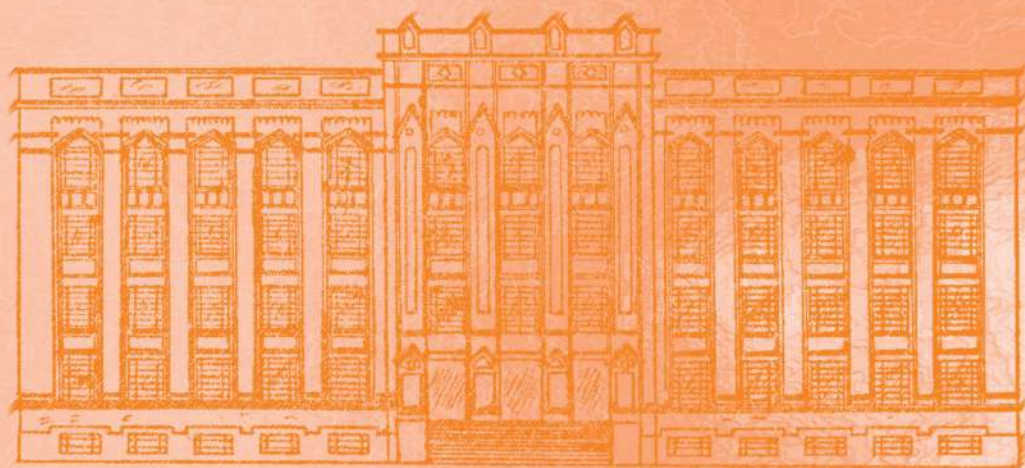


REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ

ISSN 0073-9855
RIALA6



Volume 67 número 1, 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 1, 2008

ISSN 0073-9855

Janeiro – Abril - 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 Restreppo, Medellín, Colômbia.
Maria José Mendes Gianini, Araraquara, Brasil.
Marluce Bibbo, Pennsylvania, EUA.
Martin Emilio Munk, Copenhague, 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 (1)

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. Ensaios Clínicos: 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 Ensaios Clínicos 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 n° 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, n° 60-E, p. 5-6.

Brasil. Resolução n° 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

Artigo de Revisão/ Review Article

- 1146 **Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos - benzo(a)pireno: uma revisão**
Polycyclic aromatic hydrocarbons - benzo(a)pyrene: a review
Miriam S. F. CARUSO, Janete ALABURDA 1-27

Artigos Originais/ Original Articles

- 1147 **Avaliação do teor alcoólico e componentes secundários de cachaças**
Evaluation of alcoholic strength and congeners in cachaças
Miriam S. F. CARUSO, Leticia A. F. NAGATO, Janete ALABURDA 28-33
- 1148 **Efeito antioxidante do extrato de coentro (*Coriandrum sativum* L.) e do palmitato de ascorbila na estabilidade oxidativa do óleo de girassol**
Antioxidant effect of coriander extract (*Coriandrum sativum* L.) and of ascorbyl palmitate on the oxidative stability of sunflower oil
Priscila M. ANGELO, Neuza JORGE 34-38
- 1149 **Conteúdo de miristicina em preparados de noz moscada (*Myristica fragans*, Houtt)**
Myristicin contents in nutmeg (*Myristica fragans*, Houtt) preparations
Guiomar F. TEIXEIRA, Jaqueline G. BUFFON, Ana Luiza M. BAISCH, Eliana B. FURLONG 39-45
- 1150 **Determinação da microbiota histamina positiva em camarão**
Histamine - positive microbiota occurrence in shrim
Carine S. ANDRADE, Janice I. DRUZIAN, Clécia C. LEITE, Celso D. CARVALHO FILHO,
Maria P. S. MIRANDA, Cláudia S. MACÊDO, Aláise G. GUIMARÃES 46-51
- 1151 **Composição química de farinhas pré-cozidas por extrusão elaboradas com arroz e café torrado**
Chemical composition of pre-cooked flours produced by extrusion of rice and roasted coffee blending
Reginaldo F. SILVA, José L. R. ASCHERI, Rosemary G. F. A. PEREIRA 52-58

- 1152 **Estudo comparativo da expressão de carboidratos no sistema ovo-granuloma hepático na esquistossomose humana e experimental**
Comparative study on carbohydrate expression in hepatic egg-granuloma system in human and experimental schistosomiasis
Mariana T. GUIMARÃES, Mario R. MELO-JUNIOR, Rodrigo B. COSTA SILVA, Carmelita B. L. CAVALCANTE, Eduardo I. C. BELTRÃO 59-63
- 1153 **Campanha de prevenção de câncer cervical: estudos no Instituto Adolfo Lutz mostram a necessidade de avaliação na faixa etária**
Cervical cancer screening programs: study at Instituto Adolfo Lutz show a necessity of an age-group evaluation.
Daniela ETLINGER Lluís Ramos, Sonia Maria Miranda PEREIRA, Koki Fernando OIKAWA, Antonio Carlos MARIN, Rosângela Santos ARAÚJO, Cleusa de Jesus de SOUZA, Luzia Setuko Umeda YAMAMOTO 64-68
- 1154 **Surveillance epidemiological: parvovirus B19 genotype 1**
Vigilância epidemiológica: parvovirus B19 genótipo 1
Maria Isabel de OLIVEIRA, Ana Maria S. AFONSO, Cristina A. FIGUEIREDO, Suely P. CURTI, Ana L. FRUGIS YU 69-72

Comunicação Breve/ Brief Communication

- 1155 **Avaliação microbiológica e físico-química durante o processamento do leite pasteurizado**
Physical-chemical and microbiological evaluation during the pasteurized milk processing
Walécia S. ATAÍDE, Janeeyre F. MACIEL, Pedro L. A. LIMA, Ana R. C. LIMA, Fernanda V. G. SILVA, João A. SILVA 73-77
- 1156 **Pesquisa de anorexígenos e benzodiazepínicos em formulações emagrecedoras e avaliação de rotulagem, em análises da Seção de Farmacognosia do Instituto Adolfo Lutz no período de junho de 2004 a março de 2007.**
Detection of anorexigen and benzodiazepinic drugs in weight reducers compounded formulations and analysis on label contents adequacy. Pharmacognosy Laboratory - Instituto Adolfo Lutz - June 2004 - March 2007.
Helena M. YANO, Ana P. SANTOS, Adriana BUGNO, Mariangela T. AURICCHIO 78-82
- 1157 **Molecular surveillance of an imported measles virus infection in Sao Paulo, Brazil**
Vírus do sarampo: Vigilância molecular de um caso importado em São Paulo, Brasil
Maria Isabel de OLIVEIRA, Ana Maria S. AFONSO, Cristina A. FIGUEIREDO, Ana Lucia FRUGIS YU, Suely P. CURTI 83-86

Resumos de Tese e Dissertação

- Nutritional labeling of sweet and salted foods consumed by children and adolescents
Lobanco, CM 87

Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos - benzo(a)pireno: uma revisão

Polycyclic aromatic hydrocarbons - benzo(a)pyrene: a review

RIALA6/1146

Miriam Solange Fernandes CARUSO^{1*}, Janete ALABURDA²

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

² Instituto Adolfo Lutz, Divisão de Bromatologia e Química, Seção de Química Biológica. Av. Dr. Arnaldo, 355, CEP 01246-902, São Paulo,SP/Brasil.

Recebido: 01/06/2007 – Aceito para publicação: 03/04/2008

RESUMO

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) constituem um grupo de compostos contendo dois ou mais anéis aromáticos condensados. Estes compostos são formados, principalmente, pela combustão incompleta da matéria orgânica. Os estudos em cobaias têm demonstrado que muito desses compostos, incluindo o benzo(a)pireno (BaP), são carcinogênicos e mutagênicos, sendo também considerados potencialmente genotóxicos e carcinogênicos para os humanos. O BaP é um dos HPAs mais estudados e é utilizado como indicador da presença de outros HPAs. Esse composto é um contaminante de ampla distribuição ambiental, presente em diversas matrizes, como solo, água, ar e alimentos. Na presente revisão são abordados os aspectos gerais dos HPAs, especialmente do BaP, assim como as metodologias analíticas publicadas desde a década de 1960. São apresentadas as modificações nos diferentes métodos de extração e nos solventes utilizados, as quais têm resultado numa significativa redução de tempo de análise, de volumes de solvente e de custo. São também discutidas as técnicas cromatográficas empregadas para a quantificação desses compostos, como CLAE e CGMS.

Palavras-chave. benzo(a)pireno, técnicas analíticas, alimentos, bebidas, água.

ABSTRACT

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are a chemical group composed of more than one hundred organic compounds containing two or more condensed aromatic rings. They are produced by an incomplete combustion of organic material. Many of them, including benzo(a)pyrene (BaP), have shown to be carcinogenic and mutagenic in experimental animals, and these compounds have been regarded as potentially genotoxic and carcinogenic to humans. BaP has been the most commonly subject of study, and PAH compound has been used as an indicator of total PAHs contamination. The present review describes some general topics on PAHs, mainly BaP, including the analytical methodologies for its quantification, which have been reported since 1960. Modifications on different extraction methodology and solvents, which resulted in reduction of turn-around time, solvent volumes, and analysis cost are also discussed. Chromatography techniques for PAHs and BaP quantification, such as HPLC and GC-MS are commented.

Key words. polycyclic aromatic hydrocarbons, benzo(a)pyrene, analytical methodologies, food, beverage, water.

INTRODUÇÃO

Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

Nas últimas décadas, a contaminação de alimentos por substâncias tóxicas tem sido objeto de intensas pesquisas. Diversas classes de compostos químicos de diferentes origens vêm sendo detectadas em alimentos e bebidas, dentre elas os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs)¹⁻⁶.

Os HPAs representam uma família de mais de 100

compostos orgânicos, formados por carbono e hidrogênio, contendo 2 ou mais anéis aromáticos condensados. São formados, principalmente, em processos de combustão incompleta de matéria orgânica e encontram-se na natureza como contaminantes de solos, ar, água e alimentos¹. Os HPAs são poluentes orgânicos de importância ambiental e de interesse toxicológico, pois muitos apresentam propriedades pré-carcinogênicas e/ou mutagênicas para homens e animais^{4,7}.

Origem

Os HPAs são produzidos por combustão incompleta ou pirólise da matéria orgânica. A formação pirolítica de HPAs é bastante complexa e variável, dependendo das condições reacionais. O esquema mecanístico aceito para esta reação envolve a polimerização via radicais livres, em várias etapas, até a formação de núcleos aromáticos condensados⁷. A formação destes compostos depende de fatores como tipo da biomassa presente, quantidade de oxigênio disponível, pressão e, principalmente, de calor, pois a concentração de HPAs aumenta linearmente na faixa de temperatura de 400 a 1000°C⁸.

Estudos revelam que os HPAs podem ser provenientes de várias fontes antropogênicas como queima de carvão, escapamentos de veículos, óleos lubrificantes usados em motores, fumaça de cigarro, dentre outras, bem como de fontes ambientais como erupções vulcânicas e queimadas espontâneas. A contribuição de fontes naturais é muito limitada, contribuindo com pequenas quantidades de HPAs, enquanto que as fontes antropogênicas representam o principal processo de emissão destes compostos^{2,3,9}.

Propriedades físico-químicas dos HPAs

As propriedades físicas e químicas dos HPAs são amplamente determinadas pelo sistema de duplas conjugadas presentes nas estruturas desta classe de compostos. À temperatura ambiente todos os HPAs são sólidos e apresentam, comumente, altas temperaturas de fusão e ebulição, baixas pressão de vapor e solubilidade em água. Os valores referentes a estas duas últimas propriedades tendem a diminuir com o aumento da massa molecular⁷.

Alguns HPAs são semi-voláteis, porém, muitos deles podem ser transportados até longas distâncias e serem adsorvidos em material particulado^{10,11}. HPAs com 2 ou 3 anéis aromáticos estão quase totalmente na fase de vapor; aqueles com 4 anéis encontram-se numa posição intermediária. Os HPAs com 5 ou mais anéis aromáticos são encontrados predominantemente em particulados (cinzas ou fuligens cujas partículas são menores que 2,5 µm)⁸.

Com relação à sua característica lipofílica, os HPAs tendem a se acumular em tecidos lipídicos de plantas e animais; com relação às plantas, estes compostos concentram-se mais na superfície (peles e folhas) do que nos tecidos internos¹⁰. Apesar da pouca solubilidade em água, os mesmos podem ser transportados em meios aquáticos, adsorvidos em partículas em suspensão, ficando posteriormente, depositados nos sedimentos¹¹. Devido a habilidade em filtração de água e por não apresentarem capacidade de biotransformá-los, determinados animais marinhos, como ostras e mexilhões, acabam acumulando os HPAs em seus organismos¹².

Os HPAs são quimicamente inertes, porém, quando reagem, participam de reações de substituição eletrofílica e de adição. No caso das reações de adição, os compostos formados tendem a sofrer reações de eliminação, regenerando a aromaticidade⁷.

Toxicidade

O interesse pelo estudo da contaminação por HPAs e seus derivados reside no fato de que muitos deles são potencialmente carcinogênicos e mutagênicos^{4,13}. Os HPAs estão entre aqueles poluentes ambientais que apresentam atividade cancerígena e mutagênica, podendo provocar tumoração em animais e mutação em bactérias².

A exposição humana aos HPAs pode ocorrer por diferentes vias, como inalação, pele ou por ingestão. A ação exercida pelos HPAs é ativada durante o seu processo metabólico, visando à formação de compostos hidrossolúveis para facilitar a sua excreção. O mecanismo de eliminação envolve a formação de epóxidos, seguidos de compostos polihidroxilados, os quais são mais solúveis em água, viabilizando a sua eliminação pela via urinária. Um destes intermediários pode reagir com a guanina do DNA e formar um aduto dando origem a processos de tumoração⁷.

Segundo a Agência Internacional de Pesquisas sobre o Câncer (IARC), os HPAs são classificados de acordo com a evidência de carcinogenicidade em humanos e em animais experimentais. A Tabela 1 apresenta a classificação de alguns HPAs de acordo com a evidência de sua carcinogenicidade¹⁴.

Tabela 1. Classificação de alguns HPAs de acordo com os grupos estabelecidos pela IARC, com relação à evidência carcinogenicidade¹⁴.

HPA	Classificação
Antraceno	Grupo 3
Benzo(a)antraceno	Grupo 2B
Benzo(b)fluoranteno	Grupo 2B
Benzo(j)fluoranteno	Grupo 2B
Benzo(k)fluoranteno	Grupo 2B
Benzo(g,h,i)fluoranteno	Grupo 3
Benzo(c)fenantreno	Grupo 2B
Benzo(a)pireno	Grupo 1
Benzo(e)pireno	Grupo 3
Criseno	Grupo 2B
Coroneno	Grupo 3
Dibenzo(a,c)antraceno	Grupo 3
Dibenzo(a,h)antraceno	Grupo 2 ^A
Dibenzo(a,j)antraceno	Grupo 3
Fluoranteno	Grupo 3
Fluoreno	Grupo 3
Indeno 1,23-cd-pireno	Grupo 2B
Naftaleno	Grupo 3
Pireno	Grupo 3

Incidência de HPAs nos alimentos

Os alimentos e bebidas são uma das maiores fontes de exposição humana aos HPAs. A ocorrência destes nos alimentos é influenciada pelas mesmas características físico-químicas que determinam sua absorção e distribuição em humanos². Diversos estudos têm sido realizados comprovando a presença destes compostos em vários alimentos brutos ou processados, além de bebidas e águas^{1,15-18}.

Os alimentos podem ser contaminados a partir de HPAs disseminados no meio ambiente (ar atmosférico, solo ou água) ou durante o processamento e cozimento. As principais etapas de processamento são secagem e defumação e as de cozimento são as que utilizam altas temperaturas, tais como aquelas que envolvem ações de grelhar, assar e fritar¹⁹. Em áreas distantes de centros urbanos e industriais, os teores de HPAs presentes nos alimentos não processados refletem a contaminação ambiental¹³.

Algumas pesquisas têm sido realizadas com o objetivo de se avaliar quais são os grupos de alimentos que mais contribuem na ingestão humana destes contaminantes. Diversos trabalhos relatam a ocorrência de HPAs em diversos tipos de alimento, incluindo óleos vegetais, margarinas, maionese, produtos defumados, chás, café, leite e produtos lácteos, cereais, frutas, vegetais, carnes, peixes e frutos do mar, entre outros^{15,16,18,20-23}.

Na Inglaterra, em um estudo realizado em 1983, foi verificado que dentre os grupos de alimentos, o dos óleos e gorduras e o dos cereais foram os que apresentaram os maiores níveis de HPAs. Apesar do grupo de óleos e gorduras apresentarem os maiores teores de HPAs, o grupo dos cereais foi o que mais contribuiu para a ingestão diária devido ao seu alto consumo¹⁸.

Na Holanda, verificou-se a presença de 17 HPAs nos principais grupos alimentícios que fazem parte da dieta da população, sendo que a ingestão de açúcar e correlatos foi uma das maiores fontes de HPAs. Nestes produtos foi observada uma elevada concentração de criseno, equivalente a 36 µg.kg⁻¹¹⁵. Em uma outra pesquisa também realizada na Holanda, os autores observaram altos teores de HPAs em mexilhão e em repolho²⁴. A estimativa da ingestão diária de HPAs foi de 1,1 a 22,0µg/pessoa/dia, sendo que 30% desse valor correspondeu aos HPAs com atividade carcinogênica.

Na Itália foi constatado que os grupos dos cereais, produtos lácteos, carnes, vegetais e frutas foram os maiores responsáveis pela ingestão de HPAs. A estimativa da ingestão foi de 3,0 µg/pessoa/dia com base em todos HPAs e de 1,4 µg/pessoa/dia para os carcinogênicos²³.

No Brasil, a ingestão diária de HPAs foi estimada em 11 regiões, com base em valores médios de consumo *per capita* de alimentos e em dados analíticos dos níveis de HPAs totais e carcinogênicos; foram escolhidos os alimentos representativos da dieta destas regiões. As maiores concentrações de HPAs foram obtidas no grupo de óleos e gorduras, seguido pelos grupos de açúcares e vegetais. Os óleos e gorduras se

destacaram como fonte de HPAs em 10 áreas estudadas, sendo que, somente em Belém, o grupo das carnes contribuiu de forma mais significativa para a ingestão diária desses contaminantes²⁵.

No âmbito do *Codex Alimentarius*, a necessidade de estabelecimento de limites para HPAs em alimentos tem sido manifestada por inúmeros países. Em 1991, o benzo(a)pireno foi reavaliado pelo Comitê Conjunto FAO/OMS de Peritos em Aditivos Alimentares (JECFA), que recomendou a elaboração de estratégias por parte das indústrias e dos consumidores para minimizar a exposição humana a este contaminante. Na 64ª Reunião do JECFA, realizada em Roma, em fevereiro de 2005, este Comitê identificou 13 HPAs como sendo genotóxicos e carcinogênicos, sendo eles: benzo(a)antraceno, benzo(b)fluoranteno, benzo(j)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, criseno, dibenzo(a,h)antraceno, dibenzo(a,e)pireno, dibenzo(a,h)pireno, dibenzo(a,i)pireno, dibenzo(a,l)pireno, indeno[1,2,3-cd]pireno e 5-metilcriseno²⁶.

A Tabela 2 apresenta os teores de HPAs totais em algumas amostras de alimentos e bebidas. A partir dos dados é possível observar como o processamento pode influenciar na contaminação dos produtos, uma vez que os que apresentam os maiores teores de HPAs são aqueles submetidos a processos que envolvem elevadas temperaturas como secagem, torrefação ou defumação. Nas infusões de chá e café as concentrações de HPAs são relativamente menores em função da baixa solubilidade destes compostos em água, ficando depositados nas folhas ou partículas do pó. As bebidas alcoólicas foram as que apresentaram os teores mais baixos de HPAs, provavelmente, porque a destilação favorece a eliminação destes contaminantes^{1,5,7,10,16,17,19,21,27,28}.

Tabela 2. Concentração de HPAs totais em alguns tipos de alimentos e bebidas.

Gênero	HPAs Totais (ppb)	Referência
Óleos vegetais/gorduras	32,90	1
Margarinas	1,7 – 3,9	7
Carnes e derivados	13,43	16
Carnes defumadas (porco, salsicha e salmão)	5 - 52	19
Açúcar	15,44	1
Purê de batata	9,35 – 17,1	17
Vegetais	0,887	16
Pó de café	20,04	21
Café coado	3,0	21
Chá preto (folhas)	8800 ± 360	10
Chá verde (folhas)	566 ± 35	10
Chá mate (infusão)	0,6418 – 2,319	27
Cachaça	ND a 1,94	28
Rum branco	ND a 0,0009	5
Whisky	0,0036	5

ND = não detectado

Degradação

Os HPAs são quimicamente estáveis, mas são suscetíveis à oxidação e foto-degradação pela luz. As meias vidas no ar variam numa faixa de poucas horas a dias; já, no solo, estima-se que as meias vidas possam ser de vários meses a muitos anos⁹.

Os HPAs com 4 anéis aromáticos são biodegradáveis sob condições aeróbias e a velocidade de degradação diminui com o aumento do número de anéis. A biodegradação sob condições anaeróbias é lenta para todos os compostos. Normalmente, as reações acontecem pela introdução de dois grupos hidroxilas nos núcleos aromáticos, formando dihidrodíóis intermediários. A degradação bacteriana produz cis-dihidrodíóis intermediários, enquanto que o metabolismo dos fungos e mamíferos produz trans-dihidrodíóis intermediários. Certos tipos de algas também podem degradar os HPAs⁹.

Benzo(a)pireno

Dentre os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, o benzo(a)pireno é um dos mais conhecidos e estudados. Segundo a recomendação da International Union Pure and Applied Chemistry, IUPAC, a grafia correta é benzo[a]pireno, enquanto que o Chemical Abstract adota benzo(a)pireno. Também são observados na literatura as seguintes formas: benzo(def)criseno; 1,2-benzopireno; 3,4-benzopireno; 6,7-benzopireno; alfa-benzopireno; benzo(alfa)pireno; 3,4-benzpireno; 3,4-benz(a)pireno; BaP e B(a)P^{4,9,29}.

Breve histórico

O início dos estudos dos HPAs teve sua origem em 1931 com o isolamento do benzo(a)pireno (BaP) a partir do carvão e sua síntese no mesmo ano. Os primeiros dados referentes aos riscos ocupacionais e ambientais dos HPAs foram obtidos em 1922 pela demonstração de que extratos orgânicos de fuligem eram carcinogênicos em animais. Além da atividade cancerígena do extrato de material particulado ambiental, o BaP foi identificado em fuligem doméstica e posteriormente em material particulado ambiental. Em 1970, ele foi caracterizado como um agente cancerígeno de distribuição mundial, em ambientes respiráveis e como constituinte de aerossóis urbanos³⁰.

Dentre os HPAs, o BaP tem sido o composto mais amplamente avaliado. Em fevereiro de 2005 a Comissão da Comunidade Européia, através do Regulamento (CE) n° 208 de 04 de fevereiro de 2005, estabeleceu níveis máximos para benzo(a)pireno em alguns alimentos, tais como: peixes, óleos e gorduras ($2,0\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$); crustáceos, carnes e peixes defumados ($5,0\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$); moluscos bivalves ($10,0\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) e alimentos infantis ($1,0\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)³¹. No Brasil, a legislação vigente somente determina que os aromatizantes/aromas de fumaça não poderão fornecer mais de $0,03\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ de benzo(a)pireno no alimento final³² e estabelece limite máximo de $0,7\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de benzo(a)pireno em águas potáveis³³.

Características físico-químicas

O BaP possui a aparência de cristais amarelo-pálidos em forma de agulhas, fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{12}$ e peso molecular 252,3⁹. Apresenta baixa volatilidade, seus pontos de fusão e ebulição são 178,1 e 310-312°C (a 10mmHg), respectivamente. Sua pressão de vapor (25°C) é $2,13 \times 10^{-5}$ e a constante de Henry (20°C) $1,86 \times 10^{-5}$. Sofre foto-oxidação quando exposto à luz solar ou radiação fluorescente. Reage com NO ou NO₂ para formar nitroderivados; é oxidado pelo ozônio, produzindo benzo(a)pireno-(1,6 ou 3,6)-quinona^{9,13}.

Como os demais HPAs, o BaP é lipossolúvel, apresentando coeficiente de partição octanol/água (log Kow) igual a 6,04 e solubilidade em água a 25°C de $3,8\mu\text{g}/\text{L}$ ¹³. Desta forma, em sistemas aquosos, o BaP tende a concentrar-se em sedimentos ou permanecer associado à matéria orgânica em suspensão⁹.

Toxicidade

O BaP é considerado um dos mais potentes agentes carcinogênicos em animais, além de embriotóxico e teratogênico¹⁴. Por esta razão, ele tem sido utilizado como indicador da presença de outros HPAs em amostras ambientais, alimentos e bebidas³¹.

Após ser absorvido por animais, o BaP é biotransformado no fígado por uma classe enzimática denominada citocromo P-450 monooxigenases. Nas células hepáticas, as reações catalisadas pela citocromo P450-monooxigenase se processam no compartimento celular composto por uma rede tridimensional de túbulos e cisternas interconectados, que vai desde a membrana nuclear até a membrana plasmática, isto é, no retículo endoplasmático. Estas conexões intracelulares permitem que, após as reações de biotransformação, os HPAs hidroxilados sejam eliminados da célula⁹.

A toxicidade do BaP é provocada por sua potente ação pró-carcinogênica uma vez que alguns dos seus metabólitos intermediários são intercalantes de DNA e, portanto, agentes mutagênicos/oncogênicos. Processos neoplásicos são claramente observados em fígado de peixes e mamíferos já após 6 h ao tratamento com concentrações de BaP da ordem de 250 ppb².

Metodologia analítica para determinação de BaP e outros HPAs em amostras de alimentos, bebidas e águas.

A metodologia para análise de BaP ou outros HPAs em alimentos vem sofrendo modificações visando aumentar a eficácia dos métodos em relação à extração, sensibilidade e reprodutibilidade, entre outros parâmetros. A Tabela 3 traz uma revisão de diversos trabalhos científicos desde a década de 60 nos quais estão descritos os métodos mais utilizados para análise de BaP ou HPAs em alimentos, bebidas e águas, bem como as respectivas concentrações encontradas. A seguir, estão descritas as metodologias de extração e de quantificação de HPAs comumente utilizadas.

Tabela 3. Evolução da metodologia para análise de HPAs e BaP ao longo do tempo.

ANO	REF.	AMOSTRA	BaP, ppb	MÉTODO	RECUPERAÇÃO	LD/LQ
1966	6	Alimentos defumados (500g): queijo tipo Gouda, peixes (salmão e esturjão), presunto, porco. Alimentos não defumados e queijo tipo Cheddar (500g).	Alimentos defumados.: ND-3,2 Peixes não defumados: BaP não encontrado Queijo tipo Cheddar: BaP não encontrado (apenas pireno e fluoranteno).	Saponificação com KOH etanólico; ELL com isoctano; purificação em coluna clássica de Florisil (elução com benzeno); ELL com H ₃ PO ₄ , DMSO/isoctano; purificação em coluna de Florisil (elução com benzeno); separação em cromatografia em papel e em camada delgada; Quantificação: medida da absorbância por espectrofotometria-UV. Reagentes e solventes utilizados (quantidades aproximadas): Na ₂ SO ₄ (785g), KOH (50g), Etanol (1350 mL), isoctano (1050 mL), benzeno (535mL), H ₃ PO ₄ (300mL), DMSO (150 mL).	P/ 2 ppb: Salsicha: 71% Queijo: 77% Peixe: 78%	Não citado.
1966	34	Óleos vegetais (200 g).	Óleos de soja, algodão, milho, oliva e amendoim: Traços de BaP.	ELL com isoctano, H ₃ PO ₄ e DMSO; purificação em coluna clássica e separação em cromatografia em papel e em camada delgada; quantificação: medida da absorbância por espectrofotometria-UV e espectrofotometria. Confirmação por GC-MS. Reagentes e solventes utilizados (quantidades aproximadas): isoctano (1060 mL), metanol (700 mL), benzeno (225mL), H ₃ PO ₄ (600mL), DMSO (175 mL).	P/ 2 ppb de HPA com 4 a 5 anéis: Média de 71 a 92%	Não citado.
1966	35	Salsichas alemãs, queijo e peixe (75 a 100g).	Alimentos totais: 1,0 a 3,2	Saponificação com KOH etanólico; ELL com isoctano; purificação em coluna clássica de Florisil (elução com benzeno); ELL com H ₃ PO ₄ , DMSO/isoctano; purificação em coluna de Florisil (elução com benzeno); separação em cromatografia em papel e em camada delgada; quantificação: medida da absorbância por espectrofotometria-UV. Reagentes e solventes utilizados (quantidades aproximadas): Na ₂ SO ₄ (785g), KOH (50g), Etanol (1350 mL), isoctano (1050 mL), benzeno (535mL), H ₃ PO ₄ (300mL), DMSO (150 mL).	P/ 2 ppb: Salsichas: 87 a 100%; Queijo: 73 a 76%; Peixe: 90 a 100%	Não citado.

Cont.

