura* comercializados na região do ABC, SP. In: Anais do XV Encontro Nacional de Analistas de Alimentos. Fortaleza (CE), 2007. *cd-rom*.
 26. Moore JE, Millar BC, Kenny F, Lowery CJ, Xiao L, Rao JR *et al*. Detection of *Cryptosporidium parvum* in lettuce. *Int J Food Sci Tech*.2007; 42:385-93.
 27. Silva CGM, Andrade SAC, Stamford TLM. Ocorrência de *Cryptosporidium* spp e outros parasitas em hortaliças consumidas *in natura*, no Recife. *Ciênc saúde coletiva*.2005; 10 (Suppl 1): 63-9.
 28. Capuano DM, Okino MHT, Bettini MJCB, Mangini ACS. Ocorrência de *Cryptosporidium* spp. em hortaliças comercializadas no município de Ribeirão Preto, SP – Brasil. *Rev Inst Adolfo Lutz* .2001;60(1):89-91.
 29. Portaria nº 518 de 25 de março de 2004 do Ministério da Saúde. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Diário Oficial da União, n. 59, Brasília, DF, 26 mar. 2004, Seção I, p. 266-70.
 30. Franco RMB. Protozoários de veiculação hídrica: relevância em saúde pública. *Rev Panam Infectol* 2007; 9(4): 36-43.
 31. Dantas MIS, Deliza R, Minim VPR, Hedderley D. Avaliação da intenção de compra de couve minimamente processada. *Ciênc Tecnol Aliment*.2005; 25(4):762-7.

Pesquisa de anticorpos para *Leishmania spp* em amostras de sangue de cães da região de Marília/SP, Brasil no período de janeiro de 1999 - junho de 2005

Anti-*Leishmania spp* antibodies survey in blood samples from dogs from region of Marília/SP, Brazil in the period from January 1999 to June 2005

RIALA6/1180

Maria Laura Sales Rodrigues LIMA^{1*}, Saete França PÔRTO¹, Alice Maria dos Santos Ferreira GELSI¹, Argeu Selos MOREIRA¹, Ilda Aparecida Capannaci ALVES¹, Neuza Maria de SOUZA¹, Layde do Vale ESTECCI¹, Marina Madalena LICATE¹, Fabrício JACOB¹, Maria Izabel LICATE¹, Edilene Patrícia Dias de MENEZES².

*Endereço para correspondência: ¹Instituto Adolfo Lutz – Laboratório Regional de Marília, Setor de Sorologia/Parasitologia, Rua Lima e Costa nº 1630, Bairro Alto Cafezal, CEP 17506-210, Marília,SP/ Brasil, e-mail: mlsales@ ial.sp.gov.br

²SUCEN – Núcleo de Pesquisa, Laboratório Regional de Marília,SP/Brasil.

Recebido: 22/06/2008 – Aceito para publicação: 08/10/2008

RESUMO

No período de 1999 a 2003, foi realizado o inquérito sorológico pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania spp* em amostras de soro coletadas de cães de 38 municípios da região centro-oeste do estado de São Paulo (Marília). Foram avaliadas as frequências de reatividade para anticorpos anti-*Leishmania spp* detectadas em amostras de soros de cães oriundos de três municípios em dois períodos distintos (1999 – 2003 e 2004 – 2005). No primeiro período, a detecção de anticorpos específicos foi realizada por meio do teste de imunofluorescência indireta (IFI); no segundo período, foi utilizado o ensaio imunoenzimático (EIE) como teste de triagem e a reação de IFI como teste confirmatório. A investigação efetuada no período de 1999-2003 sugere a ausência de circulação da *Leishmania* naquela área. O inquérito realizado na população canina nas cidades de Adamantina, Guarantã e Lucélia no período de 2004 a 2005 indica a introdução deste parasita na região, em função da ocorrência de soropositividade para anticorpos anti-*Leishmania spp*, respectivamente em 14%, 8% e 2,5% das amostras. Até abril de 2008, sete municípios da região de Marília notificaram casos humanos de LVA, dois registraram ocorrência da doença somente em cães; o vetor foi detectado em pelo menos cinco municípios. A expansão da LVA na região centro-oeste do território paulista requer certamente a melhoria das atividades de prevenção e de controle desta doença.

Palavras-chave. *Leishmania*, cão, anticorpos, teste de imunofluorescência indireta, teste imunoenzimático.

ABSTRACT

The data resulted from a survey on anti-*Leishmania spp* antibodies in serum samples from dogs from 38 municipalities located in the mid-west region of São Paulo State (Marília), during the period from 1999 to 2003, were assessed. Also, the rates of these antibodies detection in dogs serum samples from three municipalities at two distinct periods (1999 - 2003 and 2004 - 2005) were analyzed. From 1999 to 2003, the anti- *Leishmania spp* antibodies were determined by indirect immunofluorescence assay (IFA); and in the second period of time, enzyme immunoassay (EIA) was used for screening, and IFA as confirmatory testing. The antibodies survey carried out in the period of 1999-2003 suggests that no circulation of *Leishmania* occurred in that area. Canine surveys conducted in Adamantina, Guarantã and Lucélia municipalities from 2004 to 2005 indicate the occurrence this parasite in the investigated region, as the specific antibodies were detected in 14%, 8%, and 2.5% of dogs serum samples, respectively. Up to April 2008, seven municipalities in Marília region recorded human cases of AVL, and two registered the occurrence of the disease only in dogs; the related vector was detected in at least five municipalities. The increase of AVL cases in the mid-west region of Sao Paulo state certainly requires an improved prevention program and needs to strengthen this disease control activities.

Key words. *Leishmania*, dog, antibody, indirect immunofluorescence assay, immunoenzymatic assay.

INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças causadas por várias espécies de protozoários unicelulares do gênero *Leishmania*, que parasitam o homem e diversas espécies de animais silvestres e domésticos¹. Dependendo da espécie de *Leishmania*, pode-se desenvolver a leishmaniose tegumentar americana (LTA) ou a leishmaniose visceral americana (LVA), sendo que esta última pode levar o paciente a óbito se o mesmo não for submetido ao tratamento específico^{1,2,3}. O protozoário é transmitido através da picada da fêmea de insetos da subfamília *Phlebotominae*. Estes insetos apresentam hábitos noturnos e são facilmente encontrados nas regiões tropicais e subtropicais. No Brasil, o flebotomo *Lutzomyia longipalpis* é a espécie mais conhecida como transmissora da *Leishmania (Leishmania) chagasi*. Recentemente, *Lutzomyia cruzi* foi também identificado como vetor da LVA no Estado do Mato Grosso do Sul^{4,5}. Na região metropolitana de São Paulo, a ocorrência da enzootia canina⁶ leva a supor que outra espécie de flebotomíneo possa estar envolvida com a transmissão. Entre os flebotomíneos coletados nos municípios dessa região (Cotia, Embu e Itapeverica da Serra), destacam-se *Pintomyia fischeri*, *Migonemyia migonei* e *Evandromyia edwardsi*. Desta última espécie, foram encontradas formas flageladas no intestino de cinco exemplares coletados em Cotia, e que após identificação molecular constatou-se ser de *Leishmania braziliensis*. Até o momento, não foi elucidado o mecanismo de transmissão da leishmaniose nessa região^{7,8}. Os principais reservatórios das espécies causadoras de LVA são o cão na área urbana e a raposa no ambiente silvestre. Além destes animais, a LTA tem ainda como potenciais reservatórios os roedores, eqüídeos, marsupiais, preguiças e tamanduás¹.

No mundo, a LVA ou Calazar neotropical tem ampla distribuição geográfica, ocorrendo na Ásia, na Europa, no Oriente Médio, na África e nas Américas. As medidas de controle preconizadas pela Organização Mundial da Saúde incluem a busca ativa de doentes e encaminhamento para diagnóstico e tratamento; o inquérito sorológico canino; a apreensão e a eliminação sumária dos cães soropositivos; borrifação sistemática de inseticida residual nos domicílios e peridomicílios e programas de educação comunitária⁹.

No Brasil, o primeiro caso humano de LVA data de 1913, em paciente de Boa Esperança, Corumbá - Mato Grosso do Sul^{10,11}. Em 1934, 41 casos positivos para o protozoário foram identificados em lâminas de viscerotomias praticadas *post-mortem*, sendo que todos os casos eram oriundos das regiões Norte e Nordeste^{10,11}. Desde então, devido ao processo de expansão geográfica, a leishmaniose vem sendo descrita em vários municípios de todas as regiões do Brasil, exceto na região Sul¹². As principais áreas atingidas, em escala de importância, são as regiões Nordeste, Sudeste, Norte e Centro-Oeste. Até a década de 90, a região Nordeste foi a que apresentou os maiores coeficientes de incidência e contribuiu com 90% dos casos registrados no país. Ao final da década de 90, verificou-se

aumento do número de casos, expansão geográfica e urbanização da doença.

Até 1998, no estado de São Paulo, os casos humanos de LVA eram provenientes de outras regiões endêmicas do país. Nesse ano, registrou-se a epizootia canina no município de Araçatuba, região oeste do Estado, onde foi identificada, por meio de técnicas moleculares, a ocorrência da *Leishmania (Leishmania) chagasi*^{7,8}. A presença da espécie *Lutzomyia longipalpis* já havia sido registrada neste município em 1997^{7,8}. A Secretaria de Estado da Saúde, pelos seus órgãos de vigilância, elaborou um projeto para controle da LVA, com prioridade para os municípios da região oeste, incluindo não só a região administrativa de Araçatuba, mas também as de Bauru, Presidente Prudente, São José do Rio Preto e Marília, por se localizarem num raio de 150 km a partir de Araçatuba e estabelecerem fluxo migratório de pessoas e mercadorias. Muitas foram as ações propostas e desenvolvidas, dentre elas a realização de um inquérito sorológico canino amostral para avaliar a extensão e magnitude da infecção canina nos municípios, como também para subsidiar a adoção de medidas de controle mais adequadas¹¹. Em função deste trabalho, constatou-se que a doença não estava restrita ao município de Araçatuba e não estava acometendo apenas os cães, mas também o ser humano. A partir da confirmação do primeiro caso autóctone humano no município de Araçatuba em março de 1999 (Fonte: Divisão de Zoonoses/CVE/SES – dados até 08/07/99), foi realizada a busca ativa de humanos sintomáticos de todos os residentes na área de 200 metros ao redor do caso, incluindo os moradores do domicílio onde ocorreu o caso.

Medidas de controle vêm sendo implementadas pela Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, por meio do Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE), do Instituto Adolfo Lutz (IAL) e da Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN), em conjunto com as Secretarias Municipais de Saúde (SMS), com o objetivo de reduzir a morbidade e a letalidade humana¹³ por LVA no Estado. O programa de vigilância e controle da LVA inclui ações relacionadas aos seres humanos, vetores e cães. No que se refere aos seres humanos, a vigilância vem sendo realizada pela notificação de casos suspeitos, confirmação mediante exame parasitológico direto ou por critério clínico epidemiológico, tratamento precoce e investigação epidemiológica. Caso humano suspeito é o indivíduo com febre durante mais de duas semanas acompanhada de esplenomegalia e que seja proveniente de área com transmissão de LVA. Também é suspeito o indivíduo que apresenta este quadro sintomatológico sem ser de área com transmissão, desde que os diagnósticos diferenciais de agravos mais frequentes na região^{7,8} permitam caracterizar o caso como suspeito. A vigilância entomológica visa detectar a presença de *L. longipalpis*, conhecer sua distribuição nos centros urbanos e aglomerados rurais, monitorar a variação sazonal dos níveis de infestação e detectar adaptação do vetor. O controle da população canina consiste, principalmente, na eliminação dos animais errantes e na busca ativa seguida da eliminação de cães infectados,

detectados através de exame parasitológico ou sorológico¹⁴. Cão suspeito é o que apresenta pelo menos um dos três seguintes sintomas: descamação, úlcera de pele ou onicogrifose, associado a dois ou mais dos seguintes sintomas: ceratoconjuntivite, coriza, apatia, emagrecimento, diarreia, hemorragia intestinal, vômito e aumento de linfonodo¹¹.

O objetivo do presente estudo é apresentar os resultados obtidos nos inquéritos sorológicos para pesquisa de anticorpos para *Leishmania spp* em cães de 38 municípios da região de Marília/SP, Brasil, no período 1999–2003, assim como comparar as frequências de detecção destes anticorpos em amostras de sangue de cães oriundos de três municípios coletadas em dois períodos distintos (1999–2003 e 2004–2005).

MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização deste trabalho, foi feito um levantamento retrospectivo dos resultados obtidos na pesquisa de anticorpos para *Leishmania spp* em amostras de sangue pelos métodos de imunofluorescência indireta (IFI) e/ou ensaio imunoenzimático (EIE), realizada no Setor de Sorologia do Laboratório Regional de Marília, Instituto Adolfo Lutz, Estado de São Paulo, Brasil, a partir de 1999.

Entre os anos de 1999 a 2003 foram analisadas 8.360 amostras de sangue de cães de 38 municípios da região de Marília. No período de 2004 - 2005, foram examinadas 10.807 amostras de três municípios (Guarantã, Adamantina e Lucélia). Do total de 19.185 amostras coletadas, apenas 18 não foram processadas por estarem em condições inadequadas para a realização do exame.

As amostras de sangue foram obtidas através de punção da veia marginal auricular dos cães utilizando-se microlancetas descartáveis. O sangue coletado por capilaridade foi transferido para papel de filtro marca Watman n°1 ou Klabin n°80, e distribuído de uma forma homogênea nos dois lados do papel em um raio de 3 cm. Após secarem à temperatura ambiente, as amostras foram armazenadas em geladeira e transportadas para o laboratório à temperatura ambiente, acondicionadas em caixa de isopor. O sangue foi eluído a partir de pequenos círculos (0,6 cm de diâmetro) picotados do papel de filtro com um picador, em tampão fosfato pH 7,2 (PBS) para a IFI e em diluente próprio do conjunto de EIE. Quando o papel utilizado era o Watman, dois círculos eram colocados em 160 µl de PBS ou 400 µl do diluente de EIE. Para o papel Klabin, um único círculo de papel foi colocado em 200 µl de PBS ou 500 µl do diluente de EIE.

Para a detecção de anticorpos, foram utilizados os conjuntos diagnósticos de IFI e/ou EIE produzidos pelo Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-manguinhos) da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil. As reações foram feitas de acordo com as instruções do produtor, após a eluição do sangue impregnado no papel de filtro. Resumidamente, a IFI consiste na incubação de alíquotas do sangue eluído e diluído (1:40 e 1:80) com formas promastigotas de *Leishmania*,

fixadas em lâminas de vidro, seguida de incubação com uma solução de anticorpos para a imunoglobulina da classe IgG de cão marcada com fluoresceína e detecção da reação dos anticorpos em microscópio de fluorescência. No EIE, antígenos purificados de *Leishmania* são adsorvidos em uma fase sólida (orifícios de microplacas de polipropileno) e incubados com o sangue dos cães, sendo que a presença de anticorpos nestas amostras é detectada pela adição de uma solução de Anti-IgG de cão marcada com a enzima peroxidase, seguida da adição do substrato específico desta enzima e leitura em espectrofotômetro. Amostras de soro controle (positivo e negativo) foram incluídas em cada teste realizado.

RESULTADOS

A Tabela 1 apresenta os resultados dos exames sorológicos para a detecção de anticorpos para *Leishmania spp* realizados com amostras de sangue de cães dos municípios da região de Marília. No primeiro período (1999–2003), foram examinadas por IFI 8.360 amostras provenientes de 38 municípios. Um total de 8.358 amostras apresentou-se não-reagentes e 2 amostras reagentes no teste de IFI, sendo que as amostras reagentes eram de cães não-nativos do local de coleta (municípios de Gália e Echaporã), ou seja, eram de cães importados¹¹.

No segundo período (2004–2005), todas as amostras dos 3 municípios (Guarantã, Adamantina e Lucélia) foram analisadas pelo EIE, e as amostras reagentes e com resultado inconclusivo (zona cinza) foram submetidas a IFI para confirmação da presença de anticorpos. Das 10.807 amostras analisadas, 778 (7%) apresentaram-se reagentes. Do total de amostras reagentes, 127 foram do município de Guarantã, 603 de Adamantina e 48 de Lucélia, com uma porcentagem de positividade de 14%, 8% e 2,5% respectivamente.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

O papel do cão como reservatório da *Leishmania* foi aventado pela primeira vez na Tunísia em 1908¹⁰, quando experimentalmente foi comprovada a infecção deste animal. Posteriormente, em inquérito realizado naquele país, foi comprovada a transmissão natural em cães e assim registrado o primeiro foco de leishmaniose canina no mundo, fato este consolidado em outras regiões. No Brasil, o papel do cão como reservatório da *Leishmania* foi estabelecido no ano de 1955¹⁰, quando foi constatada a transmissão autóctone (caso canino confirmado, cujo local provável de infecção é o mesmo da residência) da LVA em cães em zona urbana do município de Sobral (CE), verificando-se frequência muitas vezes intensa do parasitismo cutâneo. Em 1957¹⁰, concluiu-se que o cão tinha papel fundamental na epidemiologia da LVA no Brasil.

Tabela 1. Quantidade de amostras processadas e de amostras reagentes nos exames sorológicos para *Leishmania spp* nos municípios da região de Marília.

MUNICÍPIOS	1999 A 2003		2004 A 2005	
	TOTAL	REAGENTE*	TOTAL	REAGENTE
Adamantina	469	-	7.938	603 (8%)
Álvaro de Carvalho	103	-	0	-
Alvinlândia	101	-	0	-
Arco Íris	103	-	0	-
Bastos	214	-	0	-
Campos Novos Paulista	1	-	0	-
Echaporã	205	1	0	-
Fernão	102	-	0	-
Flórida Paulista	205	-	0	-
Gália	109	1	0	-
Garça	408	-	0	-
Guaimbê	100	-	0	-
Guarantã	100	-	925	127 (14%)
Herculândia	103	-	0	-
Iacri	204	-	0	-
Inúbia Paulista	103	-	0	-
Irapuru**	218	-	0	-
Julio Mesquita	103	-	0	-
Lucélia	332	-	1.944	48 (2,5%)
Lupércio	103	-	0	-
Mariápolis	103	-	0	-
Marília	1.905	-	0	-
Ocaçu	103	-	0	-
Oriente	101	-	0	-
Oscar Bressane	101	-	0	-
Oswaldo Cruz	440	-	0	-
Pacaembu	202	-	0	-
Parapuã	206	-	0	-
Pompéia	206	-	0	-
Pracinha	102	-	0	-
Queiroz	100	-	0	-
Quintana	102	-	0	-
Rinópolis	203	-	0	-
Sagres	102	-	0	-
Salmorão	100	-	0	-
Tupã	591	-	0	-
Ubirajara	100	-	0	-
Vera Cruz	207	-	0	-
TOTAL	8.360	2	10.807	778 (7%)

* Cães não-nativos da região de coleta

**Neste período o município pertencia à DIR XIV - Marília

Os resultados das pesquisas de anticorpos para *Leishmania spp* em amostras de sangue canino coletadas em municípios localizados na região centro-oeste (Marília) do interior do Estado de São Paulo no período 1999-2003 (Tabela 1) indicam que não havia a circulação deste protozoário na referida área geográfica, uma vez que os únicos animais com anticorpos detectados não eram autóctones aos municípios que encaminharam as amostras para exame. Entretanto, casos humanos e caninos de LVA¹⁵ foram detectados nos municípios de Promissão e Bauru no período 2002 - 2003 (Fonte: CVE/SES - 1999 a 20/02/2008). Estes dois municípios estão localizados na região central do Estado, pertencem à região administrativa de Bauru e distam cerca de 200 km do município de Araçatuba. O município de Marília está situado a 106km e 163km, respectivamente, de Bauru e Araçatuba¹⁶.