ANO	REF.	AMOSTRA	BaP, ppb	MÉTODO	RECUPERAÇÃO	LD/LQ
1968	20	Carne, peixe, frango, vegetais, bebidas, laticínios, óleos e gorduras (200 g).	Traços de BaP	Laticínios, carnes, peixes, frango, vegetais e bebidas: saponificação com KOH; todas as amostras: partição com isoctano, etanol-acetona-água e isoctano; purificação em coluna com Florisil (eluição com benzeno); partição com DMSO e isoctano; purificação em CCD; quantificação por espectrofotometriaUV. Confirmação por espectrofluorimetria.	P/2 ppb: Carne, peixe e frango: 78%; Vegetais: 76%; Bebidas: 80%; Laticínios: 94% Óleos e gorduras: 84%	LQ: 0,5 ppb
1968	36	Carne, frango e peixe.	Salsichas alemãs: ND a 0,5 Lingüiça: 0,5 Pastrami: ND Presunto defum.: 0,5 a 0,8 Bacon: ND Churrasco de porco: 5,0 Churrasco boi: 3,6 Frango def.: < 0,5 a 0,7 Peru defum.: < 0,5 Peixes def: ND a 7,0.	Saponificação com KOH etanólico; ELL com isoctano; purificação em coluna clássica de Florisil (eluição com benzeno); ELL com H ₃ PO ₄ , DMSO/isoctano; purificação em coluna de Florisil (eluição com benzeno); separação em cromatografia em papel e em camada delgada; quantificação: medida da absorbância por espectrofotometria-UV. Reagentes e solventes utilizados (quantidades aproximadas): Na ₂ SO ₄ (785g), KOH (50g), Etanol (1350 mL), isoctano (1050 mL), benzeno (535mL), H ₃ PO ₄ (300mL), DMSO (150 mL).	Amostras de alimentos (fortificadas com 0,2 µg de BaP): 50 a 100%.	LD: 0,5 ppb
1975	37	Grupo I: carne, frango, peixe e leveduras. Grupo II: óleos e gorduras (200 g).	—	Grupo I: saponificação com KOH metanólico. Grupo I e II: partição com ciclohexano, dimetilformamida-água e ciclohexano; purificação em colunas de sílica e Sephadex LH 20 (eluição com isopropanol); quantificação por CG - FID, coluna OV-101. Confirmação por GC/MS. Reagentes e solventes utilizados (quantidades aproximadas para análise do grupo I): KOH (34g); metanol (790 mL); ciclohexano (1820 mL); DMF (108 mL); isopropanol (240 mL). Reagentes e solventes utilizados (quantidades aproximadas para análise do grupo II): ciclohexano (2000 mL); DMF (900 mL); isopropanol (240 mL).	Carnes (2,6 ppb): 100% Óleos (1,96 ppb): 96%	Não citado.

Cont.

ANO	REF.	AMOSTRA	BaP, ppb	MÉTODO	RECUPERAÇÃO	LD/LQ
1976	39	Óleos vegetais, margarina, manteiga, peixes e ostras defumados, rum e aroma de fumaça.	Óleos vegetais: NQ a 9; Margarina: NQ; Manteiga: NQ; Carne de boi: NQ a 15; Peixe defumado: NQ; Ostra defumada: 9; Carne defumada: NQ; Aroma de fumaça: 1; Extrato de levedura: 4; Rum escuro: 1; Cera de parafina: 2 ppb.	Extração baseada em Grimmer e Böhnke (1975); separação por CG-DIC; quantificação por corte e pesagem dos cromatogramas.	—	LQ: 0,5 ppb
1979	66	Whiskies (100 mL)	BaP < LD	Extração com ciclohexano por 20 h em agitador mecânico; purificação por CLAE (coluna de sílica, de 25 cm, LiChrospher Si 100; fase móvel: pentano); análise da fração selecionada por CLAE por CG-FID em coluna OV-101 5% (4m); confirmação de BaP por HPLC-DF.	P/ 10 ppb: 60 ± 5%	LD: 1 ppb
1979	61	Provolone e bacon defumados; hambúrguer e salsicha cozidos; pão torrado; pó de café; infusões de chá e café; folhas de chá; azeite de oliva e manteiga.	Provolone defumado: 1,28; Bacon defumado: 0,25; Hambúrguer cozido: 0,05; Salsicha cozida: 0,05; Pão torrado: 0,56; Pó de café: 0,80; Cafê (infusão): 0,01; Folhas de chá: 9,51; Chá (infusão): 0,02; Azeite de oliva: 359; Manteiga: 0,47 a 0,91	Baseada em Grimmer e Böhnke (1975); confirmação por CG-MS.	Nível não relatado: P/ todas amostras: 93 a 95%.	Não citado.

Cont.

ANO	REF.	AMOSTRA	BaP, ppb	MÉTODO	RECUPERAÇÃO	LD/LQ
1981	48	Bacon, arenque defumado, queijo (100 g) Água (2,5 L) e fumaça.	Bacon: 0,05 Arenque: 0,10 Queijo: 0,20 Água filtrada: 0,2 a 0,3 ppt Água não filtrada: 17 a 20 ppt	Alimentos: ELL com ACN; saponificação com KOH alcoólico; limpeza em cartucho de EFS (sílica gel); separação em CCD (FM: etanol-tolueno-água); determinação por CLAE-DFI. Água: ELL com isooctano e determinação por CLAE-DFI.	Água (10 ppt): 96% "Bierwurst" (2,0 ppb): 100%	LD (alimentos): 0,02 ppb LD (água): 0,3 ppt
1982	57	Cevada malteada (25 g)	< 0,1 a 0,2	Extração com ciclohexano (CHX) em aparelho de ultrassom; purificação em coluna de sílica gel/alumina desativadas; partição entre dimetilsulfóxido (DMSO) e CHX; quantificação por CLAE-UV; confirmação por CLAE-DFI. Solventes utilizados (volumes aproximados): ciclohexano (280 mL); DMSO (45 mL).	P/ 2,5ppb: 83 ± 6,0%	LD: 0,1 ppb
1982	43	Óleos vegetais ou gordura fundida: uva, girassol, coco, soja, amendoim, canola. (100 g)	Uva: 0,60 Canola: 2,14 Girassol: 1,51 Coco: 2,58 Soja: 28:45 Amendoim: 10,69 a 105,74	ELL das amostras dissolvidas em 400 mL de CHX com 2 vezes de 100 mL de solução de cafeína-ácido fórmico (ácido fórmico 90% contendo 15% de cafeína); extração com 2 vezes 250 mL CHX; purificação em coluna clássica de sílica (elução com 110 mL de CHX); evaporação e reconstituição em tolueno; separação por cromatografia em camada delgada de alta eficiência; determinação por CG-DIC.	HPAs: 68 a 95	LD: 16 ng de coroneno em 100g de óleo.

Cont

ANO	REF.	AMOSTRA	BaP, ppb	MÉTODO	RECUPERAÇÃO	LD/LQ
1983	18	Alimentos que compõem a dieta do Reino Unido (50 g). Aromas de fumaça, carne defumada, bacon, peixe, óleos vegetais, café torrado, café solúvel, cereais torrados, ervas, especiarias, chá (5 g).	Cereais: 0,12 a 0,79; Carnes: 0,02 a 0,08; Peixes: 0,03 a 0,40; Óleos e gorduras: 0,19 a 3,74; Frutas e açúcares: 0,03 a 0,10; Vegetais: 0,02 a 0,17; Bebidas: ND a 0,02; Leite: 0,005 a 0,02	Saponificação com KOH metanólico; ELL com isooctano; purificação por EFS em Sep-pack de sílica; quantificação por CLAE-DFI.	Níveis de 0,03 a 10 ppb: 50%	LD: 0,1 ppb.
1987	44	Alimentos defumados: ND a 16,4 (enguia defumada) Ervas: < 0,3 a 7,5 (cardamomo) Especiarias: < 1 a 220 (páprica) Óleos vegetais: 0,2 a 170 (óleo de amendoim) Chás: 0,2 a 16,1 (folhas de chá) Chás defumados: 180		Saponificação com KOH metanólico; ELL com CHX; purificação em coluna de sílica (eluição com CHX; quantificação por CLAE-DFI; proposta de utilização da cromatografia em camada delgada (CCD) para análises de rotina, por medida fluorodensitométrica.	Níveis de 2,5 a 75 ppb: 82 a 103 %.	LD (HPLC): 0,04 a 0,2 ppb LD (CCD): 0,1 ppb
1987	45	Cafés torrado e verde (20g).	Café torrado: 0,1 a 0,5 Café verde: 0,0008 a 0,001	Extração com acetona; saponificação com KOH metanólico; ELL com CHX; purificação em coluna de sílica (eluição com CHX); quantificação por CLAE-DFI.	Café torrado (1 ppb): 88 ± 6% Café verde (13,2 ppt): 113%	LD: 0,1 ppb.

Cont.

ANO	REF.	AMOSTRA	BaP, ppb	MÉTODO	RECUPERAÇÃO	LD/LQ
1988	40	Aveia, trigo, arroz, farelos, mistura de aveia defumada, cevada e feijão.	Aveia: 0,5 a 1,3; Trigo: 0,2 a 0,4; Arroz: ND; Farelos: 5,4; Mistura de aveia defumada, Cevada e feijão: 0,6 a 160.	Baseada em Grimmer e Böhnke (1975) (com modificação através da adição de cafeína; confirmação por GC/MS).	P/ 0,1 ppb: 40 a 100% (HPAs totais).	LD: 20 pg/injeção (1 µL).
1990	15	221 tipos de alimentos diferentes (20 g).	ND (< 0,1) a 1,4. A maior contribuição para a ingestão diária de HPAs foi de açúcares, doces, cereais, óleos e gorduras e nozes. A ingestão média diária de HPAs estava entre 5 a 17 µg/dia, sendo que os HPAs carcinogênicos representavam metade deste total.	Saponificação com KOH etanólico; ELL com CHX; purificação em coluna clássica de sílica (eluição com CHX); quantificação por CLAE-DFI.	Alimentos com baixo teor de gordura (2ppb): 86 ± 13% Alimentos com alto teor de gordura (2ppb): 98 ± 6%.	LD: 0,1 ppb.
1992	51	Queijos defumados, cheddar e suíços (0,6 cm da camada externa)	ND	Extração baseada em Howard et al (1966); purificação em Sep-pack com CHX; quantificação por CLAE-DFI.	—	LD: 0,1 ppb.

Cont

ANO	REF.	AMOSTRA	BaP, ppb	MÉTODO	RECUPERAÇÃO	LD/LQ
1992	12	Mexilhões, ostras, mariscos, salmão, caranguejo (10g).	—	Saponificação com KOH metanólico; ELL com 1,12-triclorotrifluoroetano (TCTFE); purificação em cartucho de EFS com alumina, sílica, C18 (DCM e ACN); quantificação por CLAE-DFI. Solventes utilizados (volumes aproximados): KOH metanólico (100 mL), etanol (50mL); TCTFE (120 mL), DCM (35 mL), ACN (30mL).	Nível de 1,93 ppb: Mexilhões: 90,8 ± 2,3% Marisco: 90,8 ± 2,3% Ostras: 92,5 ± 2,3% Caranguejo: 91,4 ± 3% Salmão: 80,5 ± 3,2%	LQ: 0,17 ppb
1993	49	Ostras (20 g)	—	Saponificação com KOH metanólico; acidificação do extrato com ácido acético glacial; ELL com hexano; purificação em coluna clássica com ácido silícico e óxido de alumínio; ELL com hexano e DCM; cromatografia por permeação em gel (Sephadex LH20; Bio-Beads S-X8); quantificação por CLAE-UV e DFI; confirmação por CG-MS (scan).	Material de referência NIST 1674 ^a (16 HPAS em ACN): P/ 50 µL do mat. de ref.: 99% ± 6 (DP) P/ 100 µL do mat. de ref.: 78% ± 6 (DP)	Não citado.
1993	50	Peru, porco, frango, boi, peixes defumados e aroma de fumaça líquido.	Peru defumado: ND a 0,4; Frango defumado: ND a 0,8; Porco defumado: ND a 2,5; Boi defumado: 0,2 a 1,1; Trutas defumadas: ND; Ostras: 3,0; Salmão: 3,9; Aromas de fumaça: 0,1 a 3,4	Alimentos defumados: metodologia baseada em Joe et al. (1984). Aromas de fumaça: saponificação com KOH metanólico; ELL com CHX, metanol/água; purificação em coluna clássica de Florisil (eluição DCM e CHX); quantificação por CLAE-DFI e UV.	Carnes defumadas (3 a 5 ppb): Detec. UV: 98 ± 10%; Detec. FI: 80 ± 10,2% Aroma de fumaça: (3 a 5 ppb): Detec. UV: 76 ± 11,8%; Detec. FI: 66 ± 13,8%	Não citado.

Cont.

ANO	REF.	AMOSTRA	BaP, ppb	MÉTODO	RECUPERAÇÃO	LD/LQ
1995	58	Carne de porco defumada	ND	Extração com cloroformio e ultra-som; purificação em coluna de permeação em gel (Bio-Beads S-X3, eluição com cloroformio); quantificação por CLAE-DFI.	Níveis de 2 a 4 ppb: 88 ± 18%	LD: 0,03 ppb LQ: 0,1 ppb
1995	23	Vegetais, batatas, frutas, cereais, peixes, leite e derivados, carnes e ovos, churrasco de carne, óleos e gorduras, chocolates, bebidas (vinho, cerveja e café) (50g).	BaP: 0,001 (batatas) a 1,445 ppb (carne de boi). Os níveis mais altos de HPAs totais foram encontrados na pizza assada em forno à lenha, churrasco de boi e porco. Os níveis mais baixos de HPAs totais foram encontrados em batatas, peixe cozido, bebidas e ovos.	Saponificação com KOH metanólico; ELL com isooctano, metanol/água, DMF/água e isooctano; purificação em coluna clássica com Na ₂ SO ₄ anidro; quantificação por CLAE-DFI.	BaP: Média de 93%	Não citado.
1995	41	Cana-de-açúcar queimada e não queimada, aguardente, açúcar refinado, cristal, mascavo e demerara, e melado.	Cana crua: ND; Cana queimada: 0,10; Caldo de cana: ND; Açúcar mascavo: 0,15; Açúcar demerara: 0,56; Açúcar cristal: 0,29; Açúcar refinado: ND; Melado: 0,41; Aguardente: 0,27 a 0,40	Metodologia baseada em Grimmer e Böhnke (1975).	—	LD: 0,10 ppb.

Cont.

ANO	REF.	AMOSTRA	BaP, ppb	MÉTODO	RECUPERAÇÃO	LD/LQ
1996	62	Carnes de boi grelhadas em carvão.	—	Saponificação em NaOH; EFS em coluna com terra diatomácea (Extrelut 20) acoplada a uma coluna com ácido sulfônico, PRS (eluição com DCM); esta fração que contém os HPAs foi evaporada à secura e redissolvida em hexano; este extrato foi aplicado em uma coluna de EFS de sílica (eluição com hexano/DCM); evaporação à secura e ressuspensão em metanol; quantificação por CLAE-UV . A extração dos outros compostos foi realizada posteriormente, em outra coluna PRS e C18 (eluição das aminas heterocíclicas, AEAs, com acetato de amônio e dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos nitrogenados, HPANs, com metanol/amônia; quantificação por CLAE-UV e detector eletroquímico; confirmação por GC/MS para HPAs e HPANs e por cromatografia a líquido com DAD para AEAs.	BaP (6 ppb): Média de 47 ± 6%.	LD: 0,6 ppb.
1996	63	Azeites de oliva (10 g).	ND a 164 Média para 17 marcas diferentes: 10,9	ELL com CHX, DMF/água e CHX; purificação em coluna clássica de sílica gel (eluição com CHX); quantificação por CLAE-DFI.; confirmação e quantificação por CLAE-DAD.	P/ 0,53 ppb (n=1): 77,4% P/ 1,05 ppb (n=1): 93,3% P/ 2,1 ppb (n=4): 97,8 a 115,7% P/ 5,25 ppb (n=8): 76,1 a 90,5%	LD: 0,5 ppb

Cont.

ANO	REF.	AMOSTRA	BaP, ppb	MÉTODO	RECUPERAÇÃO	LD/LQ
1996	47	Whiskies (200 mL).	0,0013 a 0,0193 ppb	ELL com CHX; quantificação por CLAE-DFI.	—	Não citado.
1996	53	Peito, coração, fígado, pulmão de frango cozidos, frango e pato grelhados, estômago de porco e porco cozidos, lingüiça defumada, porco defumado.	Porco cozido, estômago de porco e lingüiça: ND; Porco defumado: 0,1; Peito, pulmão, fígado e coração de e frango cozido: ND; Frango grelhado: 4,6 ; Pato grelhado: ND.	Extração por Soxhlet com metanol e KOH; purificação em cartucho de EFS, Sep-pack com Florisil; quantificação por CLAE-UV e DFL. Solventes utilizados (volumes aproximados): metanol (200 mL), hexano (290 mL), DCM (12 mL).	Carne de pato: 86,5 ± 2,45%	LD (Detec. UV): 0,16 ng LD (Detec. Fluor.): 0,5 pg
1997	59	Água de torneira e água de rio.	Os melhores resultados foram obtidos com os discos de C18. A separação dos HPAs ocorreu em 13 min.	Extração com fluido super crítico (CO ₂) em aparelho equipado com arranjo de diodos, acoplado em linha com discos de EFS. Foram testados discos de C18 e de poliestireno-divinilbenzeno.	BaP (6 ppb): Média de 47 ± 6%.	LD (água do rio): 0,6 ppb LD (água de torneira): 1,5 ppb.
1998	60	Repolho, cenoura, alface, endívia e alho poró.	Ingestão média (ng de BaP/dia): - repolho: 0,24; - cenoura: 0,08; - alho poró: 0,06; - alface: 0,26; - endívia: 0,58 Conc. média de BaP (ppb): repolho: 0,14; cenoura: 0,11; alho poró: 0,15; alface: 0,28.	Extração por Soxhlet com diclorometano; purificação em coluna clássica de Florisil; quantificação por CLAE-DFI.	Níveis não relatados. HPAs totais: 71a 92% (5 a 15%)	Não citado.

Cont.

ANO	REF.	AMOSTRA	BaP, ppb	MÉTODO	RECUPERAÇÃO	LD/LQ
1999	19	Porco, salsicha e salmão defumados.	Porco: ND; Salsicha: ND; Salmão: ND.	<p>Comparação: Extração por Soxhlet e Acelerada com Solvente (EAS).</p> <p>EAS: adição de Na₂SO₄ anidro e Cl₁₈ às amostras; extração acelerada com 20 mL de solvente (DCM/ACN) em célula de extração, com pressão variando de 1000 a 1500 psi; purificação através da adição de H₂SO₄ (para remoção da camada dos lipídios - descartar); evaporação e eluição em coluna de EFS de Florisil com 10 mL de DCM; quantificação por GC/MS - SIM.</p>	<p>Peixe:</p> <p>- Soxhlet (0,3 ppm): 74 ± 14%</p> <p>- EAS (0,3 a 1,0 ppm): 70 ± 18% a 57 ± 6%</p> <p>Porco:</p> <p>- EAS (1 ppm): 77 ± 8%</p>	LD: 0,10 ppm
2000	7	Margarina, creme vegetal, halvarina, gordura vegetal hidrogenada, maionese (100 a 200 g).	Margarina: 0,11 a 1,23; Creme vegetal: 0,32 a 1,39; Halvarina: 0,14 a 0,63; Gordura vegetal h.: 0,01 a 0,32; Maionese: 0,12 a 6,99.	<p>Baseada em Grimmer e Böhnke (1975); quantificação por CLAE-DAD.</p> <p>DFI. e confirmação por CLAE-DAD.</p>	<p>3 Níveis</p> <p>(0,54; 1,50; 3,72):</p> <p>Média de 97,8 ± 5,43%</p>	LQ: 0,01 ppb
2001	17	Alimentos não gordurosos: purê de batata, batata e pão torrado (0,5g).	Purê de batata: NQ Batata: ND Pão torrado: ND	<p>Extração em banho de ultrassom por 8 min. com 3 mL de éter etílico/DCM (1:1) e 1 mL de água (exceto para purê de batata, pois já apresenta umidade); centrifugação a 3000 rpm por 15 min.; uma alíquota de 0,5 mL foi evaporada à secura e redissolvida em 0,5 mL de ACN; quantificação por CLAE-DFI.</p>	<p>4 Níveis</p> <p>(6,0 a 90 ppb):</p> <p>Purê: 73 a 82%</p> <p>Batata: 71 a 89%</p> <p>Pão torrado: 68 a 89%</p>	LQ: 0,07 ppb

Cont.

ANO	REF.	AMOSTRA	BaP, ppb	MÉTODO	RECUPERAÇÃO	LD/LQ
2001	25	Alimentos mais consumidos nas diferentes regiões do Brasil.	Vegetais: 0,08; Frutas: ND; Produtos lácteos: ND; Óleos e gorduras: 4,03; Cereais: 0,22; Legumes: 0,07; Tubérculos: 0,20; Bebidas: 0,22; açúcares: 0,19; Carnes: 0,27; outros: 0,23. Carnes: ND (carne cozida) a 4,86 (churrasco); Frango: 0,01 a 4,57 (churrasco); Peixes: 0,01 a 0,24(filé cozido); Defumados e embutidos de porco: ND a 0,2 (bacon frito); Frutas e vegetais: 0,01 a 0,48; Produtos lácteos: ND a 0,18 (iogurte congelado); Pães, <i>snacks</i> , cereais e grãos: 0,02 a 0,56 (pipoca); Doce e sobremesas: 0,01 a 0,47 (torta de abóbora).	Baseada em Grimmer e Böhmke (1975); quantificação por CLAE-DFI e confirmação por GC/MS, SIM.	3 Níveis (2,0; 4,0 e 8,0); Resultados não relatados.	LD: 0,07 ppb
2001	22	200 tipos diferentes de alimentos.		Saponificação em KOH alcoólico; ELL com isoocetano; purificação em coluna clássica com Florisil (eluição com CHX e benzeno); separação do BaP por CCD, em acetato de celulose (fase móvel: etanol/DCM); quantificação por espectrofluorimetria.	—	LD: 0,005 ppb
2002	54	Amostras de carne (25 g).	—	HPAs: saponificação em NaOH; 1ª EFS: cartucho com terra diatomácea (Extrelut-20) - eluição com 50 mL de DCM; 2ª EFS: cartucho com ácido propilsulfônico - eluição com 6 mL de ácido clorídrico 0,1 mL e 2 mL de água; 3ª EFS: cartucho com C18 - eluição com 20 mL hexano e 60 mL de hexano/DCM (60:40); quantificação por CLAE-UV; confirmação por GC/MS, SIM.	3 Níveis (4,9; 7,4; 7,6 ppb); 77 ± 2,9%	LD: 2,5 ng

Cont.

ANO	REF.	AMOSTRA	BaP, ppb	MÉTODO	RECUPERAÇÃO	LD/LQ
2002	1	Chá-mate e café em pó.	Pó de café: 1,23 Café fervido (pó fervido): 0,60 Café coado: 0,26 Chá-mate: 0,07	Baseada em Grimmer e Böhnke (1975); quantificação por CLAE-DAD.	3 Níveis (1,0; 2,0 e 4,0); Média: 96 ± 2,7%	LD (café): 0,07 ppb LD (chá): 0,07 ppb
2002	21	Alimentos mais consumidos no Brasil.	Produtos lácteos: ND; Produtos cárneos: 0,10 a 0,44; Tubérculos: ND a 0,39; Cereais/farinhas/massas: 0,08 a 0,115; Panificados: 0,29 a 0,35; Pizza: 0,23; Açúcares: 0,19; Leguminosas: ND a 0,10. Carnes e derivados: 0,098; Peixes e crustáceos: 0,235; Vegetais: 0,013; Tubérculos: 0,063; Produtos lácteos: 0,078; Leite: 0,011; frutas: 0,014; Ovos: 0,023; cereais: 0,262; Lentilhas e feijões: 0,058; Óleos e gorduras: 0,272.	Baseada em Grimmer e Böhnke (1975); quantificação por CLAE-DFI; confirmação por GC/MS, SIM.	Recuperação média: 3 Níveis (2,0; 4,0 e 8,0 ppb); 82,3 ± 6,4% a 93,3 ± 2,5.	LD: 0,07 ppb
2003	16	Alimentos mais consumidos na região da Catalunha, Espanha (2 a 4 g).	Óleo de coco bruto: 26; Óleo de coco refinado: 1,7; Óleo de girassol bruto: 3,6; Óleo de palma: 1,1; Estearina de palma: 0,7; Óleo da amêndoa de palma: < 0,3; Óleo de oliva: 0,5.	Saponificação em KOH alcoólico; ELL com CHX, DMF/ÁGUA, CHX. Apenas para frutas e vegetais: ELL com CHX-acetato de etila e purificação por cromatografia por permeação em gel; purificação em coluna clássica de sílica (para a maioria das amostras); quantificação por CLAE-DFI.	HPAs: 54,5 a 113% (16%)	LD: 0,2 ppb
2003	55	Óleos brutos e refinados (0,5 g).		Dissolução das amostras em 5 mL de hexano; ELL com 2 vezes 5 mL de DMF/água; diluição dos extratos combinados com água até atingir a proporção 1:1. EFS: foram testados cartuchos de C8, C12, Ciclohexil, fenil, aminopropil e C18. Melhor resultado com C18 (eluição com hexano).	P/ 1,25 ppb: 94 ± 3% P/ 12,5 ppb: 94 ± 2%	LQ: 0,3 ppb

Cont.

ANO	REF.	AMOSTRA	BaP, ppb	MÉTODO	RECUPERAÇÃO	LD/LQ
2004	56	Águas de consumo: 500 mL para EFS e 40 mL para MEFS.	EFS apresentou os menores limites de detecção e maiores recuperações que MEFS.	Preparo das amostras: adição de tiosulfato de sódio na concentração de 100 mg/L (para retirar cloro livre e prevenir oxidação); adição de ACN p/ evitar adsorção dos HPAS nas paredes dos frascos. Comparação entre 2 métodos de extração, EFS e MEFS. EFS: cartucho C18, 500 mg, eluição com 25 mL ACN/água e 5 mL de hexano. MEFS: fibras de PDMS; agitação dos 40 mL de água com ACN, agitação por 40 min. a 60°C.	EFS (4,0 ppt): 96 ± 2% MEFS (35 ppt): 7 ± 5%	EFS: LD: 0,1 ppt LQ: 0,3 ppt MEFS: LD: 6 ppt LQ: 20 ppt
2004	52	Margarina, maionese, azeite de oliva e óleos vegetais (0,5 g).	Margarina: < 0,3 Maionese: < 0,3 Azeite de oliva: 2,6 Óleos vegetais: < 0,3	Dissolução das amostras com 5 mL de hexano; ELL com 2 vezes 5 mL de DMF/água (9:1). Extratos combinados diluídos até a proporção 1:1; EFS com cartucho C18: lavagem com 10 mL de DMF/água (9:1) e 10 mL de água. Eluição dos HPAs com 4 mL de hexano; evaporação dos extratos à secura e ressuspensão em 0,2 mL de ACN; quantificação por CLAE-DFI.	Recuperação utilizando material de referência certificado - CRM 459): 3 Níveis (1,25; 12,5 e 125 ppb): 82,3 ± 6,4% a 93,3 ± 2,5	LD: 0,09 ppb LQ: 0,3 ppb.
2005	3	Amostras de aguardente (12 mL).	ND (cana não queimada) a 1,55 ppb (cana queimada).	EFS em cartucho de C18 (eluição com 2 mL de isopropanol e 2 mL de acetato de etila); quantificação por CLAE-DFI.	Nível não citado: 99,4 ± 4,20%	LQ: 0,01 ppb

Cont.

ANO	REF.	AMOSTRA	BaP, ppb	MÉTODO	RECUPERAÇÃO	LD/LQ
2005	5	Bebidas alcoólicas: vinho verde, vinho tinto, rum branco, vinho do Porto, jerez, aguardente de uva, brandy de jerez, whisky e ponche.	Vinho verde: ND Vinho tinto: 0,3 a 3,1 Vinho do Porto: 0,3 a 1,2 Jerez: 0,4 a 1,2 Rum branco: NQ a 0,7 Aguardente de uva: 0,3 a 10,3 Brandy de jerez: 2,6 a 6,3 Whisky: 0,9 Ponche: NQ a 0,5	Correção da graduação alcoólica das bebidas para 30-40% com adição de álcool ou água. EFS em coluna de C18 (eluição com 20 mL de ACN/água (20:80)). EFS em coluna de sílica (eluição com 10 e 6 mL de hexano). Evaporação à secura e ressuspensão em 0,5 mL de ACN; quantificação por CLAE-DFI.	Rum branco (5 ppb): 94 ± 9% Vinho tinto: (5 ppb): 100 ± 9%	LD: 0,0001 ppb LQ: 0,0003 ppb.
2005	27	Amostras de chá Mate em folhas (infusão de 1,0 g de folhas secas em 100 mL de água fervente por 5 min.).	ND (< 0,0012 ppb) a 0,0226 ppb	<u>Método I:</u> Condicionamento das barras de adsorção: agitação em frasco contendo 1 mL de DCM/metOH (1:1) por 5 min. (3 vezes), sob fluxo de nitrogênio (30 mL/min.). Extração de 10 mL de chá Mate à temperatura ambiente (velocidade 70 rpm por 2 h). Dessorção dos analitos: retirada das barras, secagem e transferência para frasco contendo 160 µL de ACN/água (4:1), por 15 min.; quantificação por CLAE-DFI. <u>Método II:</u> Extração de 11 mL de chá com 3 x 3 mL de hexano; agitação a 750 rpm por 10 min. junção dos extratos, filtração em Na ₂ SO ₄ . Evaporação à secura e redissolução em 1 mL de ACN; quantificação por CLAE-DFI.	P/ 0,1 ppb: 45,0±6,0%; P/ 1 ppb: 44,8 ± 3,8%	LD: 0,0012ppb LQ: 0,004 ppb

Cont.