A partir de 2003, casos humanos (Fonte: CVE/SES - 1999 a 20/02/2008) e/ou caninos autóctones de LVA foram identificados em 3 municípios (Adamantina, Guarantã e Lucélia) dos 38 incluídos na pesquisa realizada no período 1999-2003. A realização de inquéritos caninos sorológicos nestes municípios, cujos resultados estão aqui apresentados (Tabela 1), confirmou a circulação de *Leishmania* na região de Marília no período 2004-2005. Para a realização destes inquéritos foi utilizado o teste de EIE (Bio-Manguinhos) na triagem das amostras, e o teste IFI como confirmatório, uma vez que o primeiro permite a análise rápida de grande quantidade de amostras. Conforme informações do fabricante, estudos preliminares de padronização do teste foram realizados por Bio-Manguinhos em conjunto com o Instituto Adolfo Lutz, São Paulo (SP). As amostras de 130 cães com suspeita clínica de LVA foram coletadas em soro e papel de filtro e testadas tanto na IFI quanto no ELISA. Para os cálculos de sensibilidade e especificidade a IFI foi considerado o teste padrão ("Gold Standard") e os índices de sensibilidade e especificidade para as amostras coletadas em papel de filtro foram de 79,45% e 90,24% respectivamente. A IFI demonstrou alta especificidade detectando 8.358 (100%) cães negativos para LV no primeiro período estudado e 10.029 (93%) no segundo, como também 778 (7%) cães positivos neste último.

As frequências de detecção de anticorpos para *Leishmania spp* em cães nos municípios de Adamantina (8%) e Guarantã (14%) foram mais altas que a encontrada no município de Lucélia (2,5%). Casos humanos de LVA haviam sido identificados nos dois primeiros municípios, mas em Lucélia apenas a infecção canina havia sido detectada quando se deu início ao inquérito. Assim sendo, as diferenças encontradas nas frequências de detecção de anticorpos podem representar diferentes momentos do ciclo de transmissão do parasita em cada município. Ao analisar os casos humanos de LVA registrados entre 1999 e 2002 no Estado de São Paulo, Camargo-Neves et al⁷ verificaram que o maior número de casos ocorreu nos municípios com as maiores prevalências de infecção canina e que existe uma relação espaço-temporal na qual a doença canina, na grande maioria das vezes, precedeu a detecção de casos humanos^{17,18,19,20,21}, principalmente em municípios onde o vetor já havia sido registrado anteriormente.

Em 2006, a prevalência de infecção canina média obtida no Estado de São Paulo em inquéritos censitários realizados em 30 dos 43 municípios com transmissão canina foi de 7,3%, variando de 0 a 20%⁸. Segundo Camargo-Neves et al.⁷, a expansão e a adaptação do vetor vêm ocorrendo lentamente, tendo sido registradas, inicialmente, em municípios contíguos a Araçatuba e, depois, naqueles que estabeleceram fluxo migratório de pessoas e mercadorias com município da região de Araçatuba. Posteriormente, ocorreu a expansão e adaptação do vetor em outras regiões administrativas, como Bauru, Marília e Presidente Prudente, seguindo pelos grandes eixos rodoviários e ferroviários. Em seus estudos, Camargo-Neves et al.¹⁴ chamam a atenção para o fato de que, entre as condições que indicam maiores riscos de manutenção do ciclo de transmissão da doença, estão a alta densidade populacional de cães, a prevalência de infecção canina superior a 2%, a ocorrência de casos humanos há mais de dois anos e a população com baixo nível socioeconômico. A descontinuidade das ações de controle, tanto aquelas relacionadas ao reservatório doméstico como as relacionadas ao vetor, é um fator que favorece a manutenção da transmissão.

A identificação da espécie *Leishmania (Leishmania) chagasi* a partir de material biológico de cão ou ser humano é o critério laboratorial de referência para a confirmação de casos suspeitos de LVA, sendo a mesma realizada por meio de técnicas fenotípicas e/ou moleculares^{7,8,10,11}. A detecção de anticorpos para *Leishmania spp* em material biológico canino é um critério laboratorial de confirmação de caso apenas em áreas geográficas onde a transmissão de *Leishmania (Leishmania) chagasi* foi comprovada, uma vez que outras espécies podem estar circulando e estimulando a resposta imune humoral nos cães. Esta espécie foi identificada²² pelo Laboratório de Biologia Molecular de Parasitos do Instituto Adolfo Lutz - São Paulo (SP) a partir de material biológico de cães residentes nos três municípios da região de Marília estudados no período 2004-2005.

Até abril de 2008, casos humanos de LVA foram registrados em 7 municípios da região de Marília (Guarantã, Adamantina, Lucélia, Osvaldo Cruz, Flórida Paulista, Pacaembu e Parapuã), enquanto dois municípios (Inúbia Paulista e Mariápolis) registraram ocorrência somente em cães¹⁵. Todos os municípios da região estão vulneráveis (próximos a áreas com transmissão) e pelo menos cinco municípios foram classificados como receptivos, ou seja, tiveram o vetor detectado^{11,15}. Estes dados mostram a magnitude e extensão da LVA neste território paulista e a necessidade da intensificação das atividades de vigilância, prevenção e controle, dirigidas à população humana, à população canina e ao vetor.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Dra. Lílian Regina Macelloni Marques e a Dra Marta Regina Caseto Furian Zorzetto pela revisão do texto, e a Nelson Hakamada pela sua dedicação e colaboração na área de informática.

REFERÊNCIAS

1. Gontijo B, Carvalho MLR de. Leishmaniose tegumentar americana. *Rev Soc Bras Med Trop*.2003; 36(10):71-80.
2. Gontijo CMF, Mello MN. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Rev Bras Epidemiol*.2004;7(3): 338-49.
3. Marzochi MCA, Marzochi KBF. Tegumentary and Visceral Leishmaniasis in Brazil-emerging Anthroozoonosis and possibilities form their control. *Cad Saúde Pública*.1994; 10 (Suppl 2): 359-75.
4. Medeiros ACR, Roselino AMF. Leishmaniose Tegumentar Americana: do histórico aos dias de hoje. *An Bras Dermatol*.1999; 74: 329-36.
5. Santos SO, Arias J, Ribeiro AA, De Paiva HM, De Freitas RA, Malacco MA. Incrimination of *Lutzomyia cruzi* as a vector of American visceral leishmaniasis. *Med Vet Entomol*.1998; 12: 315-7.
6. Tolezano JE, Rodrigues E, Barbosa JER, Cunha E, Taniguchi HH, Barbosa JAR, et al. Expansão da Leishmaniose visceral por terras paulistas. Focos de transmissão de LV canina em municípios da região metropolitana de São Paulo. *Rev Soc Bras Med Trop*.2003; 36 (Suppl 1): 360.
7. Camargo-Neves VLF de. Superintendência de Controle de Endemias (Sucen), Secretaria de Estado de Saúde de São Paulo. A Leishmaniose Visceral Americana no Estado de São Paulo: situação atual. *Bepa*.2004; 1:6.
8. Camargo-Neves V, Superintendência de Controle de Endemias - Sucen/SES-SP , Coordenadoria de Controle de Doenças – CCD/SES-SP. A Leishmaniose Visceral Americana no Estado de São Paulo: situação atual. *Bepa*.2007; 4(48): 12-4.
9. World Health Organization Manual on Visceral Leishmaniasis Control. Division of Control of Tropical Diseases. Geneve: WHO; 1996.
10. Secretaria de Estado da Saúde (SP). Centro de Vigilância Epidemiológica Prof. Alexandre Vranjack. Superintendência de Controle de Endemias. Instituto Adolfo Lutz. Coordenadoria do Programa Estadual de DST/AIDS. Instituto Pasteur. II Informe Técnico. Leishmaniose Visceral Americana. São Paulo: CVE; 2003.
11. Camargo-Neves VLF de, Glasser CM, Cruz LL, Almeida RG. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral Americana do Estado de São Paulo. São Paulo: Secretaria de Estado da Saúde; 2006.
12. Brasil. Ministério da Saúde. FUNASA. Coordenação de Controle de Doenças Transmitidas por Vetores. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: Ministério da Saúde; 2003.
13. Camargo-Neves VLF de, Katz G. Leishmaniose visceral americana no Estado de São Paulo. *Rev Soc Bras Med Trop* 1999; 32 (Suppl.2): 63-4.
14. Camargo-Neves VLF de. Leishmaniose Visceral Americana: doença emergente no estado de São Paulo. *Comciencia*[serial online] 2005 junho[cited 2005 Jun 10]. Disponível em:URL: http://www.comciencia.br/reportagens/2005/06/17_impr.shtml
15. Grupo de Estudos em Leishmanioses. Coordenadoria de Controle de Doenças (CCD). Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN). Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo (SES-SP). Classificação epidemiológica dos municípios para leishmaniose visceral americana. Estado de São Paulo, abril de 2008. *Bepa*.2008; 5(52): 20-5.
16. Brasil. Departamento de Estrada de Rodagem (DER); WebRotas. Disponível em: <http://www.der.sp.gov.br>. Acesso em 14 julh.2008.
17. Alves WA, Bevilacqua PD. Reflexões sobre a qualidade do diagnóstico da leishmaniose visceral canina em inquéritos epidemiológicos: o caso da epidemia de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil, 1993-1997. *Cad Saúde Públ*.2004;20(1): 259-65.
18. Galimbertt MZ, Katz G, Camargo-Neves VLF, Rodas LAC, Casanova C, Costa AI et al. Leishmaniose visceral americana no Estado de São Paulo. *Rev Soc Bras Med Trop*.1999; 32 (Suppl. 1): 217.
19. Gomes AC, Silva AR, Costa CHN, Scherlock I, Costa JML, Shaw J et al. Controle, diagnóstico e tratamento da leishmaniose visceral (calazar). Normas Técnicas. Fundação Nacional da Saúde, Brasília; 1996.
20. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Centro Nacional de Epidemiologia. Leishmaniose Visceral no Brasil: situação atual, principais aspectos epidemiológicos, clínicos e medidas de controle. *Bol Epidemiol*.2002;6: 1-11.
21. Paranhos Silva M, Freitas LAR, Santos WC, Grimaldi Jr-G, Pontes de Carvalho LC, Oliveira dos Santos, AJ. A cross-sectional serodiagnostic suvey of canine leishmaniasis due to *Leishmania chagasi*. *Am J Trop Méd Hyg*.1996; 55:39-44.
22. Gomes AHS, Ferreira IMR, Lima MLSR, Cunha EA, Garcia AS, Araújo MFL, et al. PCR identification of *Leishmania* in diagnosis and control of canine leishmaniasis. *Vet Parasitol*.2007; 144: 234-41.

Intoxicação por colchicina em formulação manipulada

Intoxication by Colchicine in a compounded pharmaceutical formulation

RIALA6/1181

Helena Miyoco YANO¹, Adriana BUGNO¹, Mariangela Tirico AURICCHIO¹

*Endereço para correspondência: ¹Serviço de Medicamentos, Divisão de Bromatologia e Química, Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr. Arnaldo, 355 CEP. 01246-902, São Paulo, SP/Brasil. E-mail: heleyano@ial.sp.gov.br.

Recebido: 31/03/2008 – Aceito para publicação: 18/11/2008

RESUMO

O presente trabalho relata um caso de superdosagem de colchicina em cápsulas manipuladas cuja ingestão inicial ocasionou um processo de hemorragia digestiva aguda levando o paciente a óbito. A colchicina é um fármaco de baixo índice terapêutico, cuja dose máxima recomendada para o tratamento de gota é de 2,5 mg, nas primeiras 24 horas para adultos. Nas cápsulas restantes, não ingeridas, a dosagem média de colchicina, determinada por espectrofotometria (segundo a Farmacopéia Brasileira IV edição) foi de 47,36mg ou seja, cerca de 20 vezes maior que a dose máxima recomendada. O erro foi constatado na prescrição e na consulta ao prescritor por parte do manipulador do medicamento.

Palavras-chave. colchicina, medicamento manipulado, superdosagem.

ABSTRACT

The present work relate a case of overdose of colchicine in a capsules of compounded pharmaceutical formulation whose ingestion dose initiated a process of acute gastrointestinal haemorrhage leading the patient to death. Colchicine is a pharmacon of low therapeutical index drug, and the maximum recommended dose for gout treatment in adult is 2.5 mg at the first 24 hours. The remaining non- ingested capsules were analyzed by spectrophotometry, and colchicine amount was determined according to the Brazilian Pharmacopoeia, IV edition. The average dosage was of 47.36 mg, that is, about 20 times higher than the maximum recommended dose. The dosage mistake was evidenced in the medicament prescription, and also in consultation the professional responsible for prescribing the medicine on the part of operator who processed the colchicines formulation.

Key words. colchicine, compounded pharmaceutical formulation, overdose.

INTRODUÇÃO

Desde a antiguidade, a humanidade procura encontrar meios de aliviar a dor decorrente do reumatismo, da gota e de outros distúrbios similares. A colchicina foi provavelmente uma das primeiras drogas usadas com esta finalidade^{1,2}. É um alcalóide extraído do *Colchicum autumnale* (Figura 1), indicada na terapia dos casos de ataque agudo da artrite gotosa e recomendada para uso regular entre os ataques, como medida profilática, podendo ainda evitar a progressão de uma crise aguda quando usada logo após os sintomas articulares³.

A gota é uma doença caracterizada pela elevação dos níveis de ácido úrico no sangue e acúmulo de cristais de monourato de sódio nas articulações. A colchicina inibe a multiplicação celular e produz diminuição temporária de leucócitos onde estão os cristais, diminuindo, portanto a resposta inflamatória local é rapidamente absorvida quando

administrada por via oral, com pico de concentração plasmática entre 30 minutos e 2 horas². Seus efeitos tóxicos mais comuns são a rápida proliferação de células epiteliais no trato gastrointestinal, náusea, vômito, diarreia e dor abdominal, sendo que o tratamento deve ser suspenso tão logo estes sintomas apareçam. Ocorre que a colchicina é um fármaco de índice terapêutico estreito onde a dose terapêutica é muito próxima da dose tóxica³, e, no entanto tem sido manipulada em farmácias apesar de especialidades farmacêuticas industrializadas serem facilmente encontradas no comércio. Casos de uso de fármacos de baixo índice terapêutico manipulados em farmácias ocasionarem graves riscos à saúde ou morte tem sido relatados na literatura^{4,5,6}.

Reconhecendo-se os riscos associados ao consumo de preparações farmacêuticas à base de fármacos de índice terapêutico estreito obtidas por manipulação, a ANVISA editou a RDC no. 67 de 2007⁷, onde estabelece que o próprio paciente

assuma o risco da utilização de tais medicamentos por escrito, após ter recebidos as informações sobre tais riscos do médico e do farmacêutico.

RELATO DO CASO

O laboratório de Farmacognosia do Instituto Adolfo Lutz recebeu solicitação de análise de cinco cápsulas contendo colchicina, manipuladas em farmácia de manipulação. Segundo o processo que acompanhava a amostra, um senhor de 70 anos por apresentar quadro de dor articular, buscou inicialmente atendimento médico em uma clínica, onde foi atendido por médico que lhe prescreveu medicação a ser aviada em farmácia de manipulação, e que segundo foi relatado na ocasião, o médico lhe disse não se tratar de moléstia grave e que com o uso da medicação em breve teria significativa melhora. De posse a receita que havia sido prescrita dosagem de 50mg de colchicina, o senhor dirigiu-se a farmácia de manipulação, onde solicitou a medicação. Após a ingestão da primeira dose da medicação, tendo sentido grande mal, foi necessária a busca de atendimento de socorro em Hospital, que constatou haver sido iniciado um processo de hemorragia digestiva aguda. O paciente foi a óbito no dia seguinte, constatando-se como *causa mortis*: insuficiência respiratória aguda, estado de choque hemorrágico, hemorragia digestiva aguda e úlcera gástrica, o que ocasionou grande perplexidade, não obstante o transe doloroso dos familiares da vítima. Há informações nos documentos de que a atendente da farmácia contactou com a clínica médica e que foi confirmada a dosagem. O médico, por sua vez, alegou que prescreveu corretamente, pois não existe uso para a dosagem de 50 miligramas.

Doseamento de colchicina: para o conteúdo de cada cápsula foi adicionado 10mL de diluente (etanol absoluto) em tubos de centrífuga e levou-se a agitação por 30 minutos. Após centrifugar, o sobrenadante foi transferido para balão volumétrico de 50mL e o resíduo foi sendo lavado com o diluente até completar o volume do balão, de acordo com a metodologia analítica preconizada na Farmacopéia Britânica⁸. Obteve-se os seguintes teores de colchicina nas cápsulas: 1) 47,5 mg; 2) 47,5 mg; 3) 48,5 mg; 4) 47,2 mg; 5) 46,3 mg.

Uma solução padrão de colchicina (padrão obtido de indústrias farmacêuticas, com certificado de análise) foi preparada na concentração de 100µg/mL com o diluente e a partir desta, 7 diluições foram preparadas (4-16µg/mL) para construir a curva analítica (Figura. 2). A linearidade foi avaliada pelo método da regressão quadrada para cada nível, sendo o limite de detecção de 0,7333µg/mL e o limite de quantificação 2,2223µg/mL determinados baseado no desvio padrão entre resposta e *slope* da adequação de regressão da curva construída nos níveis de menor concentração de colchicina.

DISCUSSÃO

A literatura científica estabelece dose máxima ingerida de 2,5mg nas primeiras 24 horas para adultos hígidos, e a dose total administrada em ataque agudo não deve exceder a 6mg em quatro dias⁹, contudo no caso em questão o paciente recebeu dose da ordem de 50mg para uma ingestão do medicamento. As doses das formulações industrializadas são de apenas 0,5mg ou no máximo de 1,0mg por unidade posológica, portanto neste caso a quantidade ingerida pelo paciente correspondeu a 100 unidades de 0,5mg de especialidade farmacêutica industrializada.

Se o médico tinha a intenção de prescrever 0,5 miligramas, mas prescreveu 50 miligramas, estaria incorreto, porém o farmacêutico deveria insistir em pedir esclarecimentos sobre a prescrição do médico para confirmar a dose da receita, uma vez que a quantidade prescrita pelo médico não era usual.

A colchicina é um fármaco extremamente tóxico⁹, e já houve relatos de casos de morte em cidades do Brasil como: três pessoas em São Gabriel (RS), um casal no Distrito Federal, três pessoas em Itabuna (BA)⁵ e um caso em Paraná⁶. A intoxicação por colchicina é extremamente grave, porém seus riscos parecem pouco conhecidos por profissionais da saúde, é necessário informar sobre as precauções e acompanhar o tratamento para evitar a ocorrência de intoxicações. O tratamento com a colchicina vem sendo abandonado devido à intensa diarreia e múltiplos efeitos colaterais que provoca³, sendo hoje um fármaco de segunda linha no tratamento da gota aguda, como alternativa aos anti-inflamatórios não esteroidais (AINE). Os corticosteróides são recomendados quando os AINE e a colchicina são contra-indicados^{3,9}. O aparecimento de efeitos tóxicos ocorre horas após a ingestão de doses altas da colchicina e os sintomas iniciais são náuseas, vômitos, dor abdominal e diarreia podendo ser esta sanguinolenta, devido à hemorragia gastrointestinal, pode causar dano vascular extenso resultando em choque, lesão renal com diminuição de produção de urina, fraqueza muscular e paralisia progressiva do sistema nervoso central³, quadro semelhante à *causa mortis* da vítima em questão. A morte pode ocorrer com doses baixas da droga, cerca de 7mg, resultante da paralisia dos músculos responsáveis pela respiração³, portanto a importância dos profissionais de saúde se atenderem a rígido acompanhamento do paciente, enquanto estão em tratamento com a colchicina.