ANO	REF.	AMOSTRA	BaP, ppb	MÉTODO	RECUPERAÇÃO	LD/LQ
2005	10	8 tipos diferentes de folhas de chá.	<p>P/BaP:</p> <p>Folhas de chá verde: ND;</p> <p>Folhas de jasmim: 28,1;</p> <p>Folhas de chá preto: 39,7;</p> <p>Folhas de chá mate: 542,26</p> <p>P/ HPAs totais:</p> <p>Folhas de chá preto apresentaram a maior contaminação: 8.800 ± 360 ppb.</p>	<p>Folhas de chá (6g): extração, em triplicata, em aparelho de ultrassom por 30 min., c/ 20 mL de DCM; evap. à sec. e redissolução em 2 mL de hexano; purific. em coluna de sílica, eluição com 10 mL de hexano/DCM (1:1); evaporação à secura; ressusp. em 2 mL de ACN; quant. p/ CLAE-UV.</p> <p>Infusão de chá:</p> <p>20 g de folhas submersas em 500 mL de água ultra pura fervente (temperatura mantida em 90-92°C por 10, 30, 60 e 120 min.); fase aquosa recolhida em outro frasco e resfriada até 30 °C; extração, em triplicata, de 400 mL de chá frio em aparelho de ultrassom, a 30°C por 30 min., com 50 mL de DCM.; filtr. do extrato em coluna de sulfato de sódio anidro, lavagem com 10 mL de hexano/DCM (1:1); evap. à secura; redis. em 2 mL de hexano; purif. de 1,0 mL desta solução em coluna de sílica com 10 mL de hexano/DCM (1:1) e evap. à secura; ressusp. em 2 mL ACN; quantif. / CLAE-UV.</p>	<p>P/ HPAs com 4 a 6 anéis:</p> <p>80 a 85% (CV < 20,0%).</p>	<p>Folhas de chá:</p> <p>LQ: 3,28 ppb</p> <p>Infusão:</p> <p>LQ: 2,73 ppt</p>
2006	46	24 amostras de café verde e torrado	<p>Café verde: ND</p> <p>Café torrado: 0,47 a 12,52</p>	<p>Extração por Soxhlet por 6h com 250 mL de acetona; saponificação do extrato (evaporado) com KOH e metanol-água (9:1); ELL com 100 mL de CHX; purificação em coluna de sílica (eluição com 100 mL de CHX); quantificação por CLAE-DFI.</p>	<p>Faixa de 1,00 a 3,00 ppb:</p> <p>76 a 116%</p>	<p>LD: 0,03 ppb</p> <p>LQ: 0,10 ppb</p>

ANO	REF.	AMOSTRA	BaP, ppb	MÉTODO	RECUPERAÇÃO	LD/LQ
2006	42	Amostras de peixes secos e congelados; mexilhões congelados e enlatados; peixes defumados; camarões congelados enlatados; carne de siri congelada e enlatada; sardinha enlatada; atum enlatado (25g).	Filé de peixe: ND a 0,27 Sardinha em lata: 0,12 a 0,53 Atum: 0,09 a 0,33 Peixe defumado: 1,97 a 3,45 Camarão: 0,05 a 0,34 Mexilhão: 0,45 a 4,54 Carne de siri: 0,02 a 0,32	Saponificação em KOH etanólico; ELL com 400 mL de hexano; purificação por EFS em cartucho de sílica (eluição com 25 mL de hexano); evaporação à secua e redissolução em 1,0 mL de ACN; quantificação por CLAE-DFI; confirmação por CLAE-DFI nas mesmas condições, com variação dos comprimentos de onda.	P/ 2,3 ppb: 88 ± 6,7% P/ 4,5 ppb: 96 ± 2,9%	LD: 0,005 ppb LQ: 0,017ppb
2006	64	13 marcas diferentes de guaraná em pó (20 g).	ND a 3,69	Saponificação em KOH metanólico; ELL com 200 mL de hexano; purificação em coluna clássica com sílica (eluição com 85 mL de hexano); quantificação por CLAE-DFI.	P/ 1,2 ppb: 78,6% P/ 3,0 ppb: 78,0% P/ 9,5 ppb: 89,2%	LD: 0,08 ppb
2006	65	1350 amostras, entre: azeite de oliva (170); óleos comestíveis (170); cápsulas de suplementos alimentares (950); óleos usados nas cápsulas (veículo, 60)	Óleos : ≈80%: < 1,2 ppb; 1 amostra > 50 ppb; 1 amostra > 85 ppb Suplementos: ≈ 40%: < 1,2 ppb ≈ 30: > 40ppb (máx. 200ppb)	Extração com isopropanol em agitador por 30 min. Filtração. Purificação em coluna Chromsper-pi 7 µm, 80 mm <i>on line</i> (sistema doador-receptor de elétrons); separação em coluna C18, 25 cm, 5µm), em série; quantif. CLAE-DFI	Óleos: (1ppb): 99,9 % (±2,8) Suplementos (1ppb): 100,1 % (±4,1)	LD: 0,07 ppb LQ: 0,14 ppb
2007	28	25 marcas diferentes de cachaça (20 mL).	ND (< 0,011 ppb) a 0,36 ppb	Baseada em Grimmer e Böhnke (1975); quantificação por CLAE-DFI; confirmação por GC/MS, SIM.	3 Níveis (0,6 a 3,0 ppb); Média de 74,5 ± 11,5%	LD: 0,011 ppb

LD = limite de detecção, LQ = limite de quantificação, ND = não detectado

MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

Extração líquido-líquido (ELL)

A ELL é uma das práticas mais utilizadas até os dias de hoje para isolar os HPAs das matrizes alimentares. Nas décadas de 1960 e 1970, a maioria dos trabalhos publicados relatava o emprego desta técnica; entretanto, de uma maneira geral, a metodologia era bastante complexa e demandava diversas etapas, que se alternavam em extração e purificação^{6,20,34-37}. Em suas pesquisas, Howard e colaboradores^{6,20} adotaram estes procedimentos na análise de determinados alimentos defumados como peixes, carnes, embutidos, queijos e alimentos não defumados, como laticínios, vegetais, bebidas, óleos e gorduras. A maioria das amostras foi submetida à uma saponificação prévia com KOH metanólico sendo, posteriormente, efetuadas as seguintes operações: ELL com isooctano; purificação em coluna clássica de Florisil, tendo como solvente de eluição o benzeno; uma segunda ELL com H₃PO₄ e dimetilsulfóxido/isooctano; novamente purificação em coluna e separação dos analitos em cromatografia em papel e em camada delgada^{6,34,35}. Os autores também fizeram uso de outros solventes na ELL, intercalando duas extrações com isooctano com uma combinação de etanol/água/acetona²⁰. Na mesma linha metodológica, Manoski et al., em 1968, avaliaram a contaminação de diversos tipos de embutidos, além de bacon, churrasco de porco e de boi, carnes de frango e de peru e peixes defumados³⁶.

A metodologia de extração adotada nos trabalhos anteriormente referidos envolve muitas etapas, o que demanda intensa manipulação dos analistas, alto custo pelo excessivo volume de solventes, em torno de 3000mL, e, principalmente, o manuseio de produtos tóxicos, como o benzeno. Atualmente, o uso deste solvente é desaconselhável devido às suas características cancerígenas³⁸.

Em 1975, Grimmer e Böhnke³⁷, propuseram uma metodologia que vem sendo bastante utilizada por diversos pesquisadores. Neste procedimento as matrizes eram divididas em dois grupos. Faziam parte do grupo I os alimentos que necessitavam ser saponificados por conterem proteínas e gorduras em sua composição, por exemplo, produtos de origem animal e vegetais; o grupo II compreendia todos os alimentos nos quais não havia necessidade de saponificação, como os açúcares, os óleos e gorduras. Apesar de envolver menos etapas, este método ainda empregava grandes quantidades de solventes, em torno de 2500mL, utilizados na ELL com ciclohexano, com dimetilformamida/água e novamente com ciclohexano. A etapa de purificação era feita em coluna clássica com ciclohexano³⁷. Esta metodologia vem sofrendo várias alterações desde a sua publicação, sendo que atualmente o volume de solvente empregado é quase 1/6 desse total^{1,7,16,25,28,39-42}.

Kolarovic e Traitler⁴³, em 1982, apresentaram os resultados de uma pesquisa sobre a contaminação de óleos vegetais por HPAs, na qual foi utilizada a ELL, porém de uma maneira simplificada; as amostras eram dissolvidas em 400mL de ciclohexano e submetidas a duas extrações com 100mL de

uma solução de cafeína-ácido fórmico e duas extrações com 250mL de ciclohexano, sendo que, devido a formação de um complexo cafeína-HPA, a extração é favorecida. A purificação era feita em coluna de sílica, tendo como eluente, 100mL de ciclohexano. Twominen et al⁴⁰, em um estudo sobre a presença de HPAs em cereais, também adicionaram cafeína às amostras, todavia a metodologia de extração adotada foi aquela proposta por Grimmer e Bönke³⁷.

A extração de HPAs utilizando partição com ciclohexano e purificação em coluna clássica, com mais alterações visando sua simplificação tem sido bastante empregada para diversas matrizes. Stijve e Hischenbeur⁴⁴ analisaram aromas de fumaça, carnes defumadas, peixes, óleos vegetais, cafés, cereais, especiarias e chá. Kruijff⁴⁵ e Badolato et al⁴⁶ empregaram-na em análises de café verde e torrado após saponificação com KOH metanólico, sendo que neste último trabalho, inicialmente, as amostras foram extraídas com acetona usando o extrator de Soxhlet. Este procedimento também foi utilizado por de Vos para avaliar a contaminação da dieta da população alemã por HPAs¹⁵. Igualmente, Kleijans et al. adotaram este método de extração para análise de whiskies⁴⁷.

Na literatura é relatado, ainda, o uso de outros tipos de solventes para a ELL, como por exemplo, acetato de etila (frutas e vegetais)¹⁶, acetonitrila (bacon, arenque e queijo)⁴⁸; hexano (ostras)⁴⁹, ciclohexano/metanol/água (aroma de fumaça)⁵⁰. É possível notar que há, por parte da comunidade científica, uma preocupação em optar pela utilização de solventes que atendam às características físico-químicas necessárias para análise de HPAs e que atinjam a máxima eficiência de extração com o menor volume possível.

Extração em fase sólida

Nos últimos anos, a extração em fase sólida (EFS) tem-se mostrado uma ferramenta útil na determinação de HPAs em alimentos e em bebidas em virtude da praticidade, reduzido tempo de análise e menor custo devido aos baixos volumes de solvente empregados. Sua maior aplicação, ainda, está relacionada à etapa de purificação dos extratos de analitos obtidos por ELL, ultrassom ou por outros métodos. A fase estacionária comumente usada para a limpeza é a sílica gel^{8,18,42,51,52}, tendo sido relatado também, o emprego de Florisil para purificar extratos de carne e vísceras de porco, frango e pato⁵³.

Diversos autores apontam a EFS como método de extração de HPAs em alimentos^{3,54-56}. Barranco e colaboradores⁵⁵, em um estudo que envolveu amostras de óleos vegetais comestíveis, avaliaram a eficiência de extração de seis tipos de fases estacionárias, C8, C12, C18, ciclohexil, fenil e aminopropil. Os melhores valores de recuperação, em torno de 94%, foram obtidos com o cartucho de C18 e hexano como eluente. Em 2004, García-Falcón et al.⁵⁶ apresentaram os resultados da comparação entre dois métodos de extração para análise de HPAs em águas para consumo: EFS (cartucho de C18, eluição com 25mL de acetonitrila/água e 5mL de hexano) e

microextração em fase sólida, MEFS (fibras de dimetilsiloxano, agitação com 40mL de água, por 40 minutos a 60°C). Os autores concluíram que, dentre as duas técnicas avaliadas, a EFS apresentou as maiores porcentagens de recuperação (96%) e os menores limites de detecção; citaram também, que a MEFS necessita ainda de maior aprimoramento para aumentar a performance de extração.

Em 2005, Bettin e Franco³ utilizando a EFS avaliaram a contaminação por HPAs de 25 amostras de aguardente, obtidas a partir de cana queimada e não queimada; foram testadas diversas combinações de fase estacionária e solventes, chegando-se à conclusão que o melhor desempenho foi alcançado com cartuchos de C18, com eluição de 2mL de isopropanol e 2mL de acetato de etila, com uma porcentagem de recuperação superior a 90%.

Apesar de mais complexa, a análise de carnes por meio de EFS também foi possível. Wazecha et al⁵⁴ conseguiram separar HPAs, azarenos e aminoazarenos utilizando três tipos de cartuchos, com empacotamento e solventes distintos. Na primeira extração, foi utilizada terra diatomácea e 50mL de diclorometano, na segunda, a fase empregada foi ácido propilsulfônico usando para eluição de 6mL de HCl 0,1M e 2mL de água; finalmente, na terceira extração foi escolhida a fase C18, com 20mL de hexano e 60mL de hexano/diclorometano (60:40).

Extração com ultrassom

A aplicação de ultrassom (US) para extração de HPAs foi uma das alternativas empregadas por alguns pesquisadores em substituição à ELL^{10,17,57}. Joe et al.⁵⁷, em 1982, obtiveram resultados satisfatórios para análise de HPAs em cevada malteada; utilizando extração com ciclohexano em aparelho de US e, após purificação em coluna de sílica gel/alumina, foi realizada uma ELL com dimetilsulfóxido e ciclohexano.

Alimentos não gordurosos como purê de batata, batata e pão torrado foram avaliados quanto à presença de HPAs. Para a extração empregou-se banho de US e como solventes éter etílico e diclorometano. Segundo os autores, uma das vantagens deste método é que este dispensa a etapa de purificação¹⁷.

Lin, Tu e Zhu¹⁰ utilizaram a técnica com sucesso para análise de folhas de chá verde, preto e jasmim. Os analitos foram extraídos por 30 minutos em aparelho de US, com 20mL de diclorometano; os extratos foram purificados em coluna clássica de sílica com eluição de 10mL de hexano.

Outros solventes também podem ser utilizados para extração conjunta com US como diclorometano/acetona¹⁰ e clorofórmio⁵⁸.

Outros métodos de extração: Soxhlet, extração acelerada com solvente e com fluido super crítico

São poucos os trabalhos onde são citados os usos de extrator de Soxhlet, extração acelerada com solvente (EAS)¹⁹ e com fluido super crítico⁵⁹ para análise de HPAs em água e alimentos. Chen et al., em 1996, efetuaram a extração destes

compostos por Soxhlet em carnes e vísceras⁵³; Voutsas e Samara utilizaram a mesma técnica para avaliação de vegetais (repolho, cenoura, alface, endívia e alho poró)⁶⁰. Badolato e colaboradores, conforme citado anteriormente, também empregaram este procedimento no preparo das amostras de café verde e torrado⁴⁶.

Em 1999, Wang et al. compararam a extração por Soxhlet com a extração acelerada com solvente (EAS) em amostras de carne de porco, salsicha e salmão defumados. Na EAS foi adicionado às amostras Na₂SO₄ anidro e C18 em célula de extração com diclorometano/acetoneitrila sob pressão; as porcentagens de recuperação obtidas nos dois métodos foram similares, ficando em torno de 70% para 0,3ppm¹⁹. É importante observar, porém, que o nível de concentração em que as metodologias foram testadas é muito elevado em relação aos valores apresentados pelas amostras, de uma maneira geral, na faixa de ppb.

Métodos de quantificação

Os primeiros métodos de quantificação de HPAs, bem como BaP, utilizavam espectrofotometria na região eletromagnética do ultravioleta das frações de HPAs extraídas por partição e separadas por cromatografia em papel e camada delgada. A identificação dos compostos era feita por comparação dos espectros de fluorescência e de ultravioleta dos extratos com os obtidos a partir das soluções padrão^{20,35}. As recuperações obtidas para amostras de peixe, queijo e “frankfurter” defumados foram na faixa de 73 a 100% para concentrações de 2ppb⁶, enquanto que para diferentes amostras de produtos cárneos defumados as recuperações para BaP variaram entre 65 e 75% para concentrações de 1 a 4 ppb³⁶. Em um trabalho sobre dieta total, as recuperações obtidas para BaP em diferentes alimentos fortificados a 2 ppb foram 75 a 88% para carnes, peixe e frango; 75 a 84 % para vegetais; 75 a 100% para bebidas e 75 a 100% para óleos e gorduras²⁰.

A partir de 1970, a quantificação de BaP e outros HPAs começou a ser realizada por cromatografia a gás (CG) com detector de ionização de chama (DIC)^{37,43}. Esta técnica continua sendo amplamente empregada, sendo que atualmente se utiliza, preferencialmente, o detector de massas (MS). Boas separações podem ser obtidas com colunas capilares de sílica fundida, o que permite a análise de misturas bastante complexas de HPAs. As fases estacionárias mais empregadas neste tipo de análise são as de metilpolisiloxanas²⁵.

Grimmer e Böhnke analisaram 11 HPAs em alimentos defumados e óleos e gorduras empregando a técnica CG-DIC e coluna de 10m x 1,5-2mm empacotada com 5 % OV-101. O BaP apresentou tempo de retenção em torno de 40 minutos³⁷. Em 1979, Lintas et al. publicaram um método para análise de BaP em alimentos defumados, cozidos e tostados por CG-MS. Usaram coluna de 2m x 3mm empacotada com 3% OV-101 em Chromosorb W-HP operando isotermicamente a 250°C, energia de ionização 20 eV e monitoramento do íon a m/z 252. As recuperações para BaP foram na faixa de 93 a 95%⁶¹.

A análise de óleos vegetais por CG-DIC e coluna capilar de 30m x 0,3mm com fase estacionária OV-17-SE-30 permitiu a resolução de 15 HPAs em cerca de 25 minutos de corrida. As porcentagens de recuperações para 5 HPAs ficaram na faixa de 66 a 97%, sendo que para o BaP foram de 95 a 97% com coeficiente de variação de 0,42 a 0,73⁴³.

Os primeiros trabalhos empregando a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram publicados no final da década de 70 e, atualmente, tem sido a técnica mais utilizada para a análise de HPAs e BaP em alimentos, sendo que a confirmação da identidade dos HPAs previamente quantificados por CLAE tem sido realizada por CG-MS. O uso da CLAE permitiu o desenvolvimento de métodos mais sensíveis, podendo-se obter limites de detecção e de quantificação inferiores a 1 ppb^{21,25,49,62}.

A análise de BaP empregando a técnica CLAE é realizada em fase reversa com colunas de fase estacionária octadecilsilano (ODS ou C-18) e, geralmente, fase móvel água-acetonitrila. A detecção pode ser realizada por ultravioleta^{10,49,53,57,62,63} ou fluorescência^{28,42,46,52,64}, sendo que esta última é mais amplamente utilizada. A eluição pode ser realizada em modo gradiente ou isocrático, sendo que para a separação e quantificação de misturas de HPAs o modo gradiente é recomendado.

Em um trabalho de avaliação de BaP em amostras de cachaça por CLAE-DFI, os autores obtiveram valores médios de recuperação em torno de 74,5% para concentrações de 0,6 a 3,0ppb e limite de detecção de 0,011ppb²¹. Na quantificação de BaP em amostras de óleos comestíveis, os valores de recuperação foram de 99,9% com coeficiente de variação de 2,8% para concentrações de 1ppb, o método apresentou limite de detecção de 0,07ppb e de quantificação de 0,14ppb⁶⁵.

Em um trabalho de avaliação de BaP em amostras de peixes, camarões e frutos do mar enlatados utilizando a técnica CLAE-DFI, os limites de detecção e quantificação obtidos foram 0,005 e 0,017ppb, respectivamente, e os valores de recuperação de 88% para concentrações de 2,3ppb e 96 % para 4,5ppb, com coeficientes de variação de 6,7 e 2,9, respectivamente⁴². Para a quantificação de BaP em amostras de café por CLAE-DFI, os limites de detecção e quantificação forem de 0,03 e 0,10ppb, respectivamente, e recuperações entre 76 e 116% para a faixa de concentrações de 1,0 a 3,0ppb⁴⁶.

Benzo(a)pireno em alimentos e bebidas

Vários estudos vêm sendo realizados com o objetivo de avaliar quais são os alimentos ou grupo de alimentos que mais contribuem na ingestão diária de BaP e/ou HPAs. Tem sido verificado que as fontes de exposição variam de acordo com o país e o respectivo hábito alimentar. Nos últimos anos, algumas dessas pesquisas indicam que os grupos formados pelos óleos e gorduras, cereais e açúcares são os que apresentam maiores níveis de contaminação^{1,15,18,22}.

De acordo com decisão do Comitê Científico da Alimentação Humana, da Comunidade Européia, os níveis de HPAs nos gêneros

alimentícios devem ser reduzidos a concentrações tão baixas quanto possível. Desta forma, através do Regulamento (CE) n° 208, de 04 de fevereiro de 2005, este Comitê determinou que se utilizasse o benzo(a)pireno como marcador relativo à ocorrência de outros HPAs cancerígenos e determinou limites máximos para este contaminante para alguns tipos de alimentos³¹; tais valores estão apresentados na Tabela 4.

Algumas pesquisas têm sido realizadas a fim de verificar a possível contaminação de bebidas alcoólicas por HPAs, dentre eles, o BaP. De um modo geral, os resultados de BaP obtidos têm sido relativamente baixos^{5,23,39,47,66}. Isto pode ser verificado no trabalho de Swallow, onde o teor encontrado em rum escuro foi de 1ng.mL⁻¹³⁹; em whiskies as concentrações de BaP situaram-se na faixa de 0,0013 a 0,0193ng.mL⁻¹⁴⁷ e na pesquisa de Toissant e Walker não foi detectada a presença deste contaminante (limite de quantificação: 1ng.mL⁻¹)⁶⁶. Em 2005, García-falcon e Simal-Gándara avaliaram a contaminação de vinho verde, vinho tinto, vinho do Porto, jerez, rum branco, aguardente de uva, brandy de jerez, whisky e ponche; os valores de BaP, em ng.mL⁻¹, obtidos resultaram em abaixo do limite de detecção (0,0001) para vinho verde, sendo que as maiores faixas de concentração encontradas variaram de 0,3 a 10,3 para aguardente de uva e de 2,6 a 6,3 para brandy de jerez; as demais bebidas revelaram teores menores que 3,1ng.mL⁻¹⁵.

No Brasil, poucos são os trabalhos desenvolvidos com relação à contaminação de bebidas por BaP, porém, alguns têm verificado a ocorrência deste composto em cachaças. A maioria deles relata como possíveis fontes de contaminação a queima do canavial, que é uma prática bastante adotada durante a fase da colheita da cana^{3,28,41}. Devido às conseqüências negativas que este procedimento acarreta ao meio ambiente, em 19 de setembro de 2002, foi sancionada a Lei n° 11.241, do Estado de São Paulo, a qual dispõe sobre a eliminação gradativa do uso do fogo como método depalhador e facilitador do corte da cana-de-açúcar. Os plantadores de cana são obrigados a reduzir essa prática e eliminar a queima da palha gradativamente até o ano de 2031⁶⁷.

Tabela 4. Níveis máximos de BaP em alguns tipos de alimentos (em µg/kg de peso fresco), de acordo com o Regulamento (CE) n° 208, de 04 de fevereiro de 2005, da Comunidade Européia³¹.

Produto	BaP (µg/kg de peso fresco)
Óleos e gorduras	2,0
Alimentos para lactentes e crianças	1,0
Carnes defumadas e produtos defumados à base de carnes	5,0
Partes comestíveis de peixes defumados	5,0
Partes comestíveis de peixes	2,0
Moluscos bivalves	10,0
Crustáceos e cefalópodes	5,0

CONCLUSÕES

Vários são os trabalhos publicados referentes à análise de HPAs e BaP em diferentes alimentos e, alguns, em bebidas. Nos últimos anos, também têm sido realizados estudos da ocorrência destes compostos em dietas totais.

A metodologia mais utilizada para a extração destes compostos é a saponificação, seguida da extração por partição e limpeza dos extratos utilizando cartuchos de extração em fase sólida. Para a quantificação, utiliza-se amplamente a CLAE com detecção de fluorescência e confirmação por CG-EM.

REFERÊNCIAS

1. Camargo MCR, Toledo MCF. Avaliação da contaminação de diferentes grupos de alimentos por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. *Braz J Food Technol* 2002a; 5:19-26.
2. European Commission. Health and Consumer Protection Directorate-General. Polycyclic aromatic hydrocarbons – Occurrence in foods, dietary exposure and health effects. SCF/CS/CNTM/PAH/29 ADD1 Final. Brussels, 2002.
3. Bettin SM, Franco DW. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em aguardentes. *Cienc Tecnol Aliment* 2005; 25(2):234-8.
4. IARC, International Agency for Research on Cancer. Monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to humans: Polynuclear Aromatic Compounds, 32, IARC, Lyon, 1983.
5. García-Falcón MS, Simal-Gándara J. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in alcoholic drinks and the identification of their potential sources. *Food Addit Contam* 2005; 22(9):791-7.
6. Howard JW, Teague RT Jr, White RH, Fry BE Jr. Extraction and estimation of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked foods. I. General Method. *J Assoc Off Anal Chem* 1966a; 49(3):595-611.
7. Lopes WA, Andrade JB. Fontes, formação, reatividade e quantificação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) na atmosfera. *Quim Nova*, 19(5):497-516, 1996.
8. Conde FJ, Ayala JH, Afonso AM, González V. Optimization of a sampling method to determine polycyclic aromatic hydrocarbons in smoke from incomplete biomass combustion. *Anal Chim Acta* 2004; 524:287-94.
9. IPCS. International Programme on Chemical Safety. World Health Organization. Environmental Health Criteria 2002. Selected non-heterocyclic. Polycyclic aromatic hydrocarbons. Geneva, 1998.
10. Lin D, Tu Y, Zhu L. Concentrations and health risk of polycyclic aromatic hydrocarbons in tea. *Food Chem Toxicol* 2005; 43:41-8.
11. Godoi AF, Ravindra K, Godoi RHM, Andrade SJ, Santiago-Silva M, Vaeck LV, Grieken RV. Fast chromatographic determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in aerosol samples from sugar cane burning. *J Chromatogr A* 2004; 1027:49-53.
12. Perfetti GA, Nyman PJ, Fisher S, Joe FL Jr, Diachenko GW. Determination of polynuclear aromatic hydrocarbons in seafood by liquid chromatography with fluorescence detection. *JAOAC Int* 1992; 75(5):872-7.
13. Pereira Netto AD, Moreira JC, Dias AEXO, Arbilla G, Ferreira, LFV, Oliveira AS, Berek J. Avaliação da contaminação humana por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e seus derivados nitrados (NPHAs): uma revisão metodológica. *Quim Nova* 2000; 23(6):765-73.
14. IARC, International Agency for Research on Cancer. Monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to humans. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, 2006b. [Acesso em 10/01/07]. Disponível em: http://monographs.iarc.fr/ENG/Meetings/92_pahs.pdf.
15. de Vos RH, Dokkum WV, Schouten A, Jong-Berkhout P. Polycyclic aromatic hydrocarbons in Dutch total diets samples (1984 - 1986). *J Food Chem Toxicol* 1990; 28(4):263-8.
16. Falcó G, Domingo JL, Llobet JM, Teixidó A, Casas C, Müller L. Polycyclic aromatic hydrocarbons in foods: human exposure through the diet in Catalonia, Spain. *J Food Prot* 2003; 66(12):2325-31.
17. Nieva-Cano MJ, Rubio-Barroso S, Santos-Delgado MJ. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons with fluorimetric detection following sonication without sample clean-up. Comparison of two spectrofluorimetric methods applied to water samples. *Analyst* 2001; 126:1326-31.
18. Dennis MJ, Massey RC, McWeeny DJ, Knowles ME, Watson D. Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in UK total diets. *J Food Chem Toxicol* 1983; 21(5):569-74.
19. Wang G, Lee AS, Lewis M, Kamath B, Archer RK. Accelerated solvent extraction and gas chromatography/mass spectrometry for determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked food samples. *J Agric Food Chem* 1999; 47:1062-66.
20. Howard JW, Fazio T, White RH, Klimeck BA. Extraction and estimation of polycyclic aromatic hydrocarbons in total diet composites. *J Assoc Off Anal Chem* 1968; 51(1):122-29.
21. Camargo MCR, Toledo MCF. Chá-mate e café como fontes de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) na dieta da população de Campinas. *Ciênc Tecnol Aliment* 2002b; 22(1):49-53.
22. Kaserouni N, Sinha R, Hsu CH, Greenberg A, Rothman. Analysis of 200 food items for benzo(a)pyrene and estimation of this intake in an epidemiologic study. *Food Chem Toxicol* 2001; 39:423-36.
23. Lodovici M, Dolara P, Casalini C, Ciappellano S, Testolin G. Polycyclic aromatic hydrocarbons contamination in Italian diet. *Food Addit Contam* 1995; 12(5):703-13.