CONCLUSÃO

Este relato ilustra a sucessão de erros que culminou na morte do paciente, a prescrição de manipulação para um medicamento de baixo índice terapêutico, amplamente disponível no mercado de especialidades industrializadas e de baixo custo, a pouca preocupação com a grafia na prescrição, a falta de consulta ao prescritor por parte do manipulador para confirmar a receita e certificar-se da dosagem tendo em conta os níveis preconizados na literatura em comparação com o da prescrição.

O risco para o paciente associado à manipulação de fármacos de baixo índice terapêutico deve ser bem avaliado

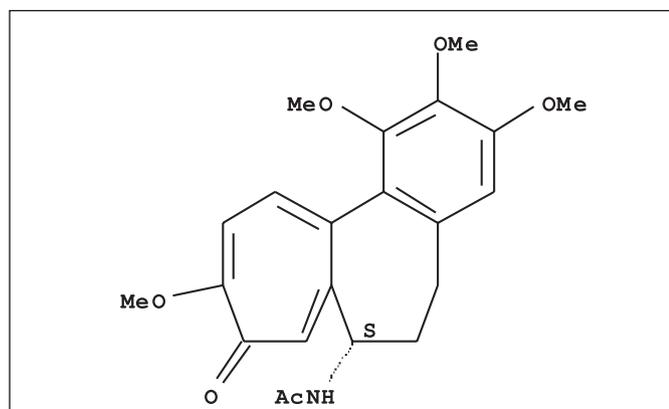


Figura 1. Estrutura química da colchicina.

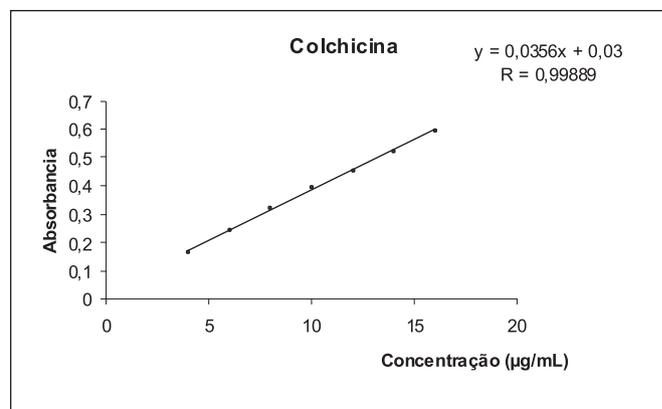


Figura 2. Curva analítica da Colchicina.

pelas autoridades reguladoras ao permitirem esta prática, pois ainda que exista legislação quanto às Boas Práticas de Manipulação, as limitações técnicas da manipulação são reais e como vimos neste caso, os erros podem ter conseqüências graves. Ainda que os defensores da manipulação tal como praticada no Brasil aleguem que o medicamento industrializado com desvio de qualidade atinge a um número muito maior de usuários, a prática no Serviço de Medicamentos tem mostrado que erros desta gravidade são raríssimos de acontecer com os medicamentos industrializados em razão de o processo industrializado ter controles bem definidos ao contrário do que ocorre no processo da manipulação. A manipulação deveria ser um recurso complementar de obtenção daquelas preparações farmacêuticas não industrializadas, principalmente nesta categoria de fármacos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Srta. Thaís Y. Sato, bolsista FUNDAP, pela colaboração nos ensaios analíticos e as empresas Green Pharma, IGEFARMA LABORATÓRIOS S.A. e Uci-farma Indústria Farmacêutica Ltda pelos fornecimentos de padrões certificados de colchicina.

REFERÊNCIAS

1. Korolkovas A, Burckhalter, JH Química Farmacêutica Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 181-217, 1982.
2. Insel PA. Analgesic-Antipyretic and Antiinflammatory Agents And Drug Employed In The Treatment Of Gout. In: Goodman & Gilman's the pharmacological basis of theapeutics. 9ª ed., editores Hardman, JG e Limbird, LE. New York: McGraw-Hill, 1996, p. 617-57
3. Brasil, Leis e Decretos - RDC no. 232 de 17 de agosto de 2005 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. estabelece inclusão da substância COLCHICINA no anexo I - Substância de Baixo Índice Terapêutico. DOU de 18 de agosto de 2005. Disponível em <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=18248&word=>. Acesso em 20 de fevereiro de 2008.
4. Yano HM, Auricchio MT. Digitoxina: superdosagem em medicamento manipulado. *Rev Inst Adolfo Lutz*.2005;64:273-75.
5. ANVISA- Manipulação de Colchicina restrita após mortes de usuários. Disponível em http://www.anvisa.gov.br/DIVULGA/noticias/2005/180805_4.htm. Acesso em: 20 de fevereiro de 2008.
6. Gabriel PMKC, Gabriel MM, Escorsin Neto F, Lopes M. Colchicina : Intoxicação e Óbito, Relato de Caso. *Visão Acadêmica*.2004;5:47-52.
7. Resolução RDC nº 67, de 08 de outubro de 2007.
8. British Pharmacopeia. London: The Stationary Office, 2004, p. 2319.
9. Farmacovigilância - Uso criterioso de colchicina. *Pharmacia Brasileira*.2006;X,56: 5.

Surto de toxinfecção alimentar em funcionários de uma empreiteira da construção civil no município de Cubatão, São Paulo/Brasil

Food-borne infection outbreak among the employees of an engineering and construction company in Cubatão, São Paulo/Brazil

RIALA6/1182

Estevão de Camargo PASSOS^{1*}, Camila Souza ALMEIDA², João Paulo ROSA², Luciana Martins ROZMAN³, Ana Ruth Pereira de MELLO¹, Cícero Vagner de SOUZA¹, Regina Célia PASCHOAL¹, Mário TAVARES¹.

*Endereço para correspondência: ¹Instituto Adolfo Lutz, Laboratório Regional de Santos, Seção de Bromatologia e Química, Rua Silva Jardim, 90, Vila Nova, Santos, SP/Brasil CEP 11015-020 tel/fax 13-3232-5112

²Vigilância Sanitária, Divisão de Vigilância à Saúde da Secretaria Municipal da Saúde de Cubatão, Cubatão, SP/Brasil.

³Vigilância Epidemiológica, Divisão de Vigilância à Saúde da Secretaria Municipal da Saúde de Cubatão, Cubatão, SP/Brasil.

Recebido: 22/04/2008 – Aceito para publicação: 01/09/2008

RESUMO

Foi notificado, em dezembro de 2007, um surto de toxinfecção alimentar em 54 funcionários de uma empreiteira da construção civil a serviço em uma refinaria do município de Cubatão, SP. Sintomas de diarreia, cólica abdominal, náuseas, mal estar, cefaléia, vômitos, tontura e febre foram observados. A Vigilância Sanitária Municipal coletou amostras de alimentos preparados no dia seguinte da notificação e de águas utilizadas na empresa produtora de alimentos e no restaurante da empreiteira. As amostras foram analisadas segundo a metodologia descrita no Compendium APHA (2001) e Standard Methods (2005); os resultados foram comparados aos padrões microbiológicos estabelecidos pela Resolução RDC nº 12/2001 e pela Portaria nº 518/2004. Coliformes totais foram observados nas amostras de água da empresa e do restaurante; coliformes termotolerantes foram identificados na amostra de carne assada servida no restaurante da empresa (N.M.P. 28/g). *Staphylococcus* coagulase positiva, *Bacillus cereus*, *Salmonella* spp e clostrídios sulfito-redutores não foram detectados. Em janeiro de 2008, a Vigilância Sanitária colheu nos estabelecimentos envolvidos amostras de alimentos, as quais encontravam-se dentro dos padrões microbiológicos estabelecidos pela Resolução RDC nº 12/2001. Este relato mostra a importância do trabalho em conjunto entre os serviços de saúde municipais e o laboratório de saúde pública.

Palavras-chave. surto de toxinfecção alimentar, coliformes termotolerantes, vigilância sanitária e epidemiológica, boas práticas de fabricação.

ABSTRACT

In December 2007, an outbreak of food-borne infection was described in 54 employees of an engineering and construction company on duty an oil refinery in Cubatão, SP, Brazil. The main symptoms presented were vomiting, diarrhea, abdominal pain, fever and headache. The municipal health surveillance services collected the food samples served in the day after the outbreak and also the water samples from catering firm and from refinery dining room, and sent them to Instituto Adolfo Lutz in Santos. The samples were analyzed by the conventional methods, following the Compendium APHA (2001) and the Standard Methods (2005) guidelines. The results were analyzed according with Brazilian Ministry of Health legislation ANVISA RDC 12/2001 and Decree 518/2004. Coliforms bacteria group were isolated from water samples, and faecal coliforms (N.M.P. 28/g) were isolated from roast meat meal served at the company dining room. Coagulase positive *Staphylococcus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella* spp and sulfite reductor *Clostridium* were not found. In January of 2008, the municipal health surveillance services returned to the establishments involved, and collected the food samples resulted negative for bacteria. A joint-work of municipal health surveillance service and public health laboratory has been relevant to deal with epidemiological and sanitary surveillance matters.

Key words. outbreak of food-borne diseases, faecal coliforms, health surveillance, good manufacturing practice.

A incidência de doenças relacionadas ao consumo de alimentos cresce anualmente. O número de refeições realizadas fora de casa potencializa o surgimento de doenças transmitidas por alimentos (DTA) e, conseqüentemente, os surtos de toxinfecções alimentares^{1,2}.

Os Serviços de Vigilância Sanitária e Vigilância Epidemiológica municipais investigam as DTAs por serem caracterizadas como ocorrências pontuais na população exposta ao risco, o número de indivíduos acometidos, que podem apresentar diferentes quadros clínicos, períodos de incubação variáveis e os casos graves podem evoluir para óbitos nos pacientes acometidos^{3,4}. O Laboratório de Saúde Pública auxilia as Vigilâncias Sanitárias a analisar os diferentes produtos envolvidos no surto, investigando os possíveis microrganismos e toxinas pré-formadas^{3,4}.

Segundo Barros et al.⁵, as condições higiênicas dos locais de produção e manipulação dos alimentos interferem na qualidade microbiológica de carne e derivados, porque o ambiente de abatedouros e açougues pode representar um importante ponto de contaminação. O risco de contaminação de alimentos a partir do ar ambiente e de superfícies de bancadas e equipamentos foi descrito por Soares et al.⁶ em dois restaurantes institucionais que verificaram a presença de *B. cereus* potencialmente produtores de enterotoxinas. Os manipuladores de alimentos são frequentemente incriminados na disseminação de agentes patogênicos como os observados por Paula et al.⁷ que encontraram coliformes fecais em amostras de alfices de restaurantes *self-service* de Niterói.

A análise dos dados indica a necessidade da orientação dos manipuladores quanto à higienização no preparo de hortaliças e alimentos. Porém a prevenção da contaminação dos alimentos não é tarefa exclusiva dos manipuladores, os consumidores também desempenham papel importante na cadeia analisada^{1,2}. A presença de bactérias patogênicas em alimentos, no ambiente de restaurantes e em surtos de DTA tem sido descrita por diversos autores^{6,7, 8}.

O objetivo do presente trabalho foi relatar a ocorrência de um surto de toxinfecção alimentar em funcionários de uma empresa da construção civil no município de Cubatão, São Paulo, em dezembro de 2007.

Os Serviços de Vigilância Sanitária e Vigilância Epidemiológica do município de Cubatão foram informados pela equipe do Pronto Socorro Central em 20/12/2007, que havia 16 casos de diarreia entre funcionários de uma empresa em atendimento no repouso daquela Unidade.

A Vigilância Epidemiológica efetuou o inquérito epidemiológico com 92 comensais que almoçaram no refeitório da empresa no dia 19/12/2007, última refeição em conjunto antes do aparecimento do primeiro caso. A análise do resultado do inquérito epidemiológico revelou que 54 (58,7%) pessoas apresentaram manifestação de sintomas sendo que destes, 21 (38,9%) procuraram atendimento médico no Pronto Socorro. Os funcionários acometidos apresentaram as seguintes frequências dos sinais e sintomas: quadros de diarreia em 50 (92,6%), cólica abdominal em 48 (88,9%), náuseas

em 19 (35,18%), mal estar em 15 (27,8%), cefaléia em 6 (11,11%), vômitos em 4 (7,4%), tontura em 4 (7,4%) e febre em 1 (1,85%).

O Serviço de Saúde do Trabalhador (CRESAT) também foi acionado para acompanhar as investigações com a Vigilância Sanitária, a qual constatou que não havia sobra nem as amostras de alimentos servidos na refeição envolvida no surto, tanto na empresa produtora de alimentos como na empreiteira. O estabelecimento fornecedor de alimentos foi interditado cautelarmente, sendo impedido de exercer qualquer atividade.

Os fatos ocorridos com os funcionários da empreiteira levaram a Vigilância Sanitária de Cubatão a colher amostras de águas e de alimentos preparados no dia seguinte da notificação, em 20/12/2007, tanto na empresa produtora de alimentos como no restaurante da refinaria onde os funcionários almoçavam.

As amostras dos pratos prontos para consumo e águas foram colhidas em 20/12/2007 pelos técnicos da Vigilância Sanitária, acondicionadas em sacos plásticos transparentes de primeiro uso, etiquetados e lacrados, mantidos a temperatura de refrigeração e encaminhadas para análise no setor de Microbiologia Alimentar da Seção de Bromatologia e Química do Laboratório Regional de Santos do Instituto Adolfo Lutz, onde foram identificadas e mantidas a temperatura de refrigeração até o momento da análise.

Os pratos prontos para consumo coletados da empresa produtora de alimentos arroz cozido, feijão e carne assada foram registrados como análise fiscal e as amostras de água coletadas das torneiras dos tanques de lavagem de mãos, de verduras e da área de carga e descarga de produtos alimentícios foram submetidas à análise de orientação, já no restaurante da empresa, foram coletadas amostras de arroz cozido, feijão e carne assada também registrados como análise fiscal além de amostras de água das torneiras da fresqueira e da pia de lavagem de utensílios também registrados como análise de orientação.

Os alimentos foram enquadrados de acordo com o anexo I da Resolução RDC nº 12 de 2 de janeiro de 2001 da ANVISA/MS⁹, processados segundo a metodologia da APHA de 2001¹⁰ e os resultados das análises obtidos foram comparados com os padrões microbiológicos estabelecidos pela mesma. As amostras de água foram processadas de acordo com Standard Methods de 2005¹¹ e os resultados comparados com o padrão de potabilidade estabelecido pela Portaria 518 de 25 de março de 2004 do Ministério da Saúde¹². Foram pesquisados os bioindicadores de contaminação ambiental e fecal, coliformes totais e coliformes termotolerantes, através da técnica do número mais provável (N.M.P.) para os alimentos e a técnica do substrato definido para *Escherichia coli* nas amostras de água. Nos alimentos também foram pesquisados *Staphylococcus* coagulase positiva, clostrídios sulfito-redutores e *Bacillus cereus* através diluição de 25g de amostra em 225mL de diluente, seguido de plaqueamento de 0,1 ou 1mL, portanto os resultados foram referidos a 1g de amostra e expressos em UFC/g (Unidade Formadora de Colônia/grama); e a *Salmonella* spp através do método de presença ou ausência em 25 gramas da amostra.

Os resultados das amostras de alimentos e de água encontram-se descritos nas Tabelas 1 e 2 a seguir.

Tabela 1. Resultados das análises de alimentos obtidas pelas técnicas do número mais provável, unidade formadora de colônia e presença/ausência em 25 gramas da amostra, coletados nos estabelecimentos envolvidos durante o surto de toxinfecção no município de Cubatão/São Paulo, em 2007.

Origem	Amostra de alimentos	Coliformes termotolerantes (NMP/g) ^a	<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva (UFC/g) ^b	<i>Bacillus cereus</i> (UFC/g)	clostrídios sulfito-redutores (UFC/g)	<i>Salmonella</i> sp/25g (ausência/presença) ^c
Empresa produtora de alimentos	arroz cozido	<3 (10 ²) ^d	<10 ² (10 ³)	<10 ² (10 ³)	NR ^e	ausência (ausência)
	feijão	<3 (10 ²)	<10 ² (10 ³)	<10 ² (10 ³)	<10 (10 ³)	ausência (ausência)
	carne assada	<3 (20)	<10 ² (10 ³)	<10 ² (10 ³)	<10 (10 ³)	ausência (ausência)
	Restaurante da empreiteira	arroz cozido	<3 (10 ²)	<10 ² (10 ³)	<10 ² (10 ³)	NR
Restaurante da empreiteira	feijão	<3 (10 ²)	<10 ² (10 ³)	<10 ² (10 ³)	<10 (10 ³)	ausência (ausência)
	carne assada	28 (20)	<10 ² (10 ³)	<10 ² (10 ³)	<10 (10 ³)	ausência (ausência)

^a NMP: Número mais Provável/g.

^b UFC: Unidade formadora de colônias/g.

^c Metodologia para pesquisa de *Salmonella* em 25g da amostra: ausência/presença.

^d Valores de tolerância para amostra indicativa segundo a Resolução RDC 12/2001 da ANVISA/MS.

^e NR: não realizado por não ser exigido na Resolução RDC 12/2001 da ANVISA/MS.

Tabela 2. Resultados das análises das amostras de água obtidas pela técnica do substrato definido – presença/ausência em 100 mL, coletadas nos estabelecimentos envolvidos durante o surto de toxinfecção no município de Cubatão/SP, em 2007.

Origem	Amostra de águas	Coliformes totais/100mL	<i>Escherichia coli</i> /100mL
Empresa produtora de alimentos	tanque de lavar as mãos	presença	ausência
	tanque de verduras	ausência	ausência
	tanque na área de carga e descarga	presença	ausência
Restaurante da empreiteira	refresqueira	presença	ausência
	pia de lavagem de utensílios	presença	ausência

A amostra de carne assada coletada no restaurante da empreiteira encontrava-se em desacordo com a legislação vigente, por apresentar a contagem dos coliformes termotolerantes valor igual a 28/g calculado pelo método do N.M.P., valor este superior ao limite de 2,0 x 10 estabelecido pela Resolução RDC 12/2001 da ANVISA/Ministério da Saúde⁹. A presença de coliformes termotolerantes em alimentos comercializados tem sido objeto de estudo por diversos autores no Brasil, como os realizados por Salvatori et al.¹³ que identificaram a presença dessas bactérias em embutidos frescos e Silva et al.¹⁴ em amostras de queijos, hortaliças e linguiças. Essas bactérias isoladas nesses alimentos além de caracterizarem produtos impróprios para o consumo podem provocar surtos de intoxicação alimentar. Nos Estados Unidos, Rangel et al.¹⁵

realizaram uma revisão dos 350 surtos de *E. coli* O157 ocorridos no período de 1982-2002 e constataram que a transmissão via alimentar foi responsável por 52% dos casos nas comunidades, restaurantes, redes de estabelecimentos comerciais de alimentos e escolas. Os produtos cárneos foram os alimentos mais envolvidos naqueles surtos.