24. Vaessen HAMG, Jekel AA, Wilbers AAMM. Dietary intake of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Toxic Environm Chem* 1988;16:281-94.
25. Camargo MSFO, Toledo MCF. Avaliação da ingestão de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) através da dieta, em diferentes regiões do Brasil. *Rev Bras Toxicol* 2001; 14(2):23-30.
26. JECFA. Joint FAO/WHO Expert Committee on food additives. Sixty-fourth Meeting, Rome, 2005. [Acesso em 02/10/05]. Disponível em: www.who.int/ipcs/food/jecfa/en/.
27. Zuin VG, Montero L, Bauer C, Popp P. Stir bar sorptive extraction and high-performance liquid chromatography - fluorescence detection for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in Mate teas. *J Chromatogr A* 2005; 1091:2-10.
28. Tfouni SAV, Machado RMD, Camargo MCR, Vitorino SHP, Vicente E, Toledo MCF. Polycyclic aromatic hydrocarbons in cachaça by HPLC with fluorescence detection. *Food Chem* 2007; 101:334-38.
29. The Merck Index. 11^a ed. Rahway: Merck & CO Inc, 1989.
30. Costa AF. Avaliação da contaminação humana por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs): 1-hidroxipireno urinário. [dissertação]. Rio de Janeiro: Centro de estudos de Saúde do trabalhador e Ecologia Humana da Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública; 2001.
31. EC. Commission of the European Communities. Commission Regulation (EC) n° 208/2005 of 4 February 2005a amending Regulation (EC) n° 466/2001 as regards polycyclic aromatic hydrocarbons. *Official Journal L034*:3-5.
32. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n° 02, de 15 de janeiro de 2007. Aprova o Regulamento Técnico sobre Aditivos Aromatizantes. *Diário Oficial da União*; Brasília, 17 jan 2007.
33. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria n° 518, de 25 de março de 2004. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. *Diário Oficial da União*; Brasília, 26 mar 2004.
34. Howard JW, Turicchi EW, White RH, Fazio T. Extraction and estimation of polycyclic aromatic hydrocarbons in vegetable oils. *J Assoc Off Anal Chem* 1966b; 49(6):1236-44.
35. Howard JW, White RH, Fry BE Jr, Turicchi EW. Extraction and estimation of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked foods. II. Benzo(a)pyrene. *J Assoc Off Anal Chem* 1966c; 49(3):611-17.
36. Manoski AJ, Greenfield EL, Barnes CS, Worthington FL, Joe FL Jr. Survey of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked foods. *J Assoc Off Anal Chem* 1968; 51(1):114-21.
37. Grimmer G, Böhnke H. Polycyclic aromatic hydrocarbon profile analysis of high-protein foods, oils and fats by gas chromatography. *J Assoc Off Anal Chem* 1975; 58(4):725-33.
38. IARC, International Agency for Research on Cancer. Monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to humans. Some Industrial Chemical and Dyestuffs, Volume 29. [Acesso em 10/01/07]. Disponível em: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol29/volume29.pdf>.
39. Swallow WH. Survey of a polycyclic aromatic hydrocarbons in selected foods and food additives available in New Zealand. *New Zealand J Scien* 1976; 19:407-12.
40. Twominen JP, Pyysalo HS, Sauri M. Cereal products as a source of polycyclic aromatic hydrocarbons. *J Agric Food Chem* 1988; 36:118-20.
41. Serra GE, Pumpin AM, Toledo MCF. Ensaios preliminares sobre a contaminação da cana-de-açúcar e derivados por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. *Bol SBCTA* 1995; 29(2):13-37.
42. Azeredo A, Toledo MCF, Camargo MCR. Determinação de BaP em pescados. *Ciênc Tecnol Aliment* 2006, 26(1):89-93.
43. Kolarovic L, Traitler H. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in vegetable oils by caffeine complexation and glass capillary gas chromatography. *J Chromatogr* 1982; 237:263-72.
44. Stijve T, Hischenhuber. Simplified determination of benzo(a)pyrene and other polycyclic aromatic hydrocarbons in various food materials by HPLC and TLC. *Dtsch Lebensmitt Rundsch* 1987; 83(9):276-82.
45. Kruijff N, Schouten T, van der Stegen GHD. Rapid determination of benzo(a)pyrene in roasted coffee and coffee brew by HPLC with fluorescence detection. *J Agric Food Chem* 1987; 35:545-549.
46. Badolato ESG, Martins MS, Aued-Pimentel S, Alaburda J, Kumagai EE, Baptista GG, Rosenthal. Systematic study of benzo[a]pyrene in coffee samples. *J Braz Chem Soc* 2006; 17(5):989-93.
47. Kleinjans JCS, Moonen EJC, Dallinga JW, Albering HJ, van den Bogaard EJM. Polycyclic aromatic hydrocarbons in whiskies. *The Lancet* 1996; 348:1731.
48. Crosby NT, Hunt DC, Philip LA, Patel I. Determination of polynuclear aromatic hydrocarbons in food, water and smoke using high-performance liquid chromatography. *Analyst* 1981; 106:135-45.
49. Thompson D, Jolley D, Maher W. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in oyster tissues by H.P.L.C. ultraviolet and fluorescence detection. *Microchem J* 1993; 47:351-62.
50. Gomaa EA, Gray JI, Rabie S, Lopez-Bote C, Booren AM. Polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked food products and commercial liquid smoke flavourings. *Food Addit Contam* 1993; 10(5):503-21.
51. Riha WE, Wendorff WL, rank S. Benzo(a)pyrene content of smoked and smoke-flavored cheese products sold in Wisconsin. *J Food Prot* 1992; 55(8):636-38.

52. Barranco A, Alonso-Salles RM, Crespo I, Berrueta LA, Gallo B, Vicente F, Sarobe M. Polycyclic aromatic hydrocarbons in commercial Spanish fatty foods. *J Food Prot* 2004; 267(12):2786-91.
53. Chen BH, Wang CY, Chiu CP. Evaluation of analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in meat products by liquid chromatography. *J Agric Food Chem* 1996; 44:2224-51.
54. Warzecha L, Strózyk, Janoszka B, Blaszczyk U, Bodzek D. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons, azaarenes, and aminoazaarenes in meat samples by solid-phase extraction (SPE) and HPLC. *Acta Chromatogr* 2002; 12:104-18.
55. Barranco A, Alonso-Salles RM, Bakkali A, Berrueta LA, Gallo B, Vicente F, Sarobe M. Solid-phase clean-up in the liquid chromatographic determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in edible oils. *J Chromatogr A* 2003; 988:33-40.
56. García-Falcón MS, Pérez-Lamela M, Simal-Gándara J. Comparison of strategies for extraction of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons from drinking waters. *J Agric Food Chem* 2004; 52:6897-903.
57. Joe, FL Jr, Salemme J, Fazio T. High-performance liquid chromatography with fluorescence and ultra-violet detection of polynuclear aromatic hydrocarbons in barley malt. *J Assoc Off Anal Chem* 1982; 65(6):1395-402.
58. Cejpek K, Hajslová, Jehlicková Z, Merhant J. Simplified extraction and clean-up procedure for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in fatty and protein-rich matrices. *Int J Env Anal Chem* 1995; 61:65-80.
59. Bernal JL, Nozal MJ, Toribio L, Serna ML, Borrull F, Marcé RM, Pocurull. E. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water by use of supercritical fluid chromatography coupled on-line to solid phase extraction with disks. *J Chromatogr A* 1997; 778:321-28.
60. Voutsas D, Samara C. Dietary intake of trace elements and polycyclic aromatic hydrocarbons via vegetables grown in an industrial Greek area. *The Sci Total Environ* 1998; 218:203-16.
61. Lintas C, Matthaëis MC, Merli F. Determination of benzo(a)pyrene in smoked, cooked and toasted food products. *Food Cosmet Toxicol* 1979; 17:325-28.
62. Rivera L, Curto MJC, Pais P, Galceran MT, Puignou L. Solid phase extraction for the selective isolation of polycyclic aromatic hydrocarbons, azarenes and heterocyclic aromatic amines in charcoal-grilled meat. *J Chromatogr A* 1996; 731:85-94.
63. Pumpin AM, Toledo MCF. Benzo(a)pyrene in olive oils on the Brazilian market. *Food Chem* 1996; 55(2):185-88.
64. Camargo MCR, Tfouni SAV, Vitorino SHP, Menegário TF, Toledo MCF. Determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em guaraná em pó (*Paullinia cupana*). *Ciênc Tecnol Aliment* 2006; 26(1):230-4.
65. Van Der Wielen JCA, Jansen JTA, Martena MJ, Groot HN, In't Veld PH. Determination of the level of benzo[a]pyrene in fatty foods and food supplements. *Food Addit Contam* 2006; 23(7):709-14.
66. Toussaint G, Walker EA. Use of high-performance liquid chromatography as a clean-up procedure in analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in alcoholic beverages. *J Chromatogr* 1979; 171:448-52.
67. São Paulo. Governo do Estado de São Paulo. Lei nº 11.241 de 19 de setembro de 2002. *Diário Oficial do Estado de São Paulo*. São Paulo, Seção 1, p.2.

Avaliação do teor alcoólico e componentes secundários de cachaças

Evaluation of alcoholic strength and congeners in cachaças

RIALA6/1147

Miriam Solange Fernandes CARUSO*, Letícia Araújo Farah NAGATO, Janete ALABURDA

*Endereço para correspondência: Instituto Adolfo Lutz, Divisão de Bromatologia e Química. Av. Dr. Arnaldo, 355, Cerqueira César, CEP 01246-902, São Paulo, SP/Brasil, e-mail: micaruso@ial.sp.gov.br
Recebido: 12/11/2007 – Aceito para publicação: 06/03/2008

RESUMO

A cachaça e a aguardente de cana são produtos alcoólicos oriundos da destilação do caldo de cana fermentado. A aguardente de cana deve apresentar teor alcoólico de 38,0 a 54,0 % (em volume, a 20°C) e a cachaça, de 38,0 a 48,0%. Foram analisadas 60 amostras de cachaça comercializadas na cidade de São Paulo, com o intuito de averiguar a conformidade quanto à graduação alcoólica e componentes secundários (acetaldeído, acetato de etila e álcoois superiores) em comparação aos parâmetros estabelecidos pela legislação do Ministério da Agricultura. O teor alcoólico nas amostras analisadas variou de 34,7% a 46,9%, e em 10 amostras (17,0%) a graduação alcoólica foi inferior a 38,0%. As concentrações de acetaldeído oscilaram na faixa de valor não quantificado (< 5) a 120 mg/100 mL de álcool anidro (AA); 31 amostras (52,0%) apresentaram valores acima do limite máximo estabelecido de 30 mg/100 mL AA. As concentrações de acetato de etila de todas as amostras estavam em conformidade com a legislação (máximo de 200 mg/100 mL AA). Em relação aos álcoois superiores, sete amostras (12,0%) apresentaram teores superiores ao limite máximo previsto (360 mg/100 mL AA). Das 60 amostras, 70,0% estavam em desacordo com as especificações em pelo menos um dos parâmetros avaliados, sugerindo-se que há necessidade de introduzir melhorias no processo produtivo e no estabelecimento de estratégias para realizar maior controle analítico do produto final.

Palavras-chave. bebidas alcoólicas, legislação, composição, álcoois, cromatografia gasosa.

ABSTRACT

Cachaça and sugar cane spirit are alcoholic products obtained from simple distillation of fermented sugar cane juice. The alcoholic graduation in the sugar cane spirit is from 38% to 54% in volume at 20 °C, while for cachaça it may vary from 38% to 48 % v/v. Aiming to verify the adequacy of alcoholic strength and of amounts of secondary compounds or congeners (acetaldehyde, ethyl acetate and higher alcohols) in conformity to limits established by Brazilian legislation of Ministry of Agriculture, 60 samples of cachaça commercialized in São Paulo city were analyzed. The alcoholic strength of the samples varied from 34.7% to 46.9 % v/v; 10 samples (17.0%) presented alcoholic graduation less than 38%. The acetaldehyde concentrations ranged from not quantified (< 5) to 120 mg/100 mL of absolute alcohol (AA); 31 samples (52.0%) showed values above the maximum allowed limit, that is 30 mg/100 mL AA. All the results of ethyl acetate amounts were within the legal maximum limit of 200 mg/100 mL AA. Concerning to higher alcohols, seven samples (12.0%) presented concentration values above the established maximum limit (360 mg/100 mL AA). Of 60 analyzed samples, 70 % were out of the specifications in relation to at least one of the evaluated parameters. It is suggested that improvements have to be done on cachaça manufacturing process and for conducting the best analytical control of the final product.

Key words. alcoholic beverages, legislation, composition, alcohols, gas chromatography.

INTRODUÇÃO

O produto alcoólico obtido a partir da destilação do caldo de cana-de-açúcar fermentado pode ser denominado como aguardente de cana ou cachaça, de acordo com a graduação alcoólica que apresente. Segundo a legislação brasileira em vigor, a aguardente de cana é a bebida que possui um teor alcoólico, em volume, de 38 a 54% e a cachaça, de 38 a 48%, a 20°C. Tanto a aguardente quanto a cachaça podem ser adicionadas de açúcares de 6,0 a 30,0g/L, expressos em sacarose, porém, devem ser denominadas de “adoçadas”¹. A expressão “cachaça” é definida pelo Decreto nº 4851/03 e a utilização deste termo só é permitida para a bebida com características próprias, produzidas exclusivamente no Brasil².

De acordo com dados da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), a região Centro-Sul é responsável por 86,8% da produção nacional de cana-de-açúcar, sendo o Estado de São Paulo o maior produtor, com aproximadamente 60% do que é cultivado. A estimativa de produção para a safra de 2006/2007 é de 475,73 milhões de toneladas, com um aumento de 10,3% em relação à safra passada. Do total da cana colhida, 50,9% destinam-se à obtenção de açúcar, 38,6% à produção de etanol e 10,5% restantes são utilizados para produzir cachaça, alimentação animal, sementes, rapadura, açúcar mascavo e para outros fins³.

A cachaça é uma das bebidas mais populares do Brasil; depois da cerveja, é a segunda bebida alcoólica mais consumida. A produção anual, estimada em 1,4 bilhão de litros, movimenta um capital de, aproximadamente, R\$ 1 bilhão e é responsável por mais de 400 mil empregos direta e indiretamente^{4,5}. A exportação da cachaça ainda é inexpressiva, apenas 1% do total produzido é exportado para países como Alemanha, Itália, França, EUA e Japão, de forma que praticamente toda a produção é destinada ao mercado nacional^{4,5}.

A produção da cachaça ocorre de uma forma pulverizada em quase todos os Estados. Segundo dados do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), existem cerca de 1.800 estabelecimentos produtores de cachaça registrados no MAPA e mais de 30 mil produtores em todo o país. A maior parte está localizada nos estados de São Paulo, Pernambuco, Ceará, Rio de Janeiro, Goiás e Minas Gerais. Estes estados respondem por cerca de 75% da produção nacional. Considera-se que existam mais de 5 mil marcas, tanto de empresas de grande porte quanto de pequenos alambiques⁵. Aproximadamente, 30% do total de cachaça produzida corresponde àquelas obtidas por destilação em alambique⁶.

O processo produtivo da cachaça pode ser resumido nas seguintes etapas: preparação da matéria prima, extração do caldo, fermentação e destilação. Durante a fermentação alcoólica, ocorre o desdobramento dos açúcares do caldo de cana com a formação de dois produtos principais: álcool etílico e dióxido de carbono. Além desses, há, normalmente, a formação de pequenas quantidades de outros componentes, que recebem a denominação de produtos secundários da fermentação alcoólica,

tais como ácidos carboxílicos, ésteres, aldeídos e álcoois superiores^{7,8}. Segundo a Instrução Normativa nº 13, do MAPA, de 29 de junho de 2005, o coeficiente de congêneres (componentes secundários ou componentes voláteis “não álcool”, ou substâncias voláteis “não-álcool”, ou impurezas voláteis “não-álcool”) é a somatória de: acidez volátil (expressa em ácido acético), aldeídos (expressos em acetaldeído), ésteres totais (expressos em acetato de etila), álcoois superiores (expressos pela soma do álcoois n-propílico, isobutílico e isoamílicos), furfural, mais hidroximetilfurfural. O coeficiente de congêneres deve situar-se entre 200 a 650 mg por 100mL de álcool anidro (AA)¹.

Foi objetivo deste trabalho verificar a adequação aos parâmetros estabelecidos pela legislação em vigor quanto aos teores de álcool em volume a 20°C e componentes secundários em amostras de cachaça comercializadas na cidade de São Paulo.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

Foram analisadas 60 amostras de cachaça de marcas e/ou lotes diferentes, adquiridas no comércio da cidade de São Paulo, provenientes dos Estados de Minas Gerais (32), São Paulo (22), Pernambuco (2), Ceará (2) e Mato Grosso (2). Todas as amostras foram mantidas em suas embalagens originais, à temperatura ambiente.

Métodos

Solventes e reagentes

O padrão de acetaldeído utilizado foi da marca Fluka; de n-propanol e isobutanol, Sigma; de 3-pentanol (padrão interno) e acetato de etila, Merck; os padrões de 2-metilbutanol e de 3-metilbutanol foram da marca Aldrich. O solvente empregado foi etanol, grau HPLC, Merck.

Soluções-padrão para análise de componentes secundários em cachaça

As soluções-padrão dos componentes secundários (acetaldeído, acetato de etila, n-propanol, isobutanol, 2-metilbutanol e 3-metilbutanol) foram preparadas a partir de diluições de soluções-estoque de padrões e de solução-estoque de padrão interno (3-pentanol). A solução-estoque de padrões continha os componentes secundários nas seguintes concentrações, em mg por 100g de solução: acetaldeído: 3080, acetato de etila: 3169, n-propanol: 2481, isobutanol: 2459, 2-metilbutanol: 640 e 3-metilbutanol: 1127. A solução-estoque de padrão interno continha 2661 mg de 3-pentanol por 100g de solução. Foi utilizado etanol grau HPLC como solvente no preparo das soluções. Alíquotas das duas soluções-estoque foram misturadas e diluídas em etanol a 40%, obtendo-se cinco concentrações diferentes; estas soluções foram utilizadas para construção das curvas de calibração de cada componente secundário.

A solução diluída de padrão interno em etanol a 40% foi preparada a partir da solução-estoque (em álcool absoluto); a concentração de 3-pentanol obtida foi de 240mg/100g.

Preparo das amostras

As amostras foram pesadas (cerca de 9mL) e adicionadas de solução diluída de padrão interno (1mL). As cachaças adoçadas foram previamente destiladas em destilador de álcool.

Determinação da graduação alcoólica em volume a 20°C

A graduação alcoólica em volume a 20°C foi obtida a partir da conversão do valor de densidade relativa a 20°C/20°C em porcentagem de teor alcoólico em volume, utilizando tabela de conversão. As densidades relativa e absoluta foram determinadas em densímetro automático digital de leitura direta (Mettler). Na calibração do equipamento foi utilizada água ultra-pura como referência, na temperatura de 20±0,1 °C.

Análise cromatográfica⁹

As soluções de calibração e de amostras foram injetadas em cromatógrafo a gás com detector de ionização de chama, marca Finnigan (9001), *software* Borwin, com programação de temperatura do forno. Foi utilizada a coluna capilar CP-Wax 52 CB, Varian, de 30 m, 0,25µm e 0,25mm; volume de injeção: 1µL; gás de arraste: hidrogênio. A quantificação foi feita por padronização interna, utilizando 3-pentanol. Não foi possível obter duas curvas independentes para 2-metilbutanol e 3-metilbutanol, tendo em vista estes compostos co-eluírem na coluna empregada; desta forma, foi considerada a área total de ambos obtendo-se uma única curva, possibilitando a quantificação, cujo resultado foi expresso como a soma de 2 e 3-metilbutanol.

A partir das curvas de calibração, as concentrações de cada analito foram obtidas em mg/100g; entretanto, para expressar os resultados conforme exigido pela legislação em vigor, estes valores foram convertidos para mg/100mL de álcool anidro (AA) utilizando-se a densidade absoluta e a graduação alcoólica de cada bebida¹.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teor de álcool, em volume, variou de 34,7 a 46,9%, sendo que 10 amostras (17%) apresentaram graduação alcoólica inferior à quantidade mínima exigida por lei, que é de 38%¹. Os dados obtidos, apresentados na Figura 1, revelaram-se semelhantes aos reportados por Fernandes et al. (2007)¹⁰, em amostras de cachaças produzidas no sul do Estado de Minas Gerais. Neste estudo, das 16 amostras analisadas, 3 (19%) apresentaram teor de álcool abaixo da especificação. O mesmo foi constatado por Boguz Junior et al. (2006)¹¹, em uma pesquisa onde foi estudada a composição química de cachaças de 4 regiões do Estado do Rio Grande do Sul. Naquele trabalho, apesar dos valores médios de álcool dos grupos investigados

estarem de acordo com o que preconiza a legislação, as faixas de concentração obtidas iniciavam-se em valores abaixo de 38%, são elas (em %v/v): 37,3 – 47,7 (região de Ijuí), 35,70 – 43,40 (Três Passos), 35,60 – 43,20 (Santa Rosa) e 31,10 – 45,70 (Cruz Alta). Este comportamento aponta prováveis problemas no processo de destilação das bebidas ou dificuldade na padronização da graduação alcoólica do produto final.

Para a análise dos componentes secundários foi utilizada uma coluna CP-Wax 52 CB, obtendo-se numa mesma corrida cromatográfica a separação de todos os componentes secundários (Figura 2), além do metanol, composto considerado um contaminante natural, proveniente da hidrólise das pectinas, formado durante o processo de extração do caldo da cana e fermentação¹². A concentração máxima tolerada pela legislação em vigor é de 20mg de metanol por 100mL de AA¹. Apesar de presente em todas as bebidas analisadas as concentrações de metanol situaram-se bem abaixo da especificação.

Como pode ser observado na Figura 2, o acetaldeído foi o primeiro composto a ser separado na coluna cromatográfica empregada, isto ocorre em virtude de sua alta volatilidade; esta característica faz com que este composto seja destilado na primeira fração denominada “cabeça” da destilação^{6,13}. O acetaldeído também é formado no organismo após a ingestão de bebidas alcoólicas, por meio da biotransformação do etanol,

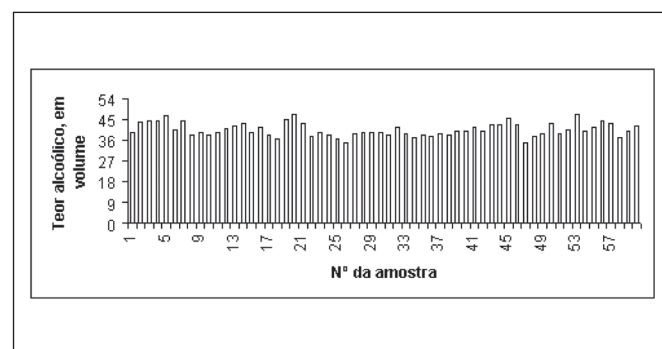


Figura 1. Teor alcoólico, em volume, das 60 amostras de cachaça

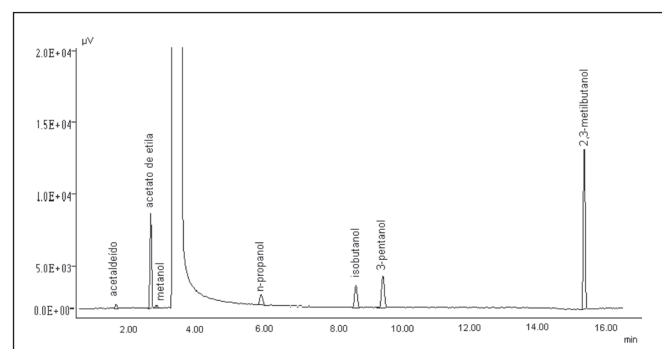


Figura 2. Cromatograma de componentes secundários e metanol em uma amostra de cachaça, utilizando coluna CP-WAX 52 CB, 30 m, 0,25 mm, 0,25 mm (CG-DIC); gás de arraste: hidrogênio (1mL/min).

sendo oxidado, posteriormente, a ácido acético¹⁴. Neste trabalho, as concentrações de acetaldeído variaram de não quantificado (abaixo de 5) a 120mg/100mLAA, sendo que 31 amostras (52%) apresentaram resultados superiores ao limite máximo estabelecido pela legislação, que é de 30mg/100mL AA¹. Os resultados estão apresentados na Figura 3. De uma maneira geral, os dados da literatura não apresentam concentrações elevadas de acetaldeído; no trabalho realizado por Fernandes et al.¹⁰, apenas 1 amostra, das 16 analisadas, apresentou teor de acetaldeído de 36,02mg/100mL AA, valor um pouco acima da especificação. No estudo de Boguz Junior et al.¹¹, todas amostras de cachaça estavam de acordo com a legislação, o mesmo ocorrendo na pesquisa de Nascimento et al.¹⁵, onde nenhuma das 56 amostras de cachaça atingiu o valor máximo permitido, de 30mg/100 mL AA, onde a faixa de concentração obtida foi de 0,05 a 20,0mg/100mLAA. Pereira et al¹⁶ detectaram teores de acetaldeído acima do limite apenas em 2 das 45 amostras de cachaça analisadas.

A presença de aldeídos em bebidas alcoólicas, em quantidades elevadas, pode causar dores de cabeça, náuseas, confusão mental, queda de pressão sanguínea, entre outros sintomas¹⁵. A importância do controle do acetaldeído deve-se principalmente ao fato de que a Agência Internacional para Pesquisas sobre o Câncer (IARC) classifica esta substância como pertencente ao Grupo 2B (possível carcinogênico para humanos) e o associa à formação de câncer de esôfago após ingestões de grandes quantidades de bebidas alcoólicas¹⁷. A concentração elevada de acetaldeído em algumas amostras avaliadas neste trabalho pode ser resultado de oxidação ou contaminação do mosto por bactérias indesejáveis¹⁶.

Com relação ao demais compostos analisados, a Instrução Normativa nº 13/05¹ recomenda que as concentrações de n-propanol, isobutanol e 2 e 3-metilbutanol devem ser somadas e o resultado expresso como álcoois superiores. Esta denominação refere-se a todos os álcoois com mais de 2 átomos de carbono, formados durante a fermentação e também referidos como óleo fúsel. Os álcoois superiores são produzidos, geralmente, a partir da degradação de alguns aminoácidos e sua produção tende a aumentar quando há lentidão no processo fermentativo. Variáveis como armazenagem

prolongada da cana, temperatura não controlada durante a fermentação, pH do mosto, níveis de inoculação, linhagem da levedura, quantidade de nitrogênio presente, grau de aeração durante a fermentação, etc, podem promover a degradação dos referidos aminoácidos, promovendo a formação de álcoois superiores^{16,18}. Por serem compostos mais pesados concentram-se principalmente na “cauda” da destilação⁶.

Do total de 60 amostras de cachaça analisadas, 7(12%) apresentaram teores de álcoois superiores acima de 360mg/100mL de AA, valor máximo estabelecido pela legislação em vigor¹. Os resultados, que estão apresentados na Figura 4, são semelhantes aos obtidos por Pereira et al.¹⁶, onde 15,6% das amostras apresentaram concentrações acima dos teores permitidos.

Os resultados elevados de acetaldeído e de álcoois superiores encontrados indicam que, provavelmente, não foram devidamente separadas as frações “cabeça” e “cauda” durante a destilação das cachaças. Isto pode ter acontecido com a finalidade de aumentar o rendimento do processo, em detrimento da qualidade do produto final obtido, ou, por carência de informação dos produtores. Além da questão toxicológica, a presença de acetaldeído e álcoois superiores em altas concentrações também prejudicam a qualidade sensorial da bebida¹³.

As concentrações de acetato de etila, um dos principais ésteres responsáveis pelo aroma e sabor das cachaças, variaram de 5,4 a 200,0mg/100mL AA (Figura 5). Todos os resultados obtidos revelaram-se de acordo com a legislação vigente (máximo permitido de 200mg/100mLAA). O mesmo foi verificado por Bôscolo et al.¹⁹ em uma pesquisa realizada em 25 amostras de cachaça, comercializadas em diferentes regiões do Brasil. De modo semelhante, as pesquisas de Fernandes et al.¹⁰ e Pereira et al.¹⁶ não detectaram valores de acetato de etila fora do limite permitido.

Além dos parâmetros estudados neste trabalho, a legislação em vigor prevê limites para contaminantes orgânicos e inorgânicos; fazem parte dos orgânicos, metanol, carbamato de etila, acroleína e álcoois sec-butílico e n-butílico; como inorgânicos, cobre, chumbo e arsênio¹. A avaliação destes contaminantes não foi o foco desta pesquisa, que teve como objetivo verificar a composição principal das bebidas. Dentre

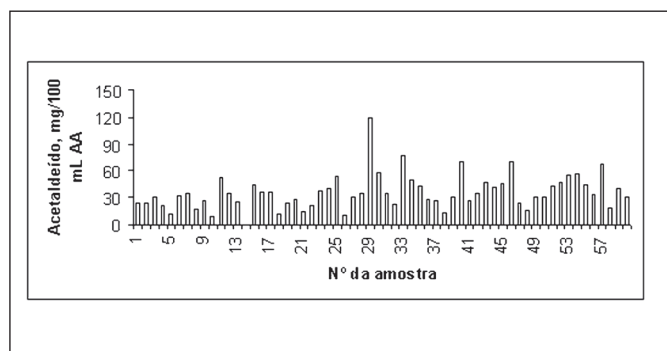


Figura 3. Acetaldeído, em mg/100mL de álcool anidro, em amostras de cachaça.

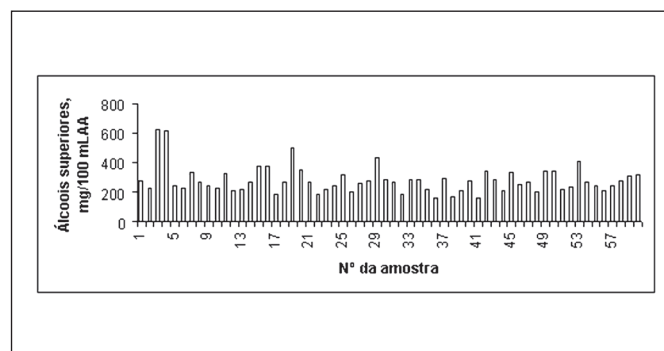


Figura 4. Álcoois superiores, em mg/100 mL de álcool anidro (AA), em amostras de cachaça.

as 60 amostras de cachaça avaliadas neste trabalho, 70% estavam em desacordo com as especificações legais em pelo menos um dos parâmetros pesquisados. Fernandes et al.¹⁰ verificaram que das 17 amostras de cachaça analisadas, adquiridas diretamente de seus fabricantes, 7 (aproximadamente 41%) não atendiam às exigências de qualidade em relação a um parâmetro avaliado, no mínimo. Os autores sugeriram que os produtores necessitavam receber treinamento, a fim de modificar o processo e obter cachaças dentro dos padrões físico-químicos estabelecidos.

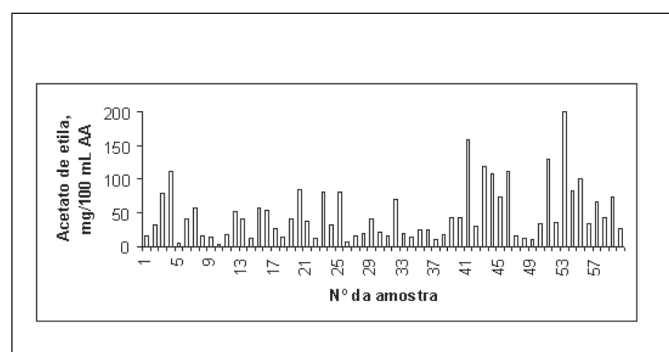


Figura 5. Acetato de etila, em mg/100 mL de álcool anidro (AA), em amostras de cachaça.

Segundo o Serviço de Apoio às Micro e Pequenas Empresas (SEBRAE), dados não oficiais do ano de 2003 revelaram que cerca de 90% da produção de cachaça de alambique poderiam ser clandestinas, ou seja, não tinham registro no MAPA e nem qualquer tipo de fiscalização. Este fator cria um entrave para a organização da cadeia produtiva, uma vez que, pela falta de fiscalização, de controle da produção e de capacitação dos produtores, são lançados no mercado produtos com qualidade inferior, sendo alguns até prejudiciais à saúde do consumidor²⁰. As bebidas clandestinas representam um risco em potencial à saúde pública, sendo necessária uma intensificação das fiscalizações de modo a banir essa prática constante.

O mercado da cachaça é bastante promissor e portanto, a obtenção de cachaças com qualidade superior podem ampliar as fronteiras comerciais e aumentar as exportações, gerando mais divisas e fontes de trabalho. Porém, para atingir esses objetivos, são necessários investimentos na capacitação técnica dos produtores e no controle rigoroso da cadeia produtiva. Deve-se ainda, intensificar a fiscalização, com o intuito de combater a clandestinidade das bebidas, prevalecendo, acima de tudo, a preocupação com a obtenção de produtos de qualidade e a preservação da saúde dos consumidores.

CONCLUSÕES

Das 60 amostras de cachaça analisadas, 70% estava em desacordo com as especificações em pelo menos um dos parâmetros avaliados, como etanol, acetaldeído, acetato de etila e álcoois superiores. Embora nem todos os parâmetros legais tenham sido monitorados, os itens pesquisados sugerem que o controle do processo produtivo das bebidas apresenta deficiências.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro (Processo nº 05/50952-1, 2005).

REFERÊNCIAS

1. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 13, de 29 de junho de 2005. Diário Oficial da União, Brasília, 30 jun 2005, Seção I, p. 3.
2. Brasil. Presidência da República. Decreto nº 4851, de 2 de outubro de 2003. Altera dispositivos do Regulamento aprovado pelo Decreto nº 2.314, de 4 de setembro de 1997, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. Revoga o Decreto nº 4072 de 03 de janeiro de 2002. Diário Oficial da União, Brasília, 3 out 2003. Seção I, p. 6-7.
3. Brasil. Ministério da Agricultura. CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. [Acesso em 28/12/06]. Disponível em www.conab.gov.br.
4. PBDAC. Programa Brasileiro de Desenvolvimento da Cachaça. [Acesso em 02/03/06]. Disponível em www.atisonline.com.br/pbdac.
5. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. O setor produtivo da cachaça. [Acesso em 22/09/07]. Disponível em <http://www.agricultura.gov.br/portal>.
6. Pereira JAM, Rosa CA, Faria JB. Cachaça de alambique. Tecnologia Fácil – 8. Brasília: L K Editora; 2006.
7. Novaes FV. Como controlar a qualidade da cachaça. Eng Moderno 2001; 25:24-9.
8. Aquarone E, Lima UA, Borzani W. Alimentos e bebidas produzidos por fermentação: biotecnologia. São Paulo: Ed. Edgard Blücher, v.5, 1983.
9. Nagato LAF, Caruso MSF, Duran MC, Carvalho MFH, Cano CB. Bebidas alcoólicas. In: Métodos físico-químicos para análise de alimentos. Instituto Adolfo Lutz. Brasília: ANVISA; 2005. p. 405-60.
10. Fernandes JF, Cardoso MG, Vilela JF, Morais AR, Silva VF, Nelson DL. Physicochemical quality of a blend of domestic cachaças from the south of Minas Gerais. J Food Compost Anal 2007; 20:257-61.

11. Bogusz Jr S, Ketzer DCM, Gubert R, Andrades L, Gobo AB. Composição química da cachaça produzida na região noroeste do Rio Grande do Sul, Brasil. *Ciênc Tecnol Aliment* 2006; 26(4): 793-798.
12. Blinder F, Voges E, Lauge P. The problem of methanol concentration admissible in distilled fruit spirits. *Food Addit Contam* 1988; 5(3): 343-51.
13. Faria JB. Sobre a produção de aguardente de cana. *Eng Moderno* 1995; 40: 9-16.
14. Bermond II DM, Tose H. Consumo de bebidas alcoólicas: interações com o benzeno e outras substâncias de uso ocupacional. *Rev Psiq Clin* 2000; 27(2):1-8. [Acesso em 05/01/07]. Disponível em [www.hcnet.usp.br/ipq/revista/r27\(2\)/art65.htm](http://www.hcnet.usp.br/ipq/revista/r27(2)/art65.htm).
15. Nascimento RF, Marques JC, Lima Neto BS, Keukeleire D, Franco DW. Qualitative and quantitative high-performance liquid chromatographic analysis of aldehydes in Brazilian sugar cane spirits and other distilled alcoholic beverages. *J Chromatogr A* 1997; 782:13-23.
16. Pereira NE, Cardoso MG, Azevedo SM, Morais AR, Fernandes W, Aguiar PM. Compostos secundários em cachaças produzidas no Estado de Minas Gerais. *Ciênc Agrotec* 2003; 27(5): 1068-75.
17. IARC, International Agency for Research on Cancer. Monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to humans. Re-evaluation of some organic chemicals, hydrazine and hydrogen peroxide, 1999; 71:319. [Acesso em 09/01/07]. Disponível em: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol71/volume71.pdf>.
18. Boza Y, Horii J. Influência da destilação sobre a composição e a qualidade sensorial da aguardente de cana-de-açúcar. *Ciênc Tecnol Aliment* 1998; 18(4): 391-6.
19. Bôscolo M, Bezerra CWB, Cardosos DR, Lima Neto BS, Franco DW. Identification and dosage by HRGC of minor alcohols and esters in Brazilian sugar cane spirits. *J Braz Chem Soc* 2000; 11(1): 86-90.
20. SEBRAE - Serviço de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. Estudo de viabilidade técnica e econômica do arranjo produtivo da cachaça de alambique da região sudeste de Tocantins, 2003 (Versão 1). [Acesso em 09/01/07]. Disponível em: www.biblioteca.sebrae.com.br/bds/BDS.nsf/.

Efeito antioxidante do extrato de coentro e do palmitato de ascorbila na estabilidade oxidativa do óleo de girassol

Antioxidant effect of coriander extract and of ascorbyl palmitate on the oxidative stability of sunflower oil

RIALA6/1148

Priscila Milene ANGELO¹, Neuza JORGE^{1*}

*Endereço para correspondência UNESP, Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos Rua Cristóvão Colombo, 2265, Jd. Nazareth CEP 15054-000, São José do Rio Preto, SP/ Brasil, Tel.: (17) 3221-2257 e-mail: njorge@ibilce.unesp.br

¹ Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, SP/ Brasil.

Recebido: 15/10/2007 – Aceito para publicação: 19/03/2008

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antioxidante do extrato de coentro e de palmitato de ascorbila para determinar as concentrações mais eficazes a serem adicionadas ao óleo de girassol. Foram adicionadas as concentrações de 400, 800, 1.200, 1.600 e 2.000 mg/kg de extrato de coentro e de palmitato de ascorbila nas concentrações de 100, 200, 300, 400 e 500 mg/kg ao óleo de girassol. A atividade dos componentes antioxidantes foi avaliada por meio da estabilidade oxidativa utilizando Rancimat, cujas concentrações foram determinadas por regressão polinomial. As concentrações de 1.600 mg/kg do extrato de coentro e de 500 mg/kg do palmitato de ascorbila foram as que conferiram melhor estabilidade oxidativa ao óleo de girassol. O extrato de coentro e o de palmitato de ascorbila apresentaram efeito positivo quanto à propriedade de conferir estabilidade oxidativa, o que os tornam como escolhas alternativas na conservação de óleos vegetais.

Palavras-chave. extrato de coentro, palmitato de ascorbila, compostos fenólicos, óleo de girassol, estabilidade oxidativa.

ABSTRACT

This study was performed for assessing the antioxidant activity of different concentrations of coriander extract and of ascorbyl palmitate, in order to determine those most efficient amounts to be added into sunflower oil. Coriander extract in concentrations of 400, 800, 1,200, 1,600 and 2,000 mg/kg, and ascorbyl palmitate in concentrations of 100, 200, 300, 400 and 500 mg/kg were added into sunflower oil. The antioxidant activity of each concentration was evaluated through oxidative stability using Rancimat equipment, and the concentrations were determined by polynomial regression. The concentrations of 1,600 mg/kg of coriander extract and 500 mg/kg of ascorbyl palmitate were those that presented the best oxidative stability for sunflower oil. The coriander extract and the ascorbyl palmitate showed a positive effect in promoting oxidative stability, which make them an alternative choice for preserving vegetal oil.

Key words. coriander extract, ascorbyl palmitate, phenolic compounds, sunflower oil, oxidative stability.

INTRODUÇÃO

No Brasil, a produção de óleo de girassol tem se expandido consideravelmente, sobretudo nos estados da região Centro Oeste¹. O consumo do óleo de girassol em 1992 era de 11,6 mil toneladas e foi avaliado em 2003 em 62 mil toneladas², sendo este aumento de demanda atribuído à redução de preço em relação ao óleo de soja³.

O óleo de girassol, um dos mais saudáveis em seu

segmento, contém em sua composição o maior teor de ácidos graxos poliinsaturados, sendo mais abundante o ácido linoléico, que é essencial ao organismo e, como não é sintetizado pelo corpo humano, deve ser ingerido através dos alimentos³. Outra característica importante é que este óleo é uma excelente fonte de vitamina E, α -tocoferol⁴.

O retardo ou a prevenção da oxidação lipídica, uma das principais causas de deterioração no processo de aquecimento de óleos vegetais, pode ser realizado pela adição de

antioxidantes, que mantêm a qualidade e prolongam a vida de prateleira do alimento⁵.

No entanto, o emprego de antioxidantes sintéticos na indústria de alimentos tem sido alvo de questionamentos quanto à sua inocuidade. Sendo assim, pesquisas são realizadas para a busca de compostos naturais que apresentem esta propriedade funcional, podendo atuar como alternativa para prevenir a deterioração oxidativa de alimentos e diminuir o uso dos antioxidantes sintéticos.

O palmitato de ascorbila é um antioxidante sintético, derivado do éster de ácido ascórbico, com eficiência em retardar a oxidação lipídica⁶. É frequentemente classificado como antioxidante natural, mas no sentido exato isto não é correto, pois o éster palmitoil não é encontrado em vegetais⁷. O Ministério da Saúde, no Brasil, limita o uso do palmitato de ascorbila a 500 mg/kg como concentração máxima permitida⁸.

Por várias décadas os pesquisadores têm demonstrado um grande interesse em identificar e isolar antioxidantes naturais, devido à rejeição de aditivos sintéticos em alimentos⁹. Dentre as inúmeras fontes de antioxidantes naturais estão incluídos grãos e sementes de oleaginosas¹⁰, de cereais¹¹, sementes de frutas cítricas¹², frutas¹³, legumes¹⁴ e especiarias¹⁵.

As especiarias possuem uma posição especial em relação a outras fontes naturais, pois são usadas tradicionalmente como ingredientes, o que permite que sejam fácil e diretamente utilizadas, exercendo sua atividade antioxidante nos alimentos.

O coentro (*Coriandrum sativum* L.) pertence à família *Umbelliferae*, é largamente cultivado e consumido na alimentação nacional e internacional. Vários estudos comprovam sua ação antioxidante^{16, 17, 18}, sendo este potencial atribuído à presença de compostos fenólicos.

Tendo em vista os indícios de problemas que podem ser provocados pelo consumo de antioxidantes sintéticos, vários estudos têm sido conduzidos com a finalidade de substituí-los por antioxidantes naturais ou fazer associações entre eles, com o intuito de diminuir sua quantidade nos alimentos¹⁹. Além disso, estudos epidemiológicos sugerem que antioxidantes naturais podem ser benéficos ao organismo humano, prevenindo doenças⁶, porém faz-se necessário submeter estes antioxidantes a testes toxicológicos.

Considerando o elevado consumo de alimentos fritos, o interesse em reduzir as alterações que ocorrem no óleo durante o processo de aquecimento e o estímulo a substituição ou a diminuição do uso de antioxidantes sintéticos, torna-se necessário realizar um estudo da atividade antioxidante do extrato de coentro e palmitato de ascorbila, para determinar as mais eficazes a serem aplicadas no óleo de girassol.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

O coentro fresco foi adquirido no comércio local e realizada lavagem em água corrente e retirada das raízes. As

folhas e talos foram dispostos sobre bandejas e secas em estufa com circulação de ar forçada a 45°C, por 48 horas. Após a desidratação, o material foi triturado e, em seguida, passado em tamis de 80 mesh para obtenção de um pó uniforme, sendo este acondicionado em sacos de polietileno e mantido sob congelamento (-18°C).

O extrato de coentro (EC) foi obtido pelo processo de extração aquosa proposto por Melo¹⁷. O coentro desidratado (10g) foi mantido, por 60 minutos, sob agitação permanente, em água destilada (100mL), à temperatura ambiente e, em seguida, a mistura foi centrifugada a 4.000rpm, por 10 minutos. Após a transferência do sobrenadante, o precipitado foi novamente submetido ao processo de extração e os sobrenadantes combinados. Em seguida, o solvente foi removido, sob pressão reduzida a 60°C, com vistas a determinar, por pesagem direta, o teor da matéria seca. O extrato seco foi ressuspenso em 50mL de água destilada e acondicionado em frasco âmbar. Após aplicação de um fluxo de nitrogênio foi fechado e mantido sob congelamento (-18°C) até o momento das análises.

O antioxidante palmitato de ascorbila comercial (PA), Grindox™ 562, foi utilizado na forma de *blend*, possuindo em sua composição 10% de palmitato de ascorbila (palmitato de vitamina C), 90% de propileno glicol e emulsificante grau alimentício como veículo.

Para a realização deste estudo foi utilizado óleo de girassol refinado, isento da adição de antioxidantes sintéticos e ácido cítrico e, emulsificante mono-diglicerídeo, marca Grindsted Mono-Di Ca 52-B, utilizado para combinar o extrato de coentro com o óleo de girassol.

O antioxidante palmitato de ascorbila e o emulsificante mono-diglicerídeo foram cedidos pela empresa Danisco S/A e o óleo de girassol fornecido pela empresa Bunge Alimentos S/A, Gaspar-SC.

Procedimento experimental

Ao óleo de girassol foram adicionados o extrato de coentro nas concentrações de 400, 800, 1.200, 1.600 e 2.000mg/kg e palmitato de ascorbila nas concentrações de 100, 200, 300, 400 e 500mg/kg.

A atividade dos antioxidantes em diferentes concentrações foi avaliada através da determinação da estabilidade oxidativa utilizando o equipamento Rancimat, marca Metrohm, modelo 743.

O extrato de coentro foi adicionado ao óleo em combinação com o emulsificante mono-diglicerídeo (1%), enquanto o palmitato de ascorbila foi misturado diretamente ao óleo e, ambos foram aquecidos (40°C) e agitados até completa dissolução.

Métodos

O teor de compostos fenólicos foi determinado no extrato de coentro, por meio do método colorimétrico desenvolvido por Singleton e Rossi²⁰, utilizando o reagente Folin-Ciocalteu. O método se baseia na redução dos ácidos

fosfomolibdico e fosfotúngstico em solução alcalina e a cor azul produzida pela redução do reagente Folin-Ciocalteu pelos fenólicos é medida espectrofotometricamente, no comprimento de onda de 765nm.

Para a quantificação foi construída a curva padrão utilizando o ácido gálico nas concentrações de 0 a 500mg/L, sendo o coeficiente de determinação $R^2 = 0,9981$, e o resultado expresso em gramas de equivalentes de ácido gálico por 100g de extrato.

As amostras de óleo de girassol contendo extrato de coentro e palmitato de ascorbila em diferentes concentrações foram analisadas empregando o método proposto pela AOCS Cd 12b-92²¹ que utiliza o equipamento Rancimat. A medida da estabilidade oxidativa se baseia na determinação da condutividade elétrica dos produtos voláteis de degradação.

A determinação foi realizada a 100°C, com fluxo de ar de 20L/h, com utilização de 3g de amostra e volume de água destilada de 60mL nos frascos contendo os eletrodos. Por este método uma curva de condutividade elétrica x tempo é automaticamente registrada com o decorrer da reação e do teste, sendo o período de indução expresso em horas.

Análise estatística

A escolha das concentrações mais eficazes dos antioxidantes foi realizada no delineamento inteiramente casualizado²², em três repetições e, os resultados submetidos à análise de variância para determinar a influência das concentrações na estabilidade dos óleos adicionados dos antioxidantes, extrato de coentro e palmitato de ascorbila, por regressão polinomial. As análises de variância e as regressões polinomiais foram obtidas por meio do programa ESTAT – Sistema para Análises Estatísticas, versão 2.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Rendimento e compostos fenólicos

O processo de extração aquoso utilizado permitiu a obtenção de compostos de elevada polaridade, em função do solvente utilizado. O rendimento obtido foi 54,8% de matéria seca.

A extração aquosa apresentou um rendimento significativo, comprovando a eficiência do solvente. Segundo Keinänen²³, a utilização de material previamente desidratado pode maximizar a eficiência do processo de extração, assim como a composição química do substrato e a técnica de extração²⁴.

O teor de compostos fenólicos encontrado foi 0,92g de equivalentes de ácido gálico por 100g de extrato, resultado semelhante ao realizado por Wangenstein, Samuelson e Malterud¹⁸, onde encontraram no extrato aquoso de folhas de coentro 1,06 g de equivalentes de ácido gálico, Melo¹⁷, que também estudou o extrato aquoso de coentro obteve 2.734mg/100 g de fenólicos totais, utilizando como padrão a catequina.

É válido ressaltar que, além dos compostos fenólicos, os vegetais contêm outros inibidores de oxidação, como ácido

ascórbico, ácidos hidroxicarboxílicos e carotenóides, que também podem ser extraídos de acordo com a polaridade do solvente aplicado⁹, e desta forma empregados em óleos vegetais.

Determinação da atividade antioxidante

Para determinar a concentração mais efetiva de cada um dos antioxidantes testados, bem como uma possível ação pró-oxidante, foram aplicadas concentrações de 0, 400, 800, 1.200, 1.600 e 2.000mg/kg de extrato de coentro e de 0, 100, 200, 300, 400 e 500mg/kg de palmitato de ascorbila no óleo de girassol e a atividade antioxidante foi medida por meio da estabilidade oxidativa, utilizando-se o Rancimat a 100°C.

As concentrações utilizadas para o extrato de coentro foram definidas em testes preliminares, sendo o limite de 2.000mg/kg estipulado devido à solubilidade do extrato no óleo. O limite de 500mg/kg para o palmitato de ascorbila foi definido por ser o máximo permitido pela legislação brasileira⁸. E de acordo com Coppen⁷, a solubilidade do palmitato de ascorbila é de 300 – 1.000mg/kg nos óleos vegetais em temperatura ambiente.

Por meio da regressão polinomial, observa-se que a estabilidade oxidativa do extrato de coentro aumentou até a concentração 1.600mg/kg diminuindo em seguida, obedecendo a equação de 2º grau: $Y = -5E-07X^2 + 0,0016X + 8,7196$, onde Y é a estabilidade oxidativa (horas) e X as concentrações (mg/kg) – Figura 1. A estabilidade oxidativa máxima foi de 9,97 horas na concentração de 1.600mg/kg. A concentração de 2.000mg/kg apresentou efeito pró-oxidante, o que indica que o extrato de coentro possui um limite máximo para estabilizar o óleo de girassol, conforme relatado por alguns autores^{29,30,31}.

Em estudo realizado por Ramalho²⁸, as concentrações de α -tocoferol adicionadas ao óleo de soja purificado apresentaram diferença significativa ($P < 0,05$) entre as concentrações de 0 e 600mg/kg, porém as concentrações 600 e 700mg/kg não diferiram entre si, assemelhando-se ao resultado obtidos.

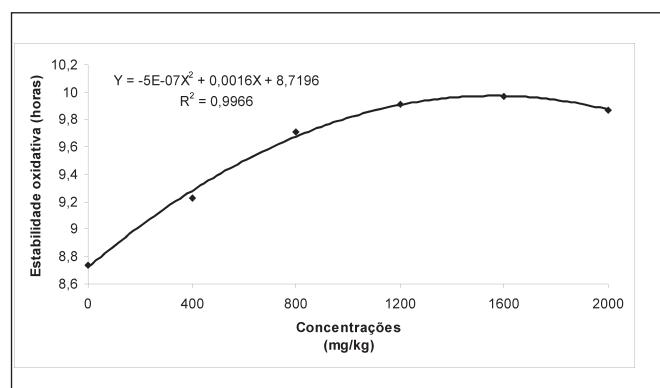


Figura 1. Estabilidade oxidativa do óleo de girassol em diferentes concentrações do extrato de coentro.

Para o palmitato de ascorbila, a estabilidade oxidativa aumentou proporcionalmente as concentrações, não demonstrando, deste modo, efeito pró-oxidante e obteve-se a seguinte equação de 1º grau: $Y = 0,046X + 10,829$, onde Y é a estabilidade oxidativa (horas) e X as concentrações (mg/kg) – Figura 2. De acordo com a análise de variância para o palmitato de ascorbila, as regressões, quadrática e cúbica, foram significativas ($P < 0,01$), porém o coeficiente de determinação da regressão linear ($R^2 = 0,9695$) foi maior que 0,9 sendo portanto, utilizada para explicar o comportamento do antioxidante palmitato de ascorbila.

Beddows, Jagait e Kelly²⁹ estudaram diferentes concentrações de palmitato de ascorbila no óleo de girassol e verificaram que quanto maior a concentração, maior foi o período de indução e, conseqüentemente, o fator de proteção.

O aumento do período de indução por meio da adição de um antioxidante tem sido relacionado à sua eficiência, que é expresso como fator de proteção ou índice antioxidante, isto é, a razão entre o período de indução de um óleo na presença do antioxidante e o período de indução do mesmo óleo na ausência do antioxidante³⁰. E quanto maior o valor do fator de proteção, melhor a atividade antioxidante³¹.

Na Tabela 1 são apresentados os fatores de proteção

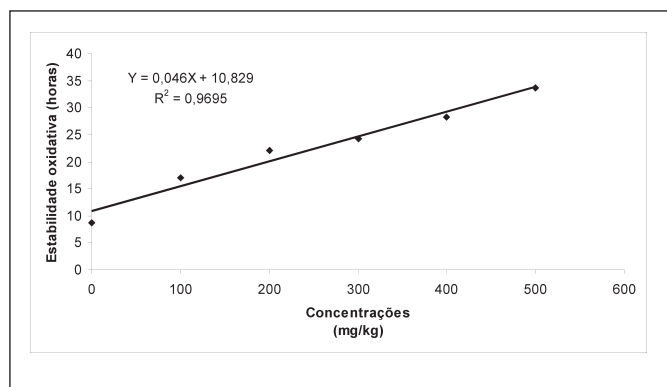


Figura 2. Estabilidade oxidativa do óleo de girassol em diferentes concentrações do palmitato de ascorbila.

Tabela 1. Fatores de proteção para os antioxidantes testados no óleo de girassol.

Concentrações mg/kg	Fator de proteção	
	Extrato de coentro	Palmitato de ascorbila
100		1,94
200		2,52
300		2,78
400	1,06	3,24
500		3,85
800	1,11	
1.200	1,13	
1.600	1,14	
2.000	1,13	

para todas as concentrações dos antioxidantes testadas, observando-se melhor eficiência do palmitato de ascorbila. É importante ressaltar que o palmitato de ascorbila utilizado neste estudo possui pureza de 10%, enquanto o extrato de coentro apresenta 0,92% de compostos fenólicos.

Com base na estabilidade oxidativa e no fator de proteção encontrado, a ordem da atividade antioxidante foi 500mg/kg PA > 400mg/kg PA > 300mg/kg PA > 200mg/kg PA > 100mg/kg PA > 1.600mg/kg EC > 2.000mg/kg EC = 1.200mg/kg EC > 800mg/kg EC > 400mg/kg EC. Portanto, os fatores de proteção mais elevados para o extrato de coentro e palmitato de ascorbila foram obtidos nas concentrações de 1.600 e 500mg/kg, respectivamente.

CONCLUSÃO

Entre as concentrações avaliadas dos antioxidantes neste estudo, 1.600mg/kg de extrato de coentro e 500mg/kg de palmitato de ascorbila promoveram maior estabilidade oxidativa ao óleo de girassol medida por meio do Rancimat.

O extrato de coentro, devido à sua atividade antioxidante, apresenta-se como uma alternativa natural para ser aplicado em óleos vegetais, pois além de não utilizar solventes tóxicos para a sua obtenção é de baixo custo.

A adição do palmitato de ascorbila ao óleo de girassol mostrou efeito positivo sobre a estabilidade oxidativa, o que o torna um antioxidante alternativo na conservação de óleos.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pela bolsa de Mestrado, processo 05/52732-9 e Auxílio à Pesquisa processo 05/59801-6.

REFERÊNCIAS

- Freitas SM. Girassol, um mercado em expansão. *Oleos Grãos*. 2000; 30-34.
- Food And Agriculture Organization. Statistical Databases. Disponível em: URL: <http://www.fao.org>. Acesso em: 30 mar. 2007.
- Turatti JM. Lipídios: aspectos funcionais e novas tendências. Campinas: ITAL; 2002. 78p.
- Gunstone FD. Fatty acid and lipid chemistry. London: Chapman & Hall; 1996. 252 p.
- Ramalho VC, Jorge N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. *Quim Nova* 2006; 29 (4): 755-60.
- Reische DW, Lillard DA, Eitenmiller RR. Antioxidants. In: Akoh CC, Min DB. Food lipids: chemistry, nutrition and biotechnology. 2. ed. New York: Marcel Dekker; 2002. p. 489-516.

7. Coppen PP. The use of antioxidants. In: Allen JC, Hamilton RJ. (Ed.). Rancidity in foods. 3. ed. Gaithersburg: Aspen Publishers; 1999. p. 84-103.
8. Associação Brasileira das Indústrias de Alimentação. Compêndio da Legislação de Alimentos: consolidação das normas e padrões de alimentos. São Paulo: ABIA, 2001. v. 1, p. 3.26.
9. Pokorný J. Are natural antioxidants better – and safer – than synthetic antioxidants? *Eur J Lipid Sci Technol* 2007; 108 (6): 629-42.
10. Nagem TJ, Albuquerque TTO, Miranda LCG. Ácidos fenólicos em cultivares de soja: ação antioxidante. *Arq Biol Tecnol* 1992; 35 (1): 129-138.
11. Tian LL, White PJ. Antioxidant of oat extract in soybean and cottonseed oils. *J Am Oil Chem Soc* 1994; 71 (10): 1079-86.
12. Pereira RB. Avaliação da atividade antioxidante de sementes de frutas cítricas [Dissertação de mestrado]. São Paulo, São Paulo: Universidade de São Paulo, 1996. 90 pp.
13. Dawes HW, Keene JB. Phenolic composition of kiwi-fruit juice. *J Agric Food Chem* 1999; 47 (6): 2398-403.
14. Ganthavorn C, Hughes JS. Inhibition of soybean oil oxidation by extracts of dry beans (*Phaseolus vulgaris*). *J Am Oil Chem Soc* 1997; 74 (3): 1025-30.
15. Melo EA, Mancini-Filho J., Guerra NB, Maciel GR. Atividade antioxidante de extratos de coentro (*Coriandrum sativum* L.) *Ciênc Tecnol Aliment* 2003; 23 (supl.): 195-9.
16. Al-Mofleh IA, Alhaider AA, Mossa JS, Al-Sohaibani MO, Rafatullah S, Qureshi S. Protection of gastric mucosal damage by *Coriandrum sativum* L. pretreatment in Wistar albino rats. *Environ Toxicol Pharmacol* 2006; 22 (1): 64-9.
17. Melo EA. Caracterização dos principais compostos antioxidantes presentes no coentro (*Coriandrum sativum* L.) [Tese de doutorado]. Pernambuco, Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 2002. 150 pp.
18. Wangensteen H, Samuelsen AB, Malterud KE. Antioxidant activity in extracts from coriander. *Food Chem* 2004; 88 (2): 293-7.
19. Soares SE. Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Rev Nutr* 2002; 15 (1): 71-81.
20. Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic* 1965; 16 (3): 144-58.
21. American Oil Chemists' Society. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society. Campaign: AOCS; 1993.
22. Banzatto DA, Kronka SN. Experimentação agrícola. 4. ed. Jaboticabal: Funep; 2006. 237 p.
23. Keinänen M. Comparison of methods for the extraction of flavonoids from birch leaves (*Betula pendula* Roth.) carried out using high-performance liquid chromatography. *J Agric Food Chem* 1993; 41 (11): 1986-1990.
24. Dapkevicius A, Venskutonis R, Beek TA, Linszen JPH. Antioxidant activity of extracts obtained by different isolation procedures from some aromatic herbs grown in Lithuania. *J Sci Food Agric* 1998; 77 (1): 140-6.
25. Evans JC, Kodali DR, Addis PB. Optimal tocopherol concentration to inhibit soybean oil oxidation. *J Am Oil Chem Soc* 2002; 79 (1): 47-51.
26. Jung MY, Min DB. Effects of α , γ , e δ tocopherols on oxidative stability of soybean oil. *J Food Sci* 1990; 55 (5): 1464-5.
27. Schuler P. Natural antioxidants exploited commercially. In: Hudson BJB. (Ed.). Food antioxidants. London: Elsevier Applied Science; 1990. p. 99-170.
28. Ramalho VC. Ação antioxidante de alfa-tocoferol e extrato de alecrim em óleo de soja submetido à termoxidação [Dissertação de mestrado]. São José do Rio Preto, São Paulo: 2005. 154 pp.
29. Beddows CG, Jagait C, Kelly MJ. Effect of ascorbyl palmitate on the preservation of α -tocopherol in sunflower oil, alone and with herbs and spices. *Food Chem* 2001; 73 (3): 255-61.
30. Mezouari S, Eichner K. Evaluation of the stability of blends of sunflower and rice bran oil. *Eur J Lipid Sci Technol* 2007; 109 (5): 531-5.
31. Elizabel BE, Bressa F, Rosa MD. Antioxidative action of maillard reactions volatiles: influence of maillard solution level. *J Am Oil Chem Soc* 1992; 69 (3): 331-4.