Embora tenham sido pesquisados tanto coliformes totais quanto termotolerantes, os resultados das amostras de água estavam em desacordo com a Portaria 518/2004 por apresentarem coliformes totais nas amostras coletadas na empresa produtora de alimentos na pia de lavagem e no tanque de descarga e no restaurante da refinaria na água da refresqueira e a pia de lavagem de utensílios, a presença de coliformes tem sido relatada em águas de irrigação e águas dos tanques de lavagem das hortaliças

em cadeias de produção de verduras como os verificados por Takayanagui et al.¹⁶ e Simões et al.¹⁷. Vale ressaltar que a amostra de água da pia de lavagem de verduras da empresa produtora de alimentos não apresentou coliformes totais nem termotolerantes.

A Portaria 518 condena a presença de coliformes totais e fecais em águas provenientes de abastecimento público que tenham recebido qualquer tipo de tratamento, enquanto que sistemas alternativos de captação de água sem tratamento podem conter a presença de coliformes totais que deverão ser pesquisados quanto a sua origem e posterior eliminação da causa.

Embora na pesquisa de *Staphylococcus* coagulase positiva, *Bacillus cereus*, clostrídios sulfito-redutores e *Salmonella* spp nas amostras analisadas os microrganismos não tenham sido detectados, a presença dessas bactérias em surtos de toxinfecção alimentar tem sido descrita por diversos autores. *Staphylococcus aureus* foi identificado por Rodrigues et al.⁸ em sanduíche de galinha consumido por comensais e em queijo de Minas por Sabioni et al.¹⁸; a *Salmonella* foi descrita por Peresi et al.¹⁹ em vários surtos. A presença de *Bacillus cereus* em amostras do ar ambiente e em superfícies de bancadas e equipamento de restaurantes institucionais⁶ também poderiam servir como fonte de contaminação e provocar surtos de toxinfecção alimentar.

A *Pseudomonas aeruginosa* tem sido isolada em água de consumo e de recreação. De acordo com legislação vigente esse microrganismo não está relacionado a enfermidades transmitidas por alimentos motivo pelo qual não é pesquisada como patógeno ou bioindicador da presença dos mesmos. São microrganismos oportunistas relacionados à infecções de pele, ouvidos e olhos e em produtos cárneos crus podem causar deterioração devido a sua capacidade de se desenvolver à temperatura de refrigeração.

Em janeiro de 2008, a Vigilância Sanitária de Cubatão retornou por mais duas vezes tanto na empresa produtora de alimentos como no restaurante da refinaria, coletou amostras de alimentos e encaminhou para o Laboratório Regional de Santos do Instituto Adolfo Lutz, que realizou os exames laboratoriais e constatou que os alimentos encontravam-se dentro dos padrões da normalidade. As medidas corretivas sugeridas no Relatório Técnico do Serviço de Vigilância Sanitária de Cubatão foram satisfatórias porque as respectivas empresas estão cumprindo com as determinações e exigências da Vigilância. Vistorias periódicas serão realizadas para a manutenção e cumprimento das Boas Práticas de Fabricação de Alimentos.

Mostrou-se através do relato a importância da interação entre os serviços de saúde, onde um problema de Saúde Pública em que pessoas acometidas com quadros de diarreias circunscritos em um refeitório de uma empreiteira foram identificadas e tratadas no Pronto Socorro municipal, os casos foram notificados aos serviços de Vigilância Sanitária e Epidemiológica municipal, os quais trabalhando em conjunto ao Centro de Referência à Saúde do Trabalhador e ao Instituto Adolfo Lutz, Laboratório Regional de Santos puderam evitar a ocorrência de novos surtos alimentares.

REFERÊNCIAS

1. Zandonadi RP, Botelho RBA, Sávio KEO, Akutsu RC, Araújo WMC. Atitudes de risco do consumidor em restaurantes de auto-serviço. *Rev Nutr*.2007; 20(1):19-26.
2. Lynch RA, Elledge BL, Griffith CC, Boatright DT. A comparison of food safety knowledge among restaurant managers, by source of training and experience, in Oklahoma County. *J Environ Health*.2003; 66(2): 9-14.
3. Franco BGM, Landgraf M. *Microbiologia dos Alimentos*. São Paulo: Atheneu; 1996.
4. Germano PML, Germano MIS. Agentes bacterianos de toxinfecções. In: Germano PML, Germano MIS, editores. *Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos*. São Paulo: Livraria Varela; 2001. p.199-258.
5. Barros MAF, Nero LA, Monteiro AA, Beloti V. Identification of main contamination points by hygiene indicator microorganisms in beef processing plants. *Ciênc Tecnol Aliment*.2007;27(4): 856-62.
6. Soares CM, Valadares GF, Azeredo RMC, Kuaye AY. Contaminação ambiental e perfil toxigênico de *Bacillus cereus* isolados em serviços de alimentação. *Ciênc Rural*, Santa Maria.2008,38(2): 504-10.
7. Paula P, Rodrigues PSS, Tórtora JC Oliveira, Uchoa CMA, Farage S. Contaminação microbiológica e parasitológica em alfaces (*Lactuca sativa*) de restaurantes self-service, de Niterói, RJ. *Rev Soc Bras Med Trop*.2003; 36(4):535-7.
8. Rodrigues KL, Moreira AN, Almeida ATS, Chiochetta D, Rodrigues MJ, Brod CS, Carvalho JB, Aleixo JAG. Intoxicação estafilocócica em restaurante institucional. *Ciênc Rural*, Santa Maria, 2004; 34(1): 297-299.
9. Brasil. Resolução RDC nº 12 de 2 de janeiro de 2001 da ANVISA do Ministério da Saúde. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 10 jan. 2001. Seção 1, nº 59, p. 45-53.
10. Downes FP, Ito K, editors. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. Washington: Edwards Brothers; 2002.
11. Eaton AE, Clesceri LS, Rice EU, Greenberg AE. *Standard Methods for the examination of water and wastewater*. Baltimore: United Book Press; 2005.
12. Brasil. Portaria nº 518 de 25 de março de 2004 do Ministério da Saúde. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 26 mar. 2004. Seção 1, nº 59, p. 266-70.
13. Salvatori RU, Bessa MC, Cardoso MRI. Qualidade sanitária de embutidos coletados no mercado público central de Porto Alegre-RS. *Ciênc Rural*.2003;33(4):771-3.
14. Silva MP, Cavalli DR, Oliveira TCRM. Avaliação do padrão coliformes a 45°C e comparação da eficiência das técnicas dos tubos múltiplos e petrifilm EC na detecção de coliformes totais e *Escherichia coli* em alimentos. *Ciênc Tecnol Aliment*.2006;26(2): 352-9.
15. Rangel JM, Sparling PH, Crowe C, Griffin PM, Swerdlow DL. Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 Outbreaks, United States, 1982-2002. *Emerg Infect Dis*. 2005;11(4): 603-9.
16. Takayanagui OM, Capuano DM, Oliveira CAD, Bergamini AMM, Okino MHT, Castro e Silva AAMC, Oliveira MA, Ribeiro EGA, Takayanagui AMM. Análise da cadeia de produção de verduras em Ribeirão Preto, SP. *Rev Soc Bras Med Trop*.2006; 39(2): 224-6.
17. Simões M, Pisani B, Marques EGL, Prandi MAG, Martini MH, Chiarini PFT, Antunes JLF, Nogueira AP. Hygienic-sanitary conditions of vegetables and irrigation water from kitchen gardens in the municipality of Campinas, SP. *Braz J Microbiol*. 2001;32:331-3.
18. Sabioni JG, Hirooka EY, Souza MLR. Intoxicação alimentar por queijo minas contaminado com *Staphylococcus aureus*. *Rev Saúde Públ*.1998; 22(5):458-61.
19. Peresi JTM, Almeida IAZC, Lima SI, Marques DF, Rodrigues ECA, Fernandes SA, Gelli DS, Irino K. Surtos de enfermidades transmitidas por alimentos causados por *Salmonella* Enteritidis. *Rev Saúde Públ*.1998;32(5): 477-83.

AGRADECIMENTOS AOS COLABORADORES

O Corpo Editorial agradece a todos os pareceristas abaixo relacionados que, com seu trabalho voluntário e anônimo ao longo de 2008 contribuíram para esta Revista.

-

Ada Maria de Barcelos Alves Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Rio de Janeiro, RJ.

Adelaide Beleia Universidade Estadual de Londrina, Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos, Londrina, PR.

Adriana Ayres Pedroso University of Georgia, Veterinary School. Athens, Estados Unidos.

Adriana de Souza Lima Fundação Ezequiel Dias, Serviço de Química Biológica, Belo Horizonte, MG.

Adriana Mercadante Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, SP.

Adriano Gomes da Cruz Universidade Estácio de Sá, Departamento de Farmácia, Rio de Janeiro, RJ.

Afonso de Liguori Oliveira Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária. Belo Horizonte, MG.

Alda Maria Beackx Noronha Madeira Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Parasitologia, São Paulo, SP.

Alexandre Bella Cruz Universidade do Vale do Itajaí, Centro de Ensino em Ciências da Saúde, Núcleo de Investigações Químico e Farmacêutica, Itajai, SC.

Alexandre Tourino Mendonça Universidade Vale do Rio Verde, Três Corações, MG.

Ana Lucia Peixoto de Freitas Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Departamento de Análises, Porto Alegre, RS.

Anamaria Mello Miranda Paniago Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Departamento de Clínica Médica, Campo Grande, MS.

Ana Paula Santos Instituto Adolfo Lutz, Divisão de Bromatologia e Química, Seção de Farmacognosia, São Paulo, SP.

Ana Terezinha Tavechio Instituto Adolfo Lutz, Divisão de Biologia Médica, Seção de Bacteriologia, São Paulo, SP.

Angela Corrêa de Freitas-Almeida Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Centro Biomédico, Faculdade de Ciências Médicas, Rio de Janeiro, RJ.

Antonio Fernandes de Carvalho Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Viçosa, MG.

Antonio Fernando de Souza Queiroz Universidade Federal da Bahia, Instituto de Geociências, Departamento de Geoquímica, Salvador, BA.