Conteúdo de miristicina em preparados de noz moscada (*Myristica fragans*, Houtt)

Myristicin contents in nutmeg (*Myristica fragans*, Houtt) preparations

RIALA6/1149

Guiomar Francisca TEIXEIRA¹, Jaqueline GARDA BUFFON², Ana Luiza Mucillo BAISCH¹, Eliana BADIALE FURLONG^{2*}

* Endereço para correspondência: ²Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Departamento de Química, Rua Engenheiro Alfredo Huch, 475, CEP 96 201-900, Rio Grande, RS/ Brasil, e-mail: dqmebf@furg.br

¹ Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Departamento de Ciências Fisiológicas, Rio Grande, RS/ Brasil

² Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Departamento de Química, Rio Grande, RS/ Brasil

Recebido: 01/10/2007 – Aceito para publicação: 19/02/2008

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi de estabelecer um procedimento para determinar os teores de miristicina em sementes, óleo essencial e extrato aquoso de noz-moscada, com a finalidade de avaliar as propriedades benéficas e/ou tóxicas desta semente. As amostras de noz-moscada em pó e de semente foram coletadas nas regiões sul e sudeste do Brasil. A composição das frações, umidade, proteína, extrato etéreo, cinzas foi determinada conforme a AOAC. A miristicina foi determinada nas amostras de sementes, na fração lipídica e nos respectivos extratos hidrotérmicos e na infusão por meio de cromatografia gasosa. As sementes de noz-moscada comercializadas na forma de pó apresentaram maior variabilidade em sua composição centesimal, especialmente demonstrada pelo teor de nitrogênio (6 a 12%) e extrato etéreo (15 a 36%). O procedimento proposto para determinar miristicina mostrou a melhor performance quando a determinação foi realizada no extrato hidrotérmico da fração lipídica extraída a frio, sendo a recuperação de 88%, o coeficiente de variação 9% e o limite de quantificação de 3 mg/g de amostra. Os maiores teores de miristicina foram encontrados no extrato hidroalcoólico da fração lipídica das sementes e do pó de noz-moscada, respectivamente de 37 e 22 mg/g de amostra.

Palavras-chave. *Myristica fragans*, miristicina, composição.

ABSTRACT

The objective s of this investigation was to establish a procedure for determining - miristicyn contents in nutmeg seeds, essential oil and liquid extract, in order to assess -the both benefic and toxic properties of nutmeg. The powdered nutmeg and nutmeg seeds samples of were collected from the south and southeast regions of Brazil. The moiture, protein, ether extract and ash contents were determined in accordance with AOAC. Miristicyn was measured in ground nutmeg, in lipidic fraction and its respective hydrothermal extract, and in the infusion by means of gas chromatography. The powdered nutmeg presented the highest variation in its centesimal composition, particularly demonstrated by the nitrogen contents (from 6.0 to 12.0%), and ether extract (from 15.0 to 36.0%). The proposed procedure for determining miristicyn showed the best results when it was performed in the hydrothermal extract derived from the lipidic fraction, being the recuperation rate of 88.0%, 9% of coefficient variation, and the limit quantification of sample was 3mg/g. The highest myristicin contents were found in the seed and powdered nutmeg hydroalcoholic extracts from lipidic fraction, being 37 and 22 mg/g respectively.

Key words. *Myristica fragans*, miristicyn, composition.

INTRODUÇÃO

A noz-moscada, *Myristica fragans*, Houtt, é uma planta cultivada no oriente e que foi introduzida na cultura ocidental ao final da idade média. A semente foi originariamente empregada como condimento, tradição que se mantém até o presente em preparações domésticas e industriais de alimentos doces, salgados e bebidas. A indústria farmacêutica, a exemplo da cultura popular, emprega os óleos essenciais desta semente para formulação de medicamentos para tratamento de infecções respiratórias, problemas do aparelho digestivo e aromatização de cosméticos^{1,2,3}.

A semente ralada ou o óleo de noz moscada, por seu caráter sensorial de conferir aroma agradável e sabor ligeiramente picante aos alimentos são empregados para preparo de uma série de pratos doces e salgados de consumo diário em diferentes regiões do país⁴. As características flavorizantes, o caráter conservador (antimicrobiano e antioxidante), anticancerígeno bem como o efeito tóxico da semente são atribuídos aos óleos essenciais que a constituem^{5,6,7,8,9,10,11}. A ingestão deste condimento, em quantidades não usuais, de modo acidental ou intencional, tem causado intoxicações potencialmente letais, caracterizadas por quadros excitatórios, alucinatórios e distúrbios no aparelho digestivo, como os mais frequentes^{3,7,8,9,11,12}.

Lee, Jeong e Kim¹² identificaram no óleo essencial da semente de noz moscada vários componentes que são precursores metabólicos de compostos do tipo MDA (metilenedioxianfetamina), aos quais podem ser atribuídos os efeitos psicoativos observados quando do consumo em doses elevadas. Segundo estes autores são necessárias 20 gramas de noz- moscada, para desencadear efeitos psicoativos e alucinatórios. Nesta massa estão contidos aproximadamente, 210mg de miristicina, 70mg de elemicina e 39mg de safrol, que podem ser convertidos, “in vivo”, para as formas amínicas potencialmente causadoras de dependência química semelhante a causada pelo consumo de anfetaminas. Randerath et al.⁹ demonstraram experimentalmente a correlação entre o consumo de miristicina e a formação de adutos de DNA no fígado de animais de laboratório. Lee et al.¹² e Yun et al.¹³ estudaram o metabolismo desta substância em ratos e em humanos, respectivamente, ficando demonstrado a oxidação pelo citocromo P 450 e a excreção das formas oxidativas pela urina.

Efeitos benéficos também são atribuídos a miristicina destacando-se dentre eles as ações inseticidas, fungicidas e ativador de glutatona S transferase prevenindo a formação de tumores^{3,4,6,7,8,11}. A miristicina e seus derivados, com estas propriedades funcionais controversas e demonstrado potencial psicoativo, também podem ser encontrados em outros vegetais tais como cenoura, pimenta preta e em óleos essenciais de diferentes agentes flavorizantes empregados no preparo de bebidas tipo cola e alcoólicas^{12,14}.

Considerando o uso deste condimento no preparo de diversas formulações alimentícias incluindo refrigerantes^{4,5,12,14}

associados a outras fontes naturais de miristicina seria interessante avaliar o risco/benefício do consumo crônico deste composto nas diferentes frações de noz-moscada empregadas na dieta. Para isto seria interessante dispor de uma metodologia exequível na maioria dos laboratórios que atuam avaliando a qualidade de alimentos ou seus efeitos biológicos.

Com propósito de contribuir para avaliações de propriedades benéficas e/ou tóxicas da noz-moscada nas formas usuais de seu emprego, o objetivo deste trabalho foi estabelecer procedimento para determinar os teores de miristicina em sementes, óleo essencial e extrato aquoso de noz-moscada, das formas disponíveis comercialmente para serem empregados em formulações alimentícias e chás medicinais preparados em nível doméstico e industrial.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem, preparo e caracterização físico-química das amostras.

As amostras de noz-moscada adquiridas em estabelecimentos comerciais de cidades localizadas na região sul e sudeste do país em diferentes pontos e períodos do ano foram agrupadas, por similaridade de marcas comerciais, em três lotes constituídos por sementes e três com amostras em pó.

As amostras em grãos foram trituradas em moinho de facas da Marca Tecnal durante 40 segundos a 80g e os lotes das amostras em pó foram homogeneizadas com auxílio de pás. Todos os lotes foram armazenados em frascos escuros evacuados sob nitrogênio, guardados em ambiente fresco e ao abrigo da luz até a ocasião do emprego em determinações analíticas.

A composição centesimal das amostras foi determinada conforme os procedimentos recomendados pela AOAC¹⁵. As frações analisadas foram: umidade em estufa com circulação de ar a 60°C até peso constante; cinzas em mufla a 550°C durante 3 horas; extrato etéreo obtido em sistema Soxhlet após refluxo de 6 horas com hexano; proteína pelo micrométodo de Kjeldahl empregando o fator 6,25 para conversão do percentual de nitrogênio em proteína.

Determinação de miristicina

Os diferentes lotes de amostras de noz-moscada em pó e sementes foram homogeneizados e passaram a constituir dois lotes, um homogeneizado das sementes e outro de noz-moscada em pó moída. A partir deles foram preparados os extratos hidrotérmicos, as frações lipídicas e seus respectivos extratos hidrotérmicos, e os extratos aquosos para avaliar o conteúdo de miristicina.

Estabelecimento de condições cromatográficas

Foi preparada uma solução estoque de miristicina dissolvendo 100mg de padrão, adquirido da Sigma Chemical Company, em 10mL de hexano. A solução padrão foi obtida

diluindo 1mL de solução estoque em 25mL de hexano seguido por homogeneização da mistura em banho-ultra sônico por 5 minutos.

As condições cromatográficas estabelecidas, pela injeção de 1µL de solução padrão, foram: injetor split/splitless a 250°C (abertura aos 0,75 minutos e fluxo de limpeza 0,75mL/min), detector de ionização de chama a 300°C, gás de arraste hidrogênio 1 mL/minuto, coluna cromatográfica DB-17 de 30m, com 0,25mm de diâmetro interno. A programação da coluna foi 50°C/1minuto, aumentando 8°C/minuto até 180°C totalizando 25 minutos. O tempo de retenção do padrão foi empregado para identificar a miristicina nas amostras, sendo a confirmação de tempo de retenção realizada por co-cromatografia com concentrações conhecidas de padrão.

Para construção da curva analítica foram preparadas soluções contendo 50, 100, 200, 300, 400 µL/mL de onde foram injetadas 1µL no cromatógrafo nas condições estabelecidas. Da relação concentrações de padrão injetadas e sinais analíticos (área do pico) registrados pelo software Star, versão 4.1, foi estabelecida uma equação linear.

Determinação de miristicina em extrato hidrotérmico da noz moscada

Foram pesados 15 gramas de amostra que foram submetidos à destilação por arraste a vapor em destilador tipo Clevenger, recolhendo o destilado à temperatura de 55°C. O volume a ser coletado foi padronizado pelo índice de refração variando entre 1,3400 e 1,3700, determinado em refratômetro tipo Abbé. O volume final do extrato foi aferido para 25mL.

Para determinação cromatográfica de miristicina foram tomados 5mL do extrato hidrotérmico que foi submetido a 3 partições com 10mL hexano. As frações hexânicas foram reunidas e evaporadas sob atmosfera de nitrogênio. O extrato seco foi dissolvido em 2mL de hexano sob agitação com banho ultra sônico sendo injetado 1µL em cromatógrafo gasoso nas condições descritas acima.

Determinação de miristicina em fração lipídica da semente de noz moscada

A fração lipídica das amostras de noz-moscada foi extraída a frio empregando o método de Bligh-Dyer¹⁶ (1959); cujo procedimento consistiu em: pesar 5g de amostra moída à qual foi adicionada de uma mistura de 30mL de solução metanol: clorofórmio: água (2:1:0,8). O volume de água acrescentado na mistura levou em consideração a proporção de solventes e conteúdo de umidade da amostra.

A mistura foi homogeneizada em erlenmeier com tampa por 30 minutos em agitador horizontal. Foram adicionados 7,5mL de clorofórmio e 7,5mL de água destilada seguindo-se a homogeneização por mais 30 minutos. Os sólidos foram separados por centrifugação e o sobrenadante foi submetido a três partições com 10mL de clorofórmio. As frações clorofórmicas separadas nas lavagens foram avolumadas a 50mL dos quais 10mL foram coletados e secos em cápsula de

porcelana previamente tarada em estufa com circulação de ar a 60°C. A massa obtida após a secagem foi utilizada para estimar o percentual de lipídios extraídos das amostras.

Ao restante do extrato clorofórmico foram adicionados 30mL de água e a mistura foi submetida a 3 partições com 10mL de hexano. As alíquotas da partição foram reunidas e evaporadas em frascos escuros sob atmosfera de nitrogênio. No momento da determinação cromatográfica os extratos secos foram dissolvidos em 2mL de hexano sob agitação em banho ultra sônico e 1µL foi injetado em cromatógrafo gasoso nas condições padronizadas.

Determinação de miristicina em extrato hidrotérmico da fração lipídica das sementes de noz-moscada.

O óleo extraído de 15g de amostra moída de noz-moscada pelo método de Bligh e Dyer¹⁶ foi colocado em balão próprio do destilador de Clevenger para extração hidrotérmica dos voláteis, à temperatura de 55°C. O material condensado foi coletado em frasco escuro sendo o volume coletado padronizado pelo índice de refração, entre 1,3400 e 1,3700 medido em refratômetro tipo Abbé, sendo a fração destilada pesada e o volume final aferido para 25mL.

Para determinação cromatográfica foram tomados 10mL do extrato hidrotérmico que foram submetidos a 3 partições com 10mL de hexano. As frações hexânicas foram reunidas e secas sob atmosfera de nitrogênio. Os extratos secos foram dissolvidos em 2mL de hexano sob agitação em banho ultra-sônico e 1µL injetado em cromatógrafo gasoso nas condições padronizadas.

Determinação de miristicina na fração aquosa de sementes de noz moscada

Os extratos aquosos foram obtidos considerando o preparo doméstico de chá de noz-moscada. A 10g de pó de noz moscada foram adicionados 250mL de água fervente mantendo a temperatura por 5 minutos em banho-maria fervente (aproximadamente 98°C). O extrato aquoso foi resfriado e agitado em agitador horizontal por 60 minutos em recipiente tapado, sendo depois separados por filtração em papel de filtro. Foram tomados 10mL de filtrado e efetuadas 3 partições com hexano que reunidas foram evaporadas sob nitrogênio. No momento da determinação cromatográfica o extrato seco foi dissolvido com 1mL de hexano e 1µL injetado em cromatógrafo gasoso nas condições padronizadas.

Avaliação da performance dos procedimentos

O limite de quantificação foi determinado diluindo cada preparado até que o pico observado tivesse área equivalente a do padrão de menor concentração de miristicina empregado para a obtenção da curva analítica. A recuperação do procedimento foi testada pela fortificação de alíquotas de noz-moscada moída com volume de soluções de miristicina de modo que as concentrações fossem 10; 20 e 30mg/g de amostra. Após 18 horas de secagem à temperatura ambiente (25°C) foram

observados os procedimentos descritos para cada fração analisada, respectivamente extrato hidrotérmico das sementes, fração lipídica, extrato hidrotérmico do óleo bruto e infusão. A Figura 1 apresenta o fluxograma do procedimento adotado para obtenção de cada fração estudada.

RESULTADOS

Caracterização físico-química das amostras

A ANVISA¹⁷ estabelece que noz-moscada pode ser comercializada sob a forma de pó ou sementes o que norteou a coleta de amostras dos dois tipos. Durante a coleta foi observado que não estavam disponíveis muitas marcas de noz moscada nas diferentes regiões amostradas, sendo escolhidas para comporem os lotes formados para análise 3 marcas disponíveis nas regiões amostradas na forma de pó e semente inteira.

A variabilidade de composição química de tecidos vegetais é influenciada por condições tais como solo, clima, período de coleta, armazenamento, processamento e outras variáveis bióticas e abióticas, e neste caso específico da noz-moscada estes aspectos são amplamente enfatizados pela literatura,^{1,3,4,5} o que tornou imprescindível a caracterização dos lotes formados com as marcas coletadas antes da continuidade do trabalho.

Os resultados da composição, expressos como g/100g das formas semente e pó de noz-moscada nos lotes formados com as diferentes marcas estão demonstrados na Tabela 1.

As frações umidade e extrato etéreo foram as que apresentam os maiores coeficientes de variação para a mesma marca e conseqüentemente diferiram significativamente entre as formas pó ou semente. Os resultados da determinação da matéria nitrogenada das amostras comercializadas sob a forma de pó também diferiram significativamente entre si. Na fração cinza foi verificada esta mesma tendência, ou seja, os teores

encontrados nos pós foram superiores aos das sementes inteiras. Segundo a ANVISA¹⁷ o teor de resíduo mineral fixo, em noz-moscada não deve ser superior a 3%, portanto o encontrado nos lotes analisados estão conforme a norma especificada para este quesito.

Mc Kee et al.⁶ empregaram o método de arraste a vapor, recomendado pela ASTA (Official Analytical Methods of American Spice Trade Association), para determinar o efeito da moagem sobre a composição de sementes de noz-moscada. Os valores de umidade encontrados foram em torno de 6,8g/100g, inferiores aos 8% recomendados pela US Federal Specification. Os autores atribuíram a diferença às perdas por evaporação de voláteis durante a moagem. No presente trabalho os valores obtidos foram superiores a estes valores, sugerindo que a determinação de umidade por gravimetria à baixas temperaturas (60°C) com aeração não ocasionou a evaporação de voláteis de forma marcada e nem o processo de moagem das amostras antes da determinação.

Mc Kee et al.⁶ também extraíram lipídios com acetona e refluxo tipo Soxhlet das sementes de noz-moscada e os valores obtidos variaram entre 22 e 46g/100g. Novamente a variabilidade foi atribuída ao efeito das temperaturas de moagem das amostras e à própria característica das sementes nos diferentes lotes estudados. Os resultados apresentados na Tabela 1, para extrato etéreo, apresentaram faixa de variação semelhante, sendo a exceção um lote de amostras comercializadas sob a forma de particulados, ainda que, em termos de causas de variabilidade, não se possa comparar os procedimentos adotados pelos autores e o empregado neste trabalho.

Óleos voláteis de noz-moscada

Os teores de lipídios encontrados pela extração a frio das amostras de noz-moscada em pó e em semente foram respectivamente 19g/100g (CV = 16%) e 33g/100g (CV = 13%) com índices de refração de 1,4516 (CV = 1,4%) e 1,4612 (CV = 1,5%) respectivamente. Os percentuais lipídicos encontrados foram menores que os da extração descontínua a quente (Soxhlet), mantiveram a tendência de valores menores para as amostras comercializadas sob a forma de pó, porém foram comparáveis aos teores mencionados por Mc Kee et al.⁶ e em sites sobre o tema noz-moscada e suas propriedades e usos³.

Os resultados da destilação hidrotérmica dos óleos voláteis das amostras de noz-moscada e das frações lipídicas extraídas a frio encontram-se na Tabela 2, bem como os índices de refração empregados como indicativo de uniformidade de condições de destilação e de coleta de destilado.

Os rendimentos do processo de extração hidrotérmica dos voláteis das amostras de noz-moscada em pó foram menores que os da fração lipídica, e consideravelmente inferiores aos mencionados, 4,5 e 5,6g/100g, da literatura^{1,3,6}. Isto indica que mesmo destilação sendo realizada por tempos superiores a 60 minutos o contato do vapor com o interior matriz sólida não foi suficiente para extrair os voláteis, o que foi comprovado pela constância do índice de refração observada ao se realizar a

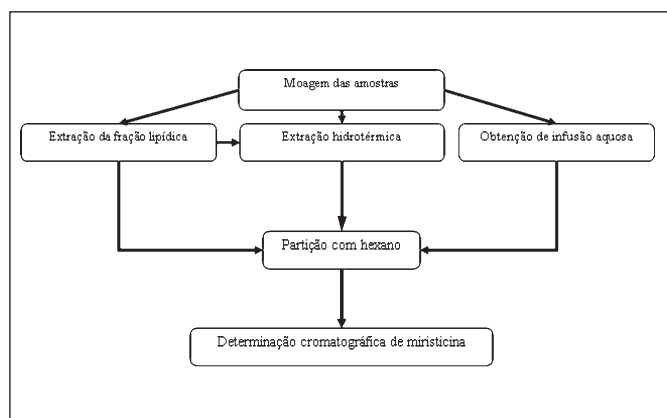


Figura 1. Fluxograma das etapas da determinação de miristicina em preparados de noz-moscada.

destilação durante um intervalo de 3 horas. As sementes comercializadas na forma de pó apresentavam rendimentos em voláteis ainda menores que os das sementes inteiras, o que pode estar também associado a perdas anteriores ao processo analítico.

Autores como Sanford e Heinz¹⁸; Soliman e Badeaa³; Hirasa e Takemasa,¹ e Tomaino et al.¹⁰ mencionam grande variabilidades no conteúdo de óleos essenciais em vegetais aromáticos empregados como condimento, decorrentes das condições de cultivo, preparo e armazenamento do material, além dos efeitos inerentes da metodologia de determinação. No caso deste trabalho, o extrato hidrotérmico da fração lipídica das sementes de noz-moscada foi o que apresentou rendimento em voláteis semelhante aos citados pela literatura^{1,3,6}.

Determinação de miristicina

Para determinar os tempos de retenção da miristicina nas condições cromatográficas adotadas foram injetadas seis repetições de padrão na concentração de 200ng/μL, sendo encontrado o tempo médio de 15,6 minutos com um coeficiente de variação de 0,6%, o que demonstra a estabilidade das condições de aquisição dos dados no equipamento. As concentrações de padrão injetadas para obtenção da curva analítica variaram entre 10 e 250ng/μL, sendo a relação concentração x sinal representada pela equação 1.

$$y = 0,31x + 0,02 \quad r = 0,99 \text{ (equação 1)}$$

Tabela 1. Composição centesimal das amostras de noz-moscada expressos em g/100g.

Lotes	umidade (CV%)	cinzas (CV%)	Proteínas (CV%)	Extrato etéreo (CV%)	outros
1	10,3 (15%) ^a	2,5 (13%) ^a	5,9 (11%) ^a	36,0 (14%) ^a	45,3
2	9,3 (17%) ^b	2,8 (7%) ^a	9,5 (6,9%) ^b	26,9 (13%) ^b	63,6
3	6,7 (9%) ^c	1,9 (11%) ^b	12,9 (9,5%) ^c	15,2 (6%) ^c	63,3
4	10,4 (12%) ^a	1,6 (8%) ^c	7,7 (5,0%) ^d	38,0 (14%) ^a	42,3
5	9,0 (15%) ^b	2,0 (7%) ^b	8,3 (6,3%) ^e	37,2 (14%) ^a	43,3
6	11,0 (16%) ^d	1,8 (9%) ^b	6,8 (6,2%) ^f	38,6 (15%) ^a	41,8

1,2,3: lotes constituídos por marcas de noz-moscada comercializadas em pó

4,5,6: lotes constituídos por marcas de noz-moscada comercializadas como sementes

Letras diferentes: diferença significativa em nível de 95%

CV% = coeficiente de variação de 6 determinações

Tabela 2. Conteúdo de óleos voláteis e índice de refração de amostras de noz moscada.

Determinações	Noz-moscada moída	Sementes de Noz-moscada
g/100g de óleo no EH	0,6 (CV= 5,3%)	1 (CV= 7,0)
$\eta^{55^\circ\text{C}}$ EH	1,3411 (CV = 1,3%)	1,3631 (CV = 1,5%)
g/100g de óleo EH da fração lipídica	3,6 (CV=7%)	8,1 (CV=5%)
$\eta^{55^\circ\text{C}}$ do óleo EH da fração lipídica	1,3623 (CV= 1,2%)	1,3717 (CV= 1,4%)

EH: extrato hidrotérmico; η : índice de refração; CV = coeficiente de variação;

Tabela 3. Características do método para determinação de miristicina em Cromatografia Gasosa em diferentes frações de noz-moscada.

Características	EH das sementes	Fração lipídica	EH do óleo bruto	Infusão
T retenção (minutos)	15,6 (CV=2,6%)	15,4 (CV=2,2%)	15,8 (CV=2,9%)	15,3 (CV=2%)
LD (ng)	10	10	10	10
LQ (mg/g am)	8	6	3	7,5
Recuperação média (%)	66	85	88	82
Repetibilidade (CV %)	16	10	9	12

T retenção: tempo de retenção; CV: coeficiente de variação; LD: limite de detecção;

LQ: limite de quantificação; EH: extrato hidrotérmico

As características do método padronizado para determinação de miristicina no extrato hidrotérmico das amostras particuladas, na fração lipídica e seu respectivo extrato hidrotérmico e na infusão estão apresentados na Tabela 3.

Os resultados das Tabelas 2 e 3 nortearam as estratégias analíticas adotadas para determinar miristicina nas frações de sementes e pó de noz-moscada. Os maiores limites de quantificação e menores níveis de recuperação e repetibilidade foram encontrados para a determinação de miristicina nas amostras de noz-moscada em pó, consistente com os menores rendimentos em óleos voláteis anteriormente salientado.

Nos cromatogramas dos extratos hidrotérmicos das sementes e de pó de noz-moscadas e de suas respectivas frações lipídicas e na infusão foram detectados seis picos, distintamente separados entre si, como pode ser verificado na Figura 2. O pico correspondente ao tempo de retenção do padrão de miristicina foi confirmado por co-cromatografia com diferentes concentrações de padrão adicionadas aos extratos. Os teores percentuais encontrados dos picos cromatográficos da miristicina correspondiam a 22%; 33%; 19% e 24% respectivamente.

Em 1981, Schenk e Damparsky¹⁹ relataram que diferentes métodos cromatográficos até então empregados permitiam identificar a presença de 14 monoterpenos, 8 sesquiterpenos, compostos insaturados e derivados de trans isômeros de álcoois insaturados. Outros autores separaram óleos essenciais de noz-moscada por cromatografia gasosa e dentre eles destacam-se Tomaino et al.¹⁰ que mencionaram a detecção 7 picos correspondentes ao α pineno, β pineno, sabineno, δ terpineno; terpinen-4-ol, safrol e miristicina que correspondia a aproximadamente 35% do total dos picos detectados. Harvey²⁰ determinou os componentes de extratos de noz-moscada em acetato de etila derivados com trimetilsilil e encontrou 11 derivados de difenilpropanoides.

Na Tabela 4 estão os resultados das determinações de miristicina nas frações das amostras coletadas neste estudo

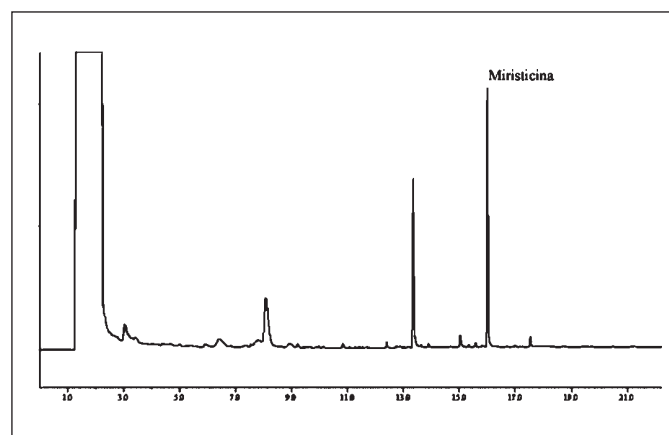


Figura 2. Cromatograma de extrato hidrotérmico de fração lipídica de noz-moscada.

separadas e quantificadas por cromatografia gasosa e as estimativas do conteúdo em grama da fração.

Os dados da Tabela 4 indicam que o emprego de óleo de noz-moscada como flavorizante de bebidas tipo cola e em outras formulações representaria o maior risco de consumo crônico de miristicina para o consumidor, comparados aos valores da fração lipídica e seus respectivos extratos hidrotérmicos. Os teores de miristicina encontrados no extrato hidrotérmico das sementes inteiras analisadas neste trabalho foram ligeiramente superiores aos mencionados por Lee et al.¹² (10mg/g amostra).

Considerando-se que a massa média de uma semente de noz moscada, usada para preparo de chás, possui em média 8g que são usados para preparo de infusão em xícara de 200mL, o consumo de todo o volume significaria uma ingestão estimada de 104mg do composto. Os valores ingeridos quando a noz-moscada é empregada para o preparo de molhos e doces como pó ou semente ralada não podem ser estimados em vista da imprecisão das medidas, mas o perfil de distribuição avaliado faz supor que o aporte não acarretaria riscos de efeitos psicoativos agudos a menos que outras fontes de miristicina fossem associadas numa refeição.

Estas estimativas sugerem que seriam interessantes estudos de efeitos crônicos da ingestão de miristicina, especialmente para os indivíduos jovens que consomem com frequência bebidas tipo cola e outros produtos flavorizados com o óleo essencial da semente.

Outro aspecto que corrobora com esta consideração foi demonstrado por Yun et al.¹³ que ao estudar o metabolismo oxidativo de enzimas microsossomais de fígado humano determinaram que 0,176 μ M de miristicina foram oxidados por minuto por μ M de enzima resultando no principal metabolito 5-alil-1-metoxi-2,3 dihidroxybenzeno, excretado pela urina. Estes autores salientam que uma série de compostos da dieta empregam esta mesma via de oxidação para excreção e que o acúmulo de miristicina pode ocorrer, em caso de efeitos competitivos resultando em transtornos psicoativos. Estes efeitos foram registrados pelo Centro de Envenenamento do Texas, entre os anos de 1998 e 2004, sendo 65% dos casos decorrentes de uso abusivo, nos demais ocorreram os sintomas

Tabela 4. Conteúdo de miristicina em amostras de noz-moscada.