Carlos Alberto Ribeiro Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Serviço de Patologia Clínica, Unidade de Bioquímica, Porto Alegre, RS.

Carlos Eugenio Daudt Universidade Federal de Santa Maria, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Santa Maria, RS.

Carlos Termignoni Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Centro de Biotecnologia, Porto Alegre, RS.

Carlos Wanderlei Piler Carvalho Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisa de Tecnologia Agroindustrial de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ.

Celso di Loreto Instituto Adolfo Lutz, Secretaria de Estado da Saúde, São Paulo, SP.

Cid Aimbiré de Moraes Santos Universidade Federal do Paraná, Departamento de Farmácia, Curitiba, PR.

Cintia de Moraes Borba Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Departamento de Micologia, Rio de Janeiro, RJ.

Claudia Lúcia de Oliveira Pinto Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, Centro Tecnológico da Zona da Mata, Viçosa, MG.

Claúdio Celestino de Oliveira Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Exatas, Departamento de Química, Maringá, PR.

Claudio Dias Timm Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Veterinária, Pelotas, RS.

Cristiane Bonaldi Cano Instituto Adolfo Lutz, Divisão de Bromatologia e Química, Seção de Bebidas, São Paulo, SP.

Cyntia Maria Telles Fadel Picheth Universidade Federal do Paraná, Laboratório de Bacteriologia Clínica, Curitiba, PR.

Daisy Maria Favero Salvadori Universidade Estadual de São Paulo, Faculdade de Medicina de Botucatu, Departamento de Patologia, Botucatu, SP.

Daniel Altino de Jesus Instituto de Saúde do Paraná, Laboratório Central, Curitiba, PR.

Dione Marçal Lima Universidade Federal de Goiás, Faculdade de Farmácia, Departamento de Tecnologia Farmacêutica, Goiânia, GO.

Djalva Maria da Nóbrega Santana Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Tecnologia, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Seropédica, RJ.

Eduardo Vicente Instituto de Tecnologia de Alimentos, Centro de Química de Alimentos e Nutrição Aplicada, Campinas, SP.

Edwin Elard Garcia Rojas Universidade Federal Fluminense, Pólo Universitário de Volta Redonda, Volta Redonda, RJ.

Eliana de Fátima Marques de Mesquita Universidade Federal Fluminense, Faculdade de Veterinária, Laboratório do Pescado, RJ.

Eliete Vaz de Faria Instituto de Tecnologia de Alimentos, LAFISE - Laboratório de Análises Físicas Sensoriais e Estatística, Campinas, SP.

Elisa Hirooka Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos, Londrina, PR.

Elizabeth Accioly Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Nutrição “Josué de Castro”, Rio de Janeiro, RJ.

Elton Nunes Britto Coordenação de Pesquisas em Biologia Aquática, Manaus, AM.

Emy Takemoto Instituto Adolfo Lutz, Divisão de Bromatologia e Química, Seção de Óleos e Gorduras, São Paulo/SP.

Ernani Porto Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Departamento de Alimentos Agroindústria e Nutrição, Piracicaba, SP.

Fernando Carlos de Lander Schmitt Universidade do Porto, Instituto de Patologia e Imunologia Molecular, Porto, Portugal.

Flavia Saldanha Kubrusly Instituto Butantan, Centro de Biotecnologia, São Paulo, SP.

Giselle Ibetta Silva Lopez Lopes Instituto Adolfo Lutz, Divisão de Bromatologia e Química, Seção de Microbiologia Alimentar, São Paulo, SP.

Harumi Sakuma Instituto Adolfo Lutz, Divisão de Bromatologia e Química, Seção de Microbiologia Alimentar, São Paulo, SP.

Helena Rodrigues Lopes Universidade Federal Fluminense, Centro de Ciências Médicas, Instituto Biomédico, Niterói, RJ.

Izildinha Moreno Instituto de Tecnologia de Alimentos, Secretária da Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo, Centro de Tecnologia de Laticínios, Campinas, SP.

Jane Martha Graton Mikcha Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências de Saúde, Departamento de Análises Clínicas, Maringá, PR.

Jaqueline Macruz Peresi Instituto Adolfo Lutz Regional São José do Rio Preto, São José do Rio Preto, SP.

Jesui Vergilio Visentainer Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências de Saúde, Departamento de Química, Maringá, PR.

João Bosco Faria Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Alimentos e Nutrição, Araraquara, SP.

João Wayne Pinheiro Universidade Estadual de Londrina, Departamento de Zootecnia, Londrina, PR.

Jorge Horii Universidade de São Paulo, Escola de Agricultura Luiz de Queiroz, Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição, Piracicaba, SP.

José Leonardo Eto do Valle Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, SP.

Jussara Carvalho de Moura Della Torre Instituto Adolfo Lutz, Divisão de Bromatologia e Química, Seção de Óleos e Gorduras, São Paulo, SP.

Kênnia Rocha Rezende Universidade Federal de Goiás, Faculdade de Farmácia, Goiânia, GO.

Larissa Lagoa Ribeiro Furtini Universidade Federal de Lavras, Laboratório de Microbiologia, Lavras, MG.

Leila Carvalho Campos Fundação Oswaldo Cruz, Laboratório de Patologia e Biologia Molecular, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, BA.

Leonor Almeida de Souza Soares Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Departamento de Química, Rio Grande, RS.

Luiz Carlos da Cunha Universidade Federal de Goiás, Faculdade de Farmácia, Goiânia, GO.

Luiz Simeão do Carmo Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Microbiologia, Belo Horizonte, MG.

Maisa Splendore Della Casa Instituto Butantan, Laboratório de Imunopatologia, São Paulo, SP.

Márcio Sobreira Silva Araújo Fundação Oswaldo Cruz, Instituto René Rachou, Belo Horizonte, MG.

Marco Antonio Moreira Furtado Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica, Juiz de Fora, MG.

Marcos Antônio Segatto Silva Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Florianópolis, SC.

Maria Aparecida Nicoletti Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo, SP.

Maria Cristina Dantas Vanetti Universidade Federal de Viçosa, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Departamento de Microbiologia, Viçosa, MG.

Maria Inês Zanoli Sato Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, Departamento de Análises Ambientais, São Paulo, SP.

Maria Inez de Moura Sarquis Instituto Oswaldo Cruz- FIOCRUZ, Coleção de Cultura de Fungos, Rio de Janeiro, RJ.

Maria Irma Seixas Duarte Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, Departamento de Patologia, São Paulo, SP.

Maria José Cavalieri Instituto Adolfo Lutz, Divisão de Patologia, São Paulo, SP.

Maria Lucia Ribeiro Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Química de Araraquara, Departamento de Química Orgânica, Araraquara, SP.

Maristela do Nascimento Silva Instituto de Tecnologia de Alimentos, Laboratório de Microbiologia, Campinas, SP.

Miguel Machinski Junior Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Análises Clínicas, Maringá, PR.

Miracy Muniz de Albuquerque Universidade Federal de Pernambuco, Núcleo de Controle de Qualidade de Medicamentos e Correlatos, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Recife, PE.

Miria Dall'Agnol Centro de Referência da Saúde da Mulher, São Paulo, SP.

Miriam Solange Fernandes Caruso Instituto Adolfo Lutz, Divisão de Bromatologia e Química, Seção de Cromatografia, São Paulo, SP.

Nádia Araci Bou-Chacra Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Farmácia, São Paulo, SP.

Neide Hiromi Tokumaru Miyazaki Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Departamento de Microbiologia, Rio de Janeiro, RJ.

Neura Bragagnolo Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Departamento de Ciência de Alimentos, Campinas/SP.

Neuza Jorge Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos, São José do Rio Preto, SP.

Patrícia Sartorelli Universidade Federal de São Paulo, Curso Química, Campus Diadema, Diadema, SP.

Regina Baptista dos Reis Universidade Federal de Mato Grosso, Faculdade de Nutrição, Departamento de Alimentos e Nutrição, Cuiabá, MT.

Regine Helena Silva dos Fernandes Vieira Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Instituto de Ciências do Mar – LABOMAR, Fortaleza, CE.

Renata Brum Martucci Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ.

Renata Katsuko Takayama Kobayashi Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Londrina, PR.

Ricardo Souza Dias Fundação Ezequiel Dias Instituto Octávio Magalhães, Laboratório de Enterotoxinas, Belo Horizonte, MG.

Robson Maia Franco Universidade Federal Fluminense, Faculdade de Veterinária, Departamento de Tecnologia dos Alimentos, Niterói, RJ.

Ronaldo Zucattelli Mendonça Instituto Butantan, Laboratório de Imunologia Viral, Seção de Imunologia Viral, São Paulo, SP.

Rosemar Antoniassi Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisa de Tecnologia Agroindustrial de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ.

Saulo Duarte Passos Faculdade de Medicina de Jundiaí, Departamento de Pediatria, Infecto Pediatria, Jundiaí, SP.

Solange Cristina Garcia Pomblum Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Santa Maria, RS.

Solange de Paula Ramos Universidade Estadual de Londrina, Departamento de Histologia, Londrina, PR.

Sonia Maria dos Santos Fundação Universidade Regional de Blumenau, Conselho de Ensino, Pesquisa e Extensão, Blumenau, SC.

Telma Elita Bertolin Universidade de Passo Fundo, Instituto de Ciências Biológicas, Centro de Pesquisa em Alimentação, Passo Fundo, RS.

Thales de Brito Universidade de São Paulo, Instituto de Medicina Tropical, Laboratório de Imunopatologia, São Paulo, SP.

Thelma de Filippis Centro Universitário de Belo Horizonte, Belo Horizonte, MG.

Valderez Gambale Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Microbiologia, São Paulo, SP.

Vânia Helena Techio Universidade do Contestado, Campus Concórdia, Centro de Pesquisa, Concórdia, SC.

Agradecimento especial pela revisão do inglês

Mirthes Ueda Instituto Adolfo Lutz, Divisão de Biologia Médica, Seção de Sorologia, São Paulo, SP.

ISSN 0073-9855



9 770073 985009