Fração noz-moscada	μ g/mL de extrato	mg/g de amostra
EH particulados	12	8
EH sementes	21	14
FL particulados	27	18
FL de sementes	37,5	25
EH/FL particulados	12,4	22,4
EH/FL sementes	36,3	37,4
Infusão	4	10

EH: extrato hidrotérmico; FL: fração lipídica

típicos de intoxicação por outras substâncias tóxicas²¹. No caso das amostras estudadas neste trabalho as estimativas de risco mostram que este seria maior quando se emprega noz-moscada para preparo de infusão ou os óleos voláteis da semente.

CONCLUSÃO

As sementes de noz moscada comercializadas na forma de pó, empregadas neste trabalho, apresentam maior variabilidade em sua composição centesimal, especialmente demonstrada pelo teor de nitrogênio (6 a 13g/100g) e extrato etéreo (15 a 36 9g/100g).

O procedimento proposto para determinar miristicina mostrou a melhor performance quando a determinação é realizada no extrato hidrotérmico da fração lipídica extraída a frio, especificamente representados por 88% de recuperação, coeficiente de variação 9% e limite de quantificação de 3mg/g de amostra. No extrato hidrotérmico da fração lipídica das sementes inteiras foi detectado o maior valor, 37mg/g.

Em vista dos teores de miristicina encontrados nos preparados estudados seria recomendável que se avaliasse o efeito do consumo crônico de infusões e bebidas preparadas com noz-moscada ou seus óleos essenciais.

REFERÊNCIAS

1. Hirasa K, Takemasa M. Ciência e tecnologia de lãs especias. 1st ed. Tokio (Japan): Marcel Dekker, Inc. Editorial Acribia S.A.; 2002.
2. Vicenzi M, Vicenzi A, Silano, MC. Constituents of aromatic plants: elemicin. *Fitoterapia* 2004; 75: 615-8.
3. Wikimedia Commons. Noz moscada. [cited 2007 July 07]. Available from URL: <http://pt.wikipedia.org>
4. Morgan R. Enciclopédia das Ervas e Plantas Medicinais. São Paulo (SP): Editora Hemus; 1994.
5. McKee LH, Thompson LD, Harden MI. Effect of three grinding methods on some properties of Nutmeg. *Lebersm. Wiss u Techn.* 1993; 74: 121-5.
6. Nguetack J, Leth, V, Amvam Zotto, PH, Mathur, SB. Evaluation of five essential oils from aromatic plants of Camerom for controlling food spoilage and mycotoxin producun fungi. *Int J Food Microbiol* 2004; 94: 329-4.
7. Soliman KM, Badeaa RI. Effect of extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. *Food Chem Toxicol* 2003; 40: 1669-5.
8. Sacramento CK. Especiarias como alternativas em sistemas agroflorestais. [cited 2007 July 07]. Available from URL: <http://www.sbsaf.org.br/anais/2002/trabalhos>
9. Randerath K, Puttman KL, Randerath TH. Flavor constituents in cola drinks induce hepatic DNA adducts in adult and fetal mice. *Biochem Biophys Res* 2004; 192 (1): 61-9.
10. Tomaino A, Cimino F, Zimbalatti A, Venuti AA, De Pasquale A, Saija, A. Influence of heating on antioxidant activity and the chemical composition of some spice essential oils. *Food Chem* 2002; 40: 1669-5.
11. Choo LC, Wong SM, Liew, KY. Essential oil of nutmeg pericarp. *J. Sci Food Agric* 1999; 79: 1954-7.
12. Lee HY, Jeong TC, Jeong HK. In vitro and in vivo metabolism of myristicin in the rat. *J Chromatogr B.* 1998; 367-2.
13. Yun CH, Lee HS, Lee HY, Kim H, Kim E, Yea SS, Guengerich, P. Roles of human liver cytochrome P450 3A4 and IA2 enzymes in the oxidation of myristicin. *Toxicol Lett* 2003; 137: 133-50.
14. Hoffmann A, Heiden A, Pfannkoch E. Flavor profiling of beverages by stir bar sorptive extraction (SBSE) and thermal desorption GC/MS/PFPD, *Global Anal.* 2000; 4: 1-9
15. Association of Official Agricultural Chemists International. Official methods of analysis. Arlington; 2000.
16. Bligh EG, Dyer WJ. A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification. *Can J Biochem Phys.* 1959; 37(8): 911-7.
17. Brasil. Resolução nº 12, de 1978 da CNNPA, 1978. Dispõe sobre Especificações para condimentos. ANVISA; c2007 [atualizado 2007]. Available from: <http://www.anvisa.br>
18. Sanford KJ, Heinz DE. Effects of storage on the volatile composition of nutmeg. *Phytochem* 1971; 10: 1245-50.
19. Schenk HP, Lamparsky D. Analysis of nutmeg oil using chromatographic methods. *J Chromatogr A* 1981; 2004: 391-5.
20. Harvey DJ. Examination of the diphenylpropanoids of nutmeg as their trimethylsilyl, triethylsilyl and tri-n-propylsilyl derivatives using combined gas chromatography and mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1995; 110: 91-02.
21. Forrester MB. Nutmeg intoxication in Texas, 1998-2004. *Hum Exp Toxicol.* 2005; 24(11): 563-6.

Determinação da microbiota histamina positiva em camarão

Histamine - positive microbiota occurrence in shrimp

RIALA6/1150

Carine de Sousa ANDRADE¹, Janice Izabel DRUZIAN², Clícia Capibaribe LEITE², Celso Duarte CARVALHO FILHO², Maria da P. Spinola MIRANDA², Cláudia Souza MACÊDO³, Alaíse Gil GUIMARÃES^{2*}

*Endereço para correspondência: Rua Barão de Geremoabo, s/n, Ondina, CEP: 40170-115, Salvador, BA/Brasil, e-mail: alaise@ufba.br, tel (55)71 3283-6935.

¹ Bolsista PIBIC/CNPq

² Departamento de Análises Bromatológicas, Faculdade de Farmácia, UFBA, Salvador, BA/Brasil.

³ Departamento de Tecnologia, Departamento de Tecnologia, Colegiado de Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, BA/Brasil.

Recebido: 30/10/2007 – Aceito para publicação: 10/03/2008

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi de avaliar quantitativamente a microbiota total e as bactérias produtoras de histamina em camarões de cativeiro e de captura oriundos do comércio de Salvador-BA. Foram coletadas 40 amostras, sendo 20 de camarões provenientes de cativeiro e 20 de captura. As contagens de microrganismos mesófilos e psicotróficos e de bactérias presumivelmente histamina-positivas foram realizada em ágar Niven, seguida de procedimento de confirmação da capacidade de produção de histamina e de identificação das respectivas bactérias. As amostras de camarão de cativeiro apresentaram valor máximo de 3,74 log UFC/g para bactérias mesófilas e de 3,51 log UFC/g para psicotróficas, os quais estavam abaixo dos limites máximos estabelecidos nas especificações de qualidade de pescado (7,0 log UFC/g). Nas amostras de camarão de captura os valores máximos foram de 7,81 log UFC/g para mesófilas e de 7,49 log UFC/g para psicotróficas; esses valores excederam o limite máximo estabelecido pelos padrões, indicando elevada contaminação. Do total de amostras, 08 confirmaram a presença de bactérias produtoras de histamina (06 mesófilas e 02 psicotróficas), sendo a maioria dos microrganismos pertencente à família Enterobacteriaceae. Portanto, a presença desses microrganismos indica a ocorrência de condições higiênicas sanitárias e de temperatura insatisfatórias na comercialização de pescados.

Palavras-chave. histamina, camarão, bactérias

ABSTRACT

This study was conducted with the objective of quantitatively assessing the total microbial count and the histamine producing-bacteria in caught shrimps and in aquaculture-bred shrimps, which were sold in Salvador-Bahia. Forty samples were collected, being 50% of caught shrimps and the other twenty from aquaculture. For performing mesophilic and psychotropic microorganisms counts the Niven agar was employed. Aquaculture shrimp samples presented a maximum value of 3.74 log CFU/g of mesophilic bacteria and 3.51 log CFU/g of psychotropic microorganisms, which were below the maximum limits values established for fish quality specifications criteria. In caught shrimp samples the maximum values were 7.81 log CFU/g of mesophilic bacteria and 7.49 log CFU/g of psychotropic bacteria. Both values exceeded the maximum limit established by legislation, and these findings indicated a high rate of bacteria contamination. Histamine producing - bacteria were found in eight samples, and the most of these microorganisms belonged to Enterobacteriaceae family, which indicated the occurrence of the undesirable conditions of hygiene and temperature in shrimp trading.

Key words. histamine, shrimp, bacteria

INTRODUÇÃO

A produção e comercialização de camarão estão se expandindo em diversos países e se tornando uma das atividades mais importantes do setor pesqueiro¹. Segundo a *Food and Agriculture Organization* (FAO)², no ano de 2005, a produção mundial de camarão chegou a 6 milhões de t, sendo que a captura, proveniente do extrativismo, foi de aproximadamente 3,42 milhões de t. Em 2005 o Brasil foi o 6º exportador mundial deste crustáceo e nos três últimos anos representou cerca de 52,5% do total das exportações de pescado³.

O camarão é um produto altamente perecível devido ao seu conteúdo em proteínas, compostos nitrogenados não protéicos, aminoácidos livres e elevada atividade de água. Por ser rico em proteínas é suscetível a ação autolítica das enzimas proteolíticas musculares e/ou a deterioração microbiana^{4,5}. As enzimas proteolíticas presentes no suco gástrico e nos tecidos provocam a decomposição, propiciando a disseminação de microrganismos endógenos⁶. Além da microbiota normal, os microrganismos contaminantes podem ser incorporados durante a captura e, principalmente, na sua manipulação^{7,8}.

Os fatores intrínsecos relacionados a este produto, juntamente com a falta de condições higiênicas que vão desde a captura até o beneficiamento, somados a temperaturas inadequadas durante armazenamento, transporte e comercialização são fatores que favorecem sua deterioração^{6,7}. Além das perdas econômicas do alimento, o desenvolvimento microbiano poderá levar a produção de amins biogênicas, a exemplo, da histamina, tornando o alimento impróprio para consumo⁹.

A intoxicação alimentar por histamina é conhecida como “intoxicação escombróide”, tem sido observada após o consumo de pescado com altos teores desta amina^{10,11,12,13}. A produção de histamina é devida principalmente a um processo de descarboxilação de histidina livre pela ação da enzima exógena histidina descarboxilase^{14,15}. No entanto, é essencial destacar que o processo de descarboxilação da histidina se deve à atividade de várias espécies bacterianas presentes nos pescados, uma vez que esta enzima não está presente naturalmente nos tecidos dos mesmos^{10,14,15,16}. Verifica-se ainda, que pescado contendo níveis expressivos de histamina nem sempre evidenciam sinais aparentes de deterioração, porém seu efeito tóxico, pode causar danos à saúde do consumidor^{12,17}. Deste modo, o teor de histamina é considerado um parâmetro ou índice de qualidade de alimentos, pois infere as condições higiênicas-sanitárias dos produtos marinhos^{13,17}.

A ingestão de alimentos com níveis de histamina em concentrações acima de 100mg/100 g de alimento conferem risco à saúde pública^{17,18,19}. As propriedades psicoativas e vasoativas de algumas amins biogênicas, especialmente histamina, provocam efeitos tóxicos e farmacológicos²⁰. O processo patológico da intoxicação por histamina caracteriza-se por um período curto de incubação e duração. Os sintomas mais

freqüentes são os cardiovasculares, principalmente palpitações, urticárias, eritemas na face e região do pescoço, disfagia, podendo ocorrer choque anafilático; os gastrointestinais, que incluem dores abdominais, náuseas, vômitos, diarreia e os neurológicos com dores e inchaços relacionados as urticárias e formigamento na língua^{12,19,21}.

Observa-se que a maioria dos estudos referentes à ocorrência de histamina em camarão relata espécies de bactérias mesófilas e psicrotróficas^{22,23}. Bactérias da família Enterobacteriaceae são as mais ativas no processo de descarboxilação da histidina, destacando-se as espécies *Enterobacter* spp., *Morganella morganii*, *Proteus vulgaris*, *Hafnia alvei*, e os gêneros *Klebsiella*, *Escherichia*, *Aeromonas*, *Vibrio*, *Pseudomonas* e *Clostridium*^{10,19,23,24}.

Neste contexto, a pesquisa objetivou avaliar quantitativamente a microbiota bacteriana mesófila total, psicrotrófica e histamina positiva presentes em camarões comercializados na cidade de Salvador – BA.

MATERIAL E MÉTODOS

As amostras foram coletadas em diferentes pontos de venda da cidade de Salvador, sendo 20 provenientes de camarão de cativeiro e 20 de captura, cada uma delas com peso médio ao redor de 0,5kg.

As amostras de camarão provenientes de cativeiro encontravam-se congeladas e as de captura foram coletadas nas condições em que eram comercializadas em temperaturas que variaram de 2,0°C a 24,5°C. As amostras foram acondicionadas em caixas isotérmicas contendo gelo e levadas imediatamente ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Farmácia – UFBA, para o processamento das análises.

Para o preparo da suspensão inicial, foram pesadas 25g de cada amostra e colocadas em 225mL de água peptonada 0,1%, em seguida homogeneizadas em homogeneizador de pistão. A partir da suspensão inicial foram preparadas diluições decimais sucessivas e 1mL de cada diluição foi inoculado em placa de Petri, utilizando a técnica de “pour plate”, o meio ágar Niven¹⁹ preparado com: triptona 0,5%, extrato de levedura 0,5%, L-histidina 2,7%, HCl 0,5%, NaCl 0,5%, CaCO₃ 0,1%, ágar 2,0%, e vermelho de cresol 0,02%, com sobrecamada do mesmo meio, para a contagem de microrganismos aeróbios mesófilos e psicrotróficos e bactérias presuntivas histamina-positivas. As placas foram incubadas à temperatura de 35°C (mesófilos) e 20°C (psicrotróficos), por um período de 48 e 72 horas, respectivamente. Após o período de incubação, realizou-se a contagem total de bactérias mesófilas e psicrotróficas e das colônias típicas presuntivas histamina-positivas, caracterizadas pela presença de um halo arroxeadado, indicando a alcalinização do meio pela presença da amina^{16,19,24}. Os resultados foram expressos em log UFC/g.

Para confirmação de bactérias histamina-positivas, as colônias com halo arroxeadado foram inoculadas em tubos

contendo tubo de Durham invertido e o meio caldo Níven modificado^{19,24} preparado com: triptona 0,5%, extrato de levedura 0,5%, L-histidina 2%, NaCl 0,5%, vermelho de bromocresol 0,02%. O teste positivo foi observado pela presença de gás nos tubos de Durham e pela coloração roxa do meio.

As culturas puras obtidas a partir do inóculo do teste confirmativo de bactérias histamina-positivas foram isoladas em meio ágar Níven modificado²⁴ e, em seguida, identificadas utilizando o kit API-20E[®] Enteric Identification System (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France)^{25,26}. O kit contém 20 reações bioquímicas para identificação do isolado. Assim, cada isolado foi inoculado e incubado de acordo com as instruções do fabricante.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em referência às contagens totais de bactérias em ágar Níven, as amostras de camarão de cativeiro apresentaram, para o grupo das mesófilas, contagem variando de 1,84 log UFC/g a 3,74 log UFC/g, enquanto que no grupo das psicotróficas de <1 log UFC/g a 3,51 log UFC/g. Os valores máximos obtidos nas contagens de microrganismos mesófilos e psicotróficos em amostras de camarão de cativeiro encontram-se abaixo do limite sugerido para pescado²⁷. Constatou-se que essas amostras não apresentaram contagem de bactérias presuntivamente histamina-positivas. A ausência desses microrganismos indica que esses camarões estão sendo beneficiados e comercializados em condições de higiene e

temperatura adequadas, pois os números e tipos de microrganismos responsáveis pela produção de aminas biogênicas em pescados podem ser reduzidos e/ou inibidos com o congelamento, prolongando a vida útil do produto^{6,28}.

Para as amostras de camarão de captura houve uma variação de 4,23 log UFC/g a 7,81 log UFC/g na contagem de mesófilos e de 5,04 log UFC/g a 7,49 log UFC/g na de psicotróficos. Verificou-se na contagem de colônias presuntivamente histamina-positivas uma variação de 1,3 log UFC/g a 6,97 log UFC/g para mesófilos e de 1 log UFC/g a 6,86 log UFC/g para psicotróficos.

Estudos realizados com amostras de camarão de captura conservadas em gelo²² relataram contagens de 5 log UFC/g de bactérias mesófilas e contagens superiores de bactérias psicotróficas. Nesse mesmo trabalho, os autores observaram a presença de bactérias histamina-positivas em uma população de 2 log UFC/g. Após 14 dias de estocagem em gelo, a população microbiana aumentou para 6 log UFC/g, além da detecção de aminas biogênicas²².

A legislação brasileira²⁹ não prevê limites para a contagem em placas de bactérias aeróbias mesófilas e psicotróficas em pescado porém sabe-se que populações elevadas podem reduzir a vida útil do pescado³⁰. A "International Commission on Microbiological Specification for Foods" (ICMFS)³¹ estabelece o limite máximo de 7,0 log UFC/g para contagem padrão de placas de microrganismos aeróbios para pescado²⁷. Entretanto, alguns pesquisadores consideram crítica contagem de mesófilos acima de 6 log UFC/g em pescados, mesmo não apresentando

Tabela 1. Amostras de camarão de captura com colônias presuntivas e confirmadas quanto a produção de histamina.

Amostras	Mesófilos (35 °C)		Psicotróficos (20 °C)	
	Colônias presuntivas	Colônias confirmadas	Colônias presuntivas	Colônias confirmadas
04	+	-	+	-
05	+	-	+	-
06	-	-	+	-
07	+	-	+	+
08	+	+	+	+
19	+	+	+	+
20	+	-	+	+
21	+	+	-	-
22	+	-	-	-
23	+	-	-	-
25	+	+	-	-
26	+	+	-	-
27	+	+	-	-
28	+	-	-	-
Total/14	13	06	07	04

(+) indica presença (-) indica ausência

alterações visíveis³².

Das 20 amostras de camarão de captura, seis não apresentaram desenvolvimento de colônias presuntivas para bactérias mesofílicas e psicrotróficas. De acordo com a Tabela 1, observa-se que no grupo das bactérias mesófilas, das 14 amostras com desenvolvimento microbiano, 13(92,85%) apresentaram colônias presuntivas histamina-positivas e seis (42,85%) foram confirmadas quanto à capacidade de produção de histamina. Para o grupo das bactérias psicrotróficas, observa-se que sete amostras (50%) apresentaram colônias presuntivas histamina-positivas, e somente quatro (28,57%) confirmaram a capacidade de produção de histamina. Verifica-se na Tabela 1 que das colônias confirmadas histamina-positivas, quatro (28,57%) pertencem exclusivamente ao grupo das mesófilas, duas (14,29%) pertencem ao grupo das psicrotróficas, sendo que duas (14,29%) pertencem aos dois grupos. A confirmação de bactéria histamina-positiva relata uma deficiência na temperatura de acondicionamento das amostras de camarão de captura.

Sabe-se que a conservação de camarão e outros pescados em temperaturas elevadas por longos períodos é favorável ao desenvolvimento da microbiota endógena e dos microrganismos contaminantes^{11,33}. Com isso, a variação da temperatura de comercialização pode ter contribuído para desenvolvimento de bactérias histamina-positivas nas amostras de camarão de captura analisadas.

A presença de espécies bacterianas histamina-positivas é relatada em temperaturas de aproximadamente 20°C em pescados¹⁰ e, foi demonstrado que temperatura de estocagem de 22 °C favorece tanto a multiplicação de bactéria produtora de histamina quanto a produção dessa amina¹³.

As bactérias mesófilas e psicrotróficas produtoras de histaminas presentes em amostras de camarão de captura foram identificadas (kit API-20E®) e apresentadas na Tabela 2. Do total de 18 amostras analisadas, percebe-se que a maior proporção da microbiota mesófila identificada pertence a

família Enterobacteriaceae, abrangendo o gênero *Enterobacter*, seguida pela presença da espécie *Klebsiella oxytoca*. Com relação os microrganismos psicrotróficos identificados, a bactéria *Enterobacter cloacae* é a espécie predominante. Essa espécie foi identificada em maior proporção tanto nos isolados mesófilos quanto psicrotróficos (38,8%). Verifica-se que as espécies *Escherichia coli*, *Vibrio fluvialis* e *Aeromonas* spp. pertencem ao grupo de microrganismos psicrotróficos.

Ao contrário do estudo apresentado na literatura²², as espécies bactérias histamina-positivas *Aeromonas* sp. e *Vibrio* sp. foram detectadas em menor número, enquanto que a flora bacteriana pertencente ao gênero *Enterobacter* foi identificada em maior quantidade.

A predominância do gênero *Enterobacter* entre as bactérias produtoras de histamina observada neste estudo infere que as amostras de camarão de captura estavam sendo comercializadas de maneira inadequada, uma vez que esses microrganismos não fazem parte da sua flora normal. Alguns autores constataram^{10,13,22} que a temperatura ótima para o desenvolvimento de bactérias da família Enterobacteriaceae, incluindo *Enterobacter* spp., relacionada a produção de histamina, situa-se na faixa entre 10°C e 25°C, coincidindo com aquela encontrada quando no momento da colheita das amostras.

CONCLUSÃO

De acordo com o experimento e resultados obtidos conclui-se que as condições de beneficiamento e comercialização foram adequadas para as amostras de camarão de cativeiro, reduzindo consideravelmente o desenvolvimento de bactérias histamina-positivas.

A grande variação da temperatura de armazenamento e comercialização das amostras de camarão de captura, obtidas

Tabela 2. Bactérias produtoras de histamina isoladas em amostras de camarão de captura.

Bactérias	Grupos		Amostras	%
	Mesófilas	Psicrotróficas		
<i>Enterobacter cloacae</i>	05	02	07	38,8
<i>Klebsiella oxytoca</i>	04	-	04	22,0
<i>Enterobacter spp</i>	01	-	01	5,6
<i>Enterobacter agglomerans</i>	01	-	01	5,6
<i>Escherichia coli</i>	-	01	01	5,6
<i>Hafnia alvei</i>	01	-	01	5,6
<i>Vibrio metschnikovii</i>	01	-	01	5,6
<i>Vibrio fluvialis</i>	-	01	01	5,6
<i>Aeromonas spp</i>	-	01	01	5,6
TOTAL	13	05	18	100,0

no comércio local, justifica os altos valores de contagem total de microrganismos mesófilos, psicrotróficos e histamina positivos.

A confirmação de bactérias histamina-positivas pertencente a família Enterobacteriaceae indica a falta de boas práticas de fabricação e temperatura inadequada após a captura. Portanto, a presença do gênero *Enterobacter* comprova que as amostras de camarão de captura foram contaminadas por microrganismos não pertencentes à sua flora normal, o que pode acarretar na formação de histamina e uma possível intoxicação alimentar histamínica após o consumo.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo a pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) pelo apoio financeiro e ao CNPq pelo oferecimento de recurso na forma de bolsa.

REFERÊNCIAS

1. Csavas I. The impact of aquaculture on the shrimp industry. *Infofish Intl* 1993; 1: 42-8.
2. FAO. Departamento de pesca y acuicultura. El estado mundial de La pesca y La acuicultura, 2006. [Acesso em 2008 Abril 20]. Disponível em: <http://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0699s/a0699s.pdf>.
3. Rieche FC, Moraes JEMM. In: III Simpósio internacional sobre a indústria do camarão cultivado, realizado em paralelo à realização da terceira edição da Feira Nacional do Camarão (FENACAM), Natal, 2006. *Rev BNDES* 2006; 13 (26): 309-14.
4. Braga SP, Gomes FSP, Silva CA, Souza SEL, Sousa CP. In: Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 17 Fortaleza, 2000. Resumos. Fortaleza: SBCTA, 2000; 1: 4.80.
5. Siqueira AAZC. Efeitos da irradiação e refrigeração na qualidade e no valor nutritivo da tilápia (*Oreochromis niloticus*) [Dissertação]. Piracicaba, São Paulo: Universidade de São Paulo, 2001. 137 pp.
6. Brandão WN. Beneficiamento de camarões marinhos. Rede de tecnologia da Bahia – RETEC/BA, 2007. 25 pp.
7. Jay JM. Frutos do Mar. In: JAY J.M. editor. *Microbiologia de Alimentos* 6ª ed. Porto Alegre: Arned, 2005, p.119-28.
8. Braga SP, Gomes FSP, Silva CA, Souza SEL, Sousa CP. In: Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 17 Fortaleza, 2000. Resumos. Fortaleza: SBCTA, 2000; 1: 4.80.
9. Soccol MCH. Otimização da vida útil da tilápia cultivada (*Oreochromis niloticus*), minimamente processada e armazenada sob refrigeração [Dissertação]. Piracicaba, São Paulo: Universidade de São Paulo, 2002. 124 pp.
10. Emborg J, Laursen BG, Dalgaard P. Significant histamine formation in tuna (*Thunnus albacores*) at 2°C – effect of vacuum- and modified atmosphere-packaging on psychrotolerant bacteria. *Int J Food Microbiol* 2005; 101: 263-79.
11. Yokoyama VA. Qualidade do camarão da espécie *Xiphopenaeus kroyeri* mediante a ação dos agentes antimelanócitos [Dissertação]. Piracicaba, São Paulo: Universidade de São Paulo, 2007. 124 pp.
12. Silveira NFAS. Bactérias produtoras de histamina e potencial para sua formação em peixes de origem fluvial ou lacustre [Tese]. Campinas, São Paulo: Universidade Estadual de Campinas, 2002. 69 pp.
13. Du WX, Lin CM, Phu AT, Cornell JA, Marshall MR, Wei CI. Development of biogenic amines in yellowfin tuna (*Thunnus albacares*): effect of storage and correlation with decarboxylase-positive bacterial flora. *Food Microbiology and Safety* 2002; 16 (1): 292-301.
14. Lehane L, Olley J. Histamine fish poisoning revisited. *Int J Food Microbiol* 2000; 58: 1-37.
15. Tsai Y-H, Chang S-C, Kung H-F. Histamine contents and histamine-forming bacteria in natto products in Taiwan. *Food Control* 2007; 18: 1026-30.
16. Kung H-F, Lee Y-H, Chang S-C, Wei C-I, Tsai Y-H. Histamine contents and histamine-forming bacteria in sufu products in Taiwan. *Food Control* 2007; 18: 381-86.
17. Moreno RB, Torres EFS, Neto JMM. Avaliação dos níveis de histamina em sardinhas frescas comercializadas na CEAGESP de São Paulo. *REVENET DTA*, 2003; 3(5):151-9.
18. Germano PML, Miguel O, Germano MIS. Prevenção e controle das toxinfecções de origem alimentar. *Hig aliment* 1993; 7 (27): 6-11.
19. Silveira NFA, Leitão MFF, Baldini VLS, Teixeira Filho AR. Bactérias produtoras de histamina e potencial para sua formação em peixes de origem fluvial ou lacustre. *Braz J Food Technol* 2001; 4: 19-25.
20. Mourão JOB, Pires KMS, Sousa MB, Viana FA, Saker-Sampaio S. Estudo preliminar sobre a ocorrência de histamina em macroalgas marinhas do Estado do Ceará. *Ciênc Agron* 2007; 38 (1): 64-8.
21. Lima AS, Glória MBA. Aminas bioativas em alimentos. *Bol SBCTA* 1999; 33 (1): 70-9.
22. Lakshmanan R, Shakila RJ, Jeyasekaran G. Survival of amine-forming bacteria during the ice storage of fish and shrimp. *Food Microbiol* 2002; 19: 617-25.
23. Tsai Y-H, Lin C-Y, Chang S-C, Chen H-C, Kung H-F; Wei C-I et al. Occurrence of histamine and histamine-forming bacteria in salted mackerel in Taiwan. *Food Microbiol* 2005; 22: 461-7.
24. Mavromatis P, Quantick P. Modification of Niven's Medium for enumeration of histamine-forming bacteria and discussion of the parameters associated with its use. *J Food Prot* 2002; 65 (3): 546-51.
25. Menozzi MG, Eigner U, Covan S, Rossi S, Somenzi P, Dettori G, Chezzi C, Fahr A-M. Two-center collaborative evaluation of performance of the BD phoenix automated microbiology system for identification and antimicrobial susceptibility testing of gram-negative bacteria. *J Clin Microbiol* 2006; 44 (11): 4085-94.

26. Nucera DM, Maddox CW, Hoiem-Dalen P, Weigel RM. Comparison of API 20E and invA PCR for identification of *Salmonella* enteric isolates from swine production units. *J Clin Microbiol* 2006; 44 (9): 3388-90.
27. Agnese AP, Oliveira VM, Silva PPO, Oliveira GA. Contagem de bactérias heterotróficas aeróbias mesófilas e enumeração de coliformes totais e fecais, em peixes frescos comercializados no município de Seropédica - RJ. *Hig Aliment* 2001; 15 (88): 67-70.
28. Dalgaard P, Madsen HL, Samieian N, Emborg J. Biogenic amine formation and microbial spoilage in chilled garfish (*Belone belone belone*) – effect of modified atmosphere packaging and previous frozen storage. *J Appl Microbiol* 2006; 101(1): 80-95.
29. Brasil. Portaria nº 185 de 1997 da Secretaria de Defesa Agropecuária. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal – RIISPOA. Pescados e Derivados. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 13 mai.1997. C.7, seção 1.
30. Kirschink, P. G.; Viegas, E. M. M. Alterações na qualidade do camarão de água doce *Macrobrachium rosebergii* durante estocagem em gelo. *Ciênc Tecnol Aliment* 2004; 24(3):407-12.
31. International Commission On Microbiological Specification for Foods. Pescados y productos derivados. In:_____. Microorganismos de los alimentos. Ecología microbiana de los productos alimentares. Zaragoza: Acribia, 1998; 121-66.
32. Lira GM, Pereira WD, Athayde AH. Avaliação da qualidade de peixes comercializados na cidade de Maceió - AL. *Hig Aliment* 2001; 15 (84): 67-74.
33. Economou V, Brett MM, Papadopoulou C, Frillingos S, Nichols T. Changes in histamine and microbiological analyses in fresh and frozen tuna muscle during temperature abuse. *Food Addit Contam* 2007; 24(8):820-32.

Composição química de farinhas pré-cozidas por extrusão elaboradas com arroz e café torrado

Chemical composition of pre-cooked flours produced by extrusion of rice and roasted coffee blending

RIALA6/1151

Reginaldo Ferreira da SILVA^{1*}, José Luis Ramirez ASCHERI², Rosemary Gualberto Fonseca Alvarenga PEREIRA²

* Endereço para correspondência: ¹ EMATER-ACRE, CEP 69912-600, Av. Nações Unidas, 2.604, Estação Experimental, Cx. Postal 462, Rio Branco, AC/Brasil, e-mail: reginaldo.alimentos@gmail.com

² EMBRAPA-RJ, CEP 23020-470, Rio de Janeiro, RJ/Brasil, e-mail: ascheri@ctaa.embrapa.br

² UFLA-MG, Departamento de Ciência dos Alimentos, CEP 37200-000, Lavras, MG/Brasil, e-mail: rosegfa@ufla.br

Recebido: 15/10/2007 – Aceito para publicação: 11/03/2008

RESUMO

O Brasil é considerado o maior produtor de café do mundo. Entretanto, o maior volume de exportação desse produto é feito na forma de grãos verde (*commodity*), que proporciona a oportunidade aos países importadores de industrializar e comercializar o café na forma de outros produtos manufaturados de alto valor agregado. Este trabalho teve por objetivo relatar o estudo realizado sobre procedimento alternativo para a diversificação e agregação de valor ao produto café no Brasil. Por meio da extrusão termoplástica de mistura de farinha de arroz e pó de café em diferentes concentrações percentuais (15 e 20%) obteve-se a farinha pré-cozida. Nas misturas contendo 15 e 20% de pó de café, os teores de proteínas, carboidratos, fibra alimentar e valor calórico foram maiores do que da farinha de arroz pura. Foi observado um aumento de concentração da maioria dos aminoácidos contidos na mistura pré-cozida, o que pode contribuir no aumento dos teores de aminoácidos totais. Apesar do ligeiro incremento nos teores de lisina nas farinhas pré-cozidas, quando estes foram comparados com a proteína de referência citada pela FAO/WHO, os valores encontrados eram ainda limitantes para suprir as necessidades diárias requeridas pelas crianças nas idades de 2 a 5 anos e de 10 a 12 anos. Na farinha pré-cozida a treonina apresentou valor limitante apenas para crianças de 2 a 5 anos de idade.

Palavras-chave. arroz, café, composição química, aminoácidos.

ABSTRACT

Brazil is considered the most important coffee producer in the world. However, the largest volume of exportation of this product is made in a form of green grains (*commodity*), which give the opportunity to the importer countries to industrialize and to commercialize the coffee in a form of other manufactured products of highly increased value. The objective of the present study was to propose an alternative procedure in order to introduce diversity and to increase the market price to the coffee product. Blending different percentages (15 and 20%) of roasted coffee powder and rice flour, and processing them by extrusion cooking resulted in a pre-cooked flour. The proximal composition of 15% and 20% blending pre-cooked flour showed protein, carbohydrates, dietary fiber and caloric values which were higher than those found in rice flour. For this reason, probably the concentration increase of the majority of contained amino acids as lysine in the pre-cooked composite flours might confer an increase in the total amino acids rate. Although, when this product was compared with a reference protein recommended by FAO/WHO, the values were still restricted to supply the daily necessities required by children from 2 to 5 years old and from 10 to 12 years old; on the other hand, the treonin amino acid rate in pre-cooked flour showed to be limiting for children from 2 to 5 years old only.

Key words. rice, coffee, chemical composition, amino acid.

INTRODUÇÃO

Os frutos de cafeeiro das duas espécies de café mais cultivadas no mundo, do gênero *Coffea*, conhecidas como arábica e robusta, apresentam diferenças tanto na composição química quanto no comportamento de seus componentes durante o processo de torração¹. Os componentes químicos e os respectivos teores dados em porcentagens de matéria seca para o grão de café verde das duas espécies estão distribuídos da seguinte forma: cafeína, 0,9 a 1,2%; lipídios, 12 a 18%; ácidos clorogênicos 5,5 a 8,0%; oligossacarídeos, 6 a 8%; polissacarídeos, 50 a 55% e aminoácidos, 2%, respectivamente.

O consumo de café no mundo está associado principalmente à satisfação dos consumidores em relação aos atributos sensoriais da bebida resultante da combinação balanceada de sabores e aromas, que se tornam perceptíveis apenas com o processo de torração dos grãos. Entretanto, quanto maior o tempo e a temperatura de torrefação dos grãos, maior serão as perdas dos constituintes químicos, principalmente carboidratos, proteínas e aminoácidos².

Cafés torrados e moídos de diferentes procedências comerciais foram analisados. Além da presença de minerais e aminoácidos foi observado uma variação significativa nas concentrações média dos dados em g/100g de amostra dos seguintes constituintes físico-químicos: umidade, 5,2 a 9,63; proteínas, 13,76 a 17,69; lipídios, 6,93 a 11,12; carboidratos, 62,67 a 71,96; cinzas, 4,56 a 4,96; e fibra bruta, 14,60 a 21,48³.

O café é um dos poucos produtos que, mediante um processo de torração severa, produz uma vitamina importante para o metabolismo humano, a niacina. Durante a torrefação, a trigonelina sofre desmetilação para formar a niacina, em quantidades próximas a 20 mg 100g⁻¹ de café torrado⁴.

A maior importância do café como alimento nutracêutico é atribuído à presença dos compostos fenólicos por sua reconhecida característica antioxidante *in vitro*, sendo os mais conhecidos e importantes os ácidos clorogênicos (ACG), os quais se apresentam em maior quantidade no café⁵.

O café é um alimento complexo, e sua composição pode ser afetada por muitos fatores entre eles a torrefação, o *blend* e o preparo da bebida. Cafés comerciais que apresentam forte coloração escura indicam alto grau de torração e, conseqüentemente, menores teores de trigonelina e ácidos clorogênicos por serem mais susceptíveis ao aquecimento⁵.

Por outro lado nos últimos 10 anos o arroz em forma de quirera, considerado de qualidade inferior, tem sido utilizado como matéria-prima para a elaboração de vários alimentos que podem ser desenvolvidos através do processo de extrusão, como constituinte principal ou ingrediente em formulações na elaboração de novos produtos, prontos semi-prontos, entre outros para o consumo humano e animal⁶. Devido a uma série de fatores durante o beneficiamento, perde-se cerca de 20% da produção em forma de grãos quebrados: canjicão, canjica e quirera (equivalente a 1,3 milhões de ton/ano). Entre as principais causas para estas perdas, tem-se a origem do material

a ser beneficiado, isto é, se é procedente de sistemas de cultivo sob irrigação ou de sequeiro, bem como a variedade e o tipo. Outros fatores são o ajuste e tipo de máquinas usado no beneficiamento. Os grãos quebrados e quirera possuem um baixo valor de mercado e pequena parte deles é transformada em produtos de alto valor agregado. Entretanto, apresenta o mesmo valor nutricional que os grãos inteiros.

De acordo com Mendonça⁷, a composição nutricional da quirera de arroz em g/100g de amostra é a seguinte: 9,81 de proteínas; 0,62 de lipídeos; 0,78 de fibras; 88,05 de carboidratos; 0,78% de cinzas e 397,02 Kcal. O arroz também apresenta características especiais que devem ser mais bem aproveitadas. Por exemplo, não é um alimento alergênico; existem variedades com ampla faixa de teor de amilose, o que permite a seleção de acordo com a finalidade; não é tóxico para portadores de doença celíaca (podendo ser utilizado como substituto do trigo na elaboração de produtos sem glúten); o pequeno tamanho dos grânulos de amido apresenta textura extremamente suave com o cozimento e sabor brando⁸; contém baixos níveis de sódio e alta proporção de amidos facilmente digeríveis⁹.

A extrusão por sua vez é um processo contínuo, no qual a matéria-prima é forçada através de um sistema de compressão, em condições de mistura e aquecimento, pressão e fricção que levam à gelatinização do amido, à desnaturação de proteínas e à ruptura de ligações de hidrogênios¹⁰ que resulta na formatação dos alimentos.

Nesse sentido, vários trabalhos têm sido realizados utilizando o processo de extrusão e a farinha de arroz para promover a formulação de alimentos mais saudáveis, rico em fibras e outros componentes que o caracterizam como alimento funcional ou nutracêutico, além das possibilidades de diversificação de novos produtos que atendam às atuais necessidades dos consumidores principalmente em relação à saúde. Como exemplos mais recentes desses produtos, podemos citar as farinhas mistas pré-gelatinizadas de arroz com casca de jaboticaba¹¹; farinha instantânea à base de amaranto e quirera de arroz⁷ macarrão pré-cozido à base de quinoa integral e arroz¹², farinha pré-cozida de milho e soja¹³ farinhas instantâneas elaboradas à base de milho, caseína e extrato de leveduras¹⁴, mingaus de arroz com casca de soja¹⁵, entre outros.

O objetivo deste trabalho foi determinar a composição química e o perfil de aminoácidos de misturas extrusadas de arroz com pó de café para avaliar seu valor nutricional e possibilidades de uso na elaboração de derivados para alimentação humana.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

As matérias-primas utilizadas para a realização do presente estudo foram: quirera de arroz branco (*Oryza sativa*, L.) 10 sacos de 5 quilos retirados aleatoriamente do mesmo lote, perfazendo um total de 50kg e café torrado e moído (*Coffea*

arábica L.) 20 pacotes de 500 gramas cada, também do mesmo lote, obtido por torra tradicional segundo especificação do fabricante, totalizando 10kg. Toda a matéria-prima utilizada neste trabalho foi adquirida no comércio de Campo Grande (Rio de Janeiro - RJ), em março de 2006.

Preparo das farinhas pré-cozidas

Após o processo de extrusão das misturas de arroz com pó de café, os extrusados foram secos por 15 horas em estufa a 50°C e moídos em peneira de 0,5mm. As amostras que apresentaram os melhores parâmetros tecnológicos de índice de absorção e solubilidade em água, submetidos aos seguintes parâmetros de processamento: **Tratamento 1** (Umidade= 16%; Temperatura da última zona de aquecimento= 180°C e Percentual de pó de café na mistura= 20%); e **Tratamento T2** (Umidade= 15%; Temperatura da última zona de aquecimento= 160°C e Percentual de pó de café na mistura= 15%), foram as escolhidas. Para fins comparativos das misturas pré-cozidas, utilizaram-se dados de composição centesimal e perfil de aminoácidos de quífera de arroz e pó de café citados na literatura.

Métodos

Análises químicas das misturas pré-cozidas de farinha de arroz com pó de café por extrusão termoplástica.

As análises de composição química foram realizadas em triplicatas nos Laboratórios de Análises Física e Química da Embrapa Agroindústria de Alimentos – RJ, segundo as normas oficiais. As seguintes análises foram feitas:

Lipídeos

O extrato etéreo foi determinado utilizando-se o extrator Soxhlet, segundo a metodologia da Association of Official Analytical Chemists – AOAC¹⁶, método 945.38. Por esse método, o teor de lipídeo foi obtido por meio da extração com solvente orgânico, éter de petróleo, seguido da remoção, por evaporação, do solvente.

Proteínas

O teor de nitrogênio total da amostra foi determinado pelo procedimento do Kjeldahl tradicional, segundo a metodologia da AACC¹⁷, método 46-13. Para o cálculo da proteína bruta, multiplicou-se o fator nitrogênio (N) por 6,25 para as farinhas de arroz e para o café torrado e moído.

Cinzas

As cinzas foram determinadas por incineração do material em mufla a 550°C, segundo a metodologia da AOAC¹⁶, método 923.03, e representam o teor total de substâncias inorgânicas presentes na amostra.

Fibras

O teor de fibra bruta foi determinado de acordo com o procedimento descrito pela AOAC¹⁶, método 978.10.

Carboidratos

Foram determinados pela diferença entre a massa seca total (100%) e a soma das porcentagens determinadas de proteína, extrato etéreo, cinzas e fibras.

Valor calórico

O valor calórico foi calculado usando os fatores de conversão de Atwater de 4kcal/100g para carboidratos e proteínas e 9kcal/100g para lipídeos segundo Anderson et al¹⁸.

Perfil de aminoácidos

O perfil de aminoácidos foi determinado em aparelho marca DIONEX, modelo DX 300, após hidrólise ácida. Para a hidrólise pesou-se, em triplicata, quantidade de amostra contendo aproximadamente 25mg de proteína, a qual foi processada seguindo as recomendações gerais de Spackman et al¹⁹.

Análise estatística

Para a obtenção de dados da composição química e perfil de aminoácidos aproximados, foram feitas análises de variância (ANOVA), com posterior comparação das diferenças entre as médias pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade, utilizando o programa estatístico SISVAR²⁰.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Composição centesimal

Os resultados das análises da composição química das misturas extrusadas de arroz com o pó de café, tratamentos com 15% e 20% de pó de café na mistura respectivamente (T1_{15%}) e (T2_{20%}) e de valores da composição centesimal da quífera de arroz e do pó de café citados na literatura para fins comparativos estão apresentados na Tabela 1. Os valores médios dos teores de cada variável analisada foram expressos em g/100g de amostra.

Na Tabela 1, observa-se que nas farinhas mistas extrusadas de arroz com pó de café os constituintes químicos, lipídios, cinzas, carboidratos e valor calórico não apresentaram diferenças significativas entre si para os dois tratamentos. A literatura cita um teor médio de lipídeos para o pó de café variando de 6,93 a 11,12g/100g de amostras. Entretanto, os teores de lipídeos presentes nas farinhas pré-cozidas, com 0,80 e 1,0g/100g de amostra apresentaram-se baixos, quando comparados com os teores de lipídeos citados na literatura para pó de café de diferentes procedências comerciais³. Esta diferença pode ser atribuída à degradação dos óleos durante o processo de extrusão, bem como a menor quantidade de pó de café misturado com a farinha de arroz.

Os teores de cinzas das farinhas extrusadas apresentaram valores próximos entre si, não sendo observado a influência da maior quantidade de cinzas citados para o pó de café na literatura.

A quantidade de carboidratos no pó de café varia entre 62,67 a 71,96g/100g de amostra³, e para a quirera de arroz, em média 88,05g/100g de amostra⁷. Observa-se, no entanto, que apesar dos elevados teores de carboidratos citado para o pó de café e a quirera de arroz, houve uma ligeira redução nos teores dos carboidratos das farinhas extrusadas. Esse fato pode ser atribuído à redução da quantidade de farinha de arroz utilizada na mistura com café, bem como, à participação de determinados carboidratos nas reações de Maillard ou caramelização, que contribuem para a formação das características sensoriais de cor, aroma e sabor dos alimentos à base de amido ou carboidratos²¹.

O teor médio de proteína bruta do pó de café varia de 13,76 a 17,69g/100 de amostra³, antes da extrusão, superior ao citado para a quirera de arroz com 9,81g/100g de amostra⁷. O percentual de pó de café (15 e 20%) extrusado na mistura com a quirera de arroz contribuiu para um ligeiro acréscimo deste constituinte nas farinhas mistas extrusadas o que resultou numa diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre os dois tratamentos. Extrusando farinha de arroz com soja integral e quirera de arroz com casca de jabuticaba em diferentes proporções, Maia et al¹⁵ e Ascheri et al¹¹, também observaram aumento significativo nos teores de proteína bruta.

Geralmente tem-se observado que as farinhas cozidas por extrusão à base de arroz são boas fontes energéticas, porém pobres em fibras. Entende-se por fibra alimentar a parte remanescente da porção comestível, ou de carboidratos análogos que são resistentes à digestão e a absorção no intestino delgado humano, com fermentação completa ou parcial no intestino grosso²². A fibra alimentar inclui polissacarídeos, oligossacarídeos, lignina e outras substâncias associadas. Dreher²³, cita que a fibra alimentar promove efeitos fisiológicos benéficos ao ser humano, como laxativo, atenuação do

colesterol sanguíneo e/ou da glicose sanguínea. Segundo Fischer et al²⁴ as duas maiores frações que constituem os polissacarídeos não celulósicos presentes no grão de café, galactomananos e arabinogalactomananos são insolúveis em água.

Observa-se, na Tabela 2, que as farinhas mistas extrusadas apresentaram aumento significativo nas quantidades de fibras totais com 2,30 a 3,0g/100g de amostra, quando comparado com a quirera de arroz pura que apresenta somente 0,78g/100g de amostra. Se levar em consideração que o maior percentual na mistura foi de quirera de arroz com 75 e 80% na mistura com o pó de café, para os dois tratamentos respectivamente, verifica-se que os percentuais de 15 e 20% de pó de café adicionado na mistura foram os responsáveis pelo incremento nos teores de fibra das farinhas pré-cozidas. De acordo com Dreher²³, alimentos que apresentam teor de fibras entre 2 a 3% pode ser considerado boa fonte de fibra alimentar. Segundo o regulamento técnico do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento referente à informação nutricional complementar (Portaria nº 27), o alimento sólido pode ser considerado como fonte de fibra alimentar quando apresentar 3g/100g de amostra e, para alimentos líquidos, 1,5g/100mL; ambos devem ser considerados em base integral. Entretanto, alimentos que apresentarem o dobro desse conteúdo podem ser considerados de elevado teor de fibras²⁵.

Os valores calóricos das farinhas pré-cozidas, com 373,32 e 373,80kcal/100g, apresentaram-se menores em comparação com os valores observados na literatura para quirera de arroz e pó de café, com 397,02 e 419,08kcal/100g, respectivamente. Esta diferença pode ser atribuída principalmente à diminuição dos valores de proteínas, carboidrato e lipídeos presentes nas farinhas extrusadas em comparação as suas matérias-primas, já que o cálculo para se obter a referência do valor calórico de um

Tabela 1. Resultados da análise de composição centesimal realizada nas misturas pré-cozidas de farinha de arroz com pó de café (15% e 20%) expressos em (g/100g) de amostra e de valores citados na literatura para quirera de arroz e café torrado e moido.

Composição em (g/100g) ¹	Misturas extrusadas de quirera de arroz com pó de café		Valores reportados na literatura em g/100g de amostra	
	T1 _{15%}	T2 _{20%}	Quirera de arroz ⁷	Pó de café comercial ³
Lipídeos	0,80 ± 0,6 a	1,00 ± 0,3 a	0,62	6,93 a 11,12
Proteína bruta	10,22 ± 0,3 b	11,50 ± 0,4 a	9,81	13,76 a 17,69
Carboidratos totais*	81,00 ± 0,5 a	80,22 ± 0,5 a	88,05	62,67 a 71,96
Cinzas	1,04 ± 0,8 a	1,27 ± 0,01 a	0,78	4,56 a 4,96
Fibras totais	2,30 ± 0,1 b	3,0 ± 0,02 a	0,78	14,60 a 21,48
Valor calórico (Kcal)**	373,32 ± 0,2 a	373,80 ± 0,5 a	397,02	419,08

¹ Média de três (3) determinações ± o desvio padrão. *Obtidos por diferença (100-proteína-lipídeos-cinzas-fibra bruta); **Valor calórico em Cal/100g; (T1 – Tratamento 1 (U=16%; T= 180°C; M= 20%); T2 – Tratamento 2 (U=15%; T= 160°C; M= 15%)^(7,3).

Dados citados na literatura para fins comparativos. Letras minúsculas iguais na linha não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

alimento leva em consideração o teor destes três constituintes químicos.

A atual legislação que regulamenta os novos Valores Diários de Referências para efeito de rotulagem de alimentos preconiza valor calórico total diário de 2.000kcal, sendo distribuído da seguinte forma: carboidratos – 300g/dia, devendo corresponder a 60% do valor calórico total diário recomendado; proteínas – 75g/dia, correspondendo a 15% do valor calórico total diário recomendado; e fibra alimentar - 22g/dia²⁶. Com base nas recomendações regulamentadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA pode-se dizer que os alimentos elaborados à base das farinhas pré-cozidas de arroz com pó de café podem contribuir para uma alimentação mais saudável.

Perfil de aminoácidos das farinhas mistas extrusadas de quirera de arroz com pó de café e de valores citados na literatura para ambas as matérias-primas.

Os teores de aminoácidos das misturas pré-cozidas de pó de café com arroz foram expressos em g/100g de amostra e estão apresentados na Tabela 2, sendo comparado com valores citados na literatura para ambas as matérias-primas, bem como, com valores de referência internacional.

O adequado tratamento térmico favorece o aumento do valor nutricional de produtos alimentícios devido à desnaturação de proteínas, além de melhorar as características sensoriais como sabor, cor, textura e aparência, inativar enzimas, fatores antinutricionais e microrganismos.

Observa-se, na Tabela 2, que a mistura pré-cozida do pó de café com a farinha de arroz apresentou um aumento significativo nos teores da maioria dos aminoácidos quando comparados com os valores citados para as matérias-primas individuais, o que contribuiu para elevar os teores de aminoácidos totais.

Quando se comparam o teor dos aminoácidos totais presentes no pó de café e na farinha de arroz crua, a diferença é ainda maior. Entretanto, apesar do ligeiro incremento nos teores de lisina nas farinhas pré-cozidas, os valores encontrados ainda apresentam-se limitantes, quando comparados com uma proteína de referência citada pela FAO/WHO²⁷, para suprir as necessidades diárias requeridas pelo organismo de crianças na idade de 2 a 5 anos e 10 a 12 anos. Entretanto, para adultos o valor se apresenta superior aos recomendados. A treonina apresenta-se limitante apenas para indivíduos com idade entre 2 e 5 anos.

Tabela 2 Perfil de aminoácidos das farinhas mistas extrusadas de quirera de arroz com pó de café em comparação com o padrão sugerido pela FAO/WHO²⁷ para crianças em idade pré-escolar, idade de 10 a 12 anos e adultos em g/100g da amostra em base seca.

Aminoácidos*	Misturas pré-cozidas de arroz com pó de café		**Valores citados na literatura em g/100g de amostra		Valores de referência internacional FAO/WHO
	T1 _{15%}	T2 _{20%}	Pó de café ²⁸	Quirera de arroz ⁷	
Ac. Aspártico	7,82 a	7,50 b	4,8	7,8	-
Ac. Glutâmico	15,0 b	15,5 a	9,46	18,5	-
Serina	4,5 a	3,8 b	0,79	3,4	-
Histidina	2,5 a	3,0 b	1,9	1,8 ¹	1,9
Glicina	4,4 a	4,9 b	3,05	1,7	-
Treonina	2,8 ¹ a	3,0 ¹ a	1,14 ¹	2,7 ¹	3,4
Alanina	5,1 b	5,6 a	2,92	4,0	-
Arginina	8,8 a	8,1 b	1,40	4,2	-
Tirosina	4,8 a	5,4 a	2,66	3,3	-
Cistina	ND	ND	ND	1,3	-
Valina	5,1 b	5,5 a	3,5	3,7	3,5
Metionina	ND	ND	ND	1,1	-
Fenilalanina	5,0 b	5,5 a	3,36	3,3	-
Isoleucina	3,7 a	4,0 a	2,6 ¹	2,8	2,8
Leucina	7,4 b	8,2 a	5,5 ¹	5,7	6,6
Lisina	4,0 ¹ a	3,6 ¹ a	3,9 ¹	1,7 ¹	5,8
Prolina	6,1 a	6,4 a	3,75	0,6	-
Aminoácidos totais	87,02 B	90 A	50,68	67,6	-

*Media de três (3) determinações; ¹Aminoácidos limitante. (ND)= não determinado. **Dados citados na literatura para fins comparativos. Letras minúsculas e maiúsculas iguais na linha não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Apesar de se tratar de um produto elaborado em condições de processamento que envolve alta temperatura e pressão, e sabendo-se que alguns aminoácidos são altamente reativos, principalmente a lisina, sugere-se que houve efeito complementar mútuo entre o pó de café e a farinha de arroz após o pré-cozimento, contribuindo, assim, para a melhoria do valor nutricional de ambas as farinhas pré-cozidas.

Segundo Sgarbiere²⁹ o valor nutricional dos alimentos, como digestibilidade, biodisponibilidade de aminoácidos e valor biológico, é melhorado pela desnaturação de proteínas.

Alvim¹⁴, trabalhando com a extrusão da mistura de farinha à base de milho, caseína e derivados de levedura em diferentes concentrações, observaram deficiência nos valores de lisina e treonina em alguns tipos de farinhas obtidas em seu experimento em relação aos padrões internacionais. Mendonça⁷ obteve farinha instantânea a partir da mistura de amaranto integral e quirera de arroz. O autor não observou deficiência de lisina e treonina nas farinhas instantâneas obtidas da mistura destes alimentos. Porém, observou valor limitante de lisina, treonina e histidina na quirera de arroz, não sendo verificada nenhuma deficiência nos aminoácidos da farinha de quinoa integral.

No presente estudo observou-se deficiência nos teores de aminoácidos do pó de café citados na literatura em comparação com os padrões da FAO/WHO²⁷ para treonina, isoleucina, leucina e lisina. Para a farinha de arroz a maior deficiência foi observada para o aminoácido lisina. A metionina e a cisteína, considerados aminoácidos essenciais, não foram determinadas nas farinhas pré-cozidas, por isso não foi possível fazer nenhuma consideração sobre estes constituintes.

CONCLUSÕES

As farinhas pré-cozidas apresentaram melhores valores nutricionais, principalmente em relação ao teor de proteínas brutas e fibras totais, quando comparadas com a farinha de quirera de arroz, podendo contribuir para uma alimentação mais saudável;

Os aminoácidos presentes no pó de café apresentaram deficiência em comparação com os padrões da FAO/WHO para treonina, isoleucina, leucina e lisina;

Para a farinha de arroz a maior deficiência foi observada para o aminoácido lisina;

A mistura pré-cozida da farinha de arroz com o pó de café apresentou um ligeiro aumento nos teores da maioria dos aminoácidos, o que contribuiu para elevar os teores de aminoácidos totais;

Os teores de carboidratos totais nas farinhas pré-cozidas não apresentaram diferenças significativas entre seus valores, entretanto diminuíram quando comparadas com os teores observados na quirera de arroz.

AGRADECIMENTOS

À Embrapa Agroindústria de Alimentos Rio de Janeiro, por permitir a realização deste trabalho e pela receptividade durante o tempo em que permaneci na empresa.

À SEATER-ACRE, na pessoa do Ex-Secretário Marcos Inácio Fernandes por minha liberação para realização do Doutorado.

REFERÊNCIAS

1. Clarke RJ, MACRAE R. Coffee. Essex: Elsevier Science Publishers, 1985. v.1. 306p.
2. Illy A, Viani R. Espresso coffee: the chemistry of quality. San Diego, 1995. 253p.
3. Lago RCA, Antoniassi R, Freitas SC. Composição centesimal e de aminoácidos de café verde, torrado e de borra de café solúvel. Industrialização e Qualidade do Café. In: Simpósio de pesquisa dos cafés do Brasil, 2, 2002, Vitória. Anais... Porto Velho: EMBRAPA, 2002. (4): 1136-9.
4. Trugo LC. HPLC in Coffee Analysis. University of Reading, 1984a. 196 p. [Thesis PhD]. England.
5. Monteiro MC, Trugo LC. Determinação de compostos bioativos em amostras comerciais de café torrado. *Quím Nova* 2005;28(4): 637-41.
6. Ascheri JLR. Efeito das variáveis de extrusão nas características físicas e químicas de produtos intermediários (half-products). São Paulo 1994. 128p. [Tese de Doutorado. Ciência e Tecnologia de Alimentos - Universidade Estadual de Campinas].
7. Mendonça XMFD. A extrusão termoplástica no desenvolvimento de produtos derivados de amaranto. Rio de Janeiro, 2005. 211p [Tese de Doutorado. Escola Química – Universidade Federal do Rio de Janeiro].
8. Polanco I, Molina M, Pietro G, Carraco S, Lama R. Dieta y enfermedad celíaca. *Rev Alimen* 1995;(264)33: 91-3.
9. Torres RL, Gonzáles RJ, Sánchez HD, Osella CA, Torres MAG. Comportamiento de variedades de arroz em la elaboración de pan sin glúten. *Arch Latin Nutri* 1999; 9(2): 162-5.
10. Thakur S, Saxena DC. Formulation of extruded snack food gum based cerel-pulse blend) optimization of ingredients levels using response surface methodology. *Leben Wissenschaft+Technologie* 2000; 33: 354-61.
11. Ascheri DPR, Andrade CT, Carvalho CWP, Ascheri JLR. Obtenção de farinhas mistas pré-gelatinizadas a partir de arroz e bagaço de jabuticaba: Efeito das variáveis de extrusão nas propriedades de pasta. *B. CEPPA* 2006;24(1): 115-44.
12. Borges JT, Ascheri JLR, Ascheri DPR, Nascimento REN, Freitas AS. Propriedades de cozimento e caracterização físico-química de macarrão pré-cozido à base de farinha integral de quinoa (*Chenopodium quinoa*, Willd) e de farinha de arroz (*Oryza sativa*), polido por extrusão termoplástica. *B. CEPPA* 2003;(21)2: 303-22.

13. Fernandes MS, Wang SH, Ascheri JLR, Oliveira MF, Costa SAJ. Efeito da temperatura de extrusão na absorção de água, solubilidade e dispersibilidade da farinha pré-cozida de milho-soja (70:30). *Ciênc Tecnol Aliment* 2003;23(2): 234-9.
14. Alvim ID. Efeito da extrusão termoplástica sobre as propriedades funcionais e nutricionais de farinhas à base de milho, caseína e derivados de levedura. Campinas, 2001. 104 p. [Dissertação de Mestrado em Ciência da Nutrição - Universidade Estadual de Campinas].
15. Maia LH, Wang SH, Ascheri JLR, Cabral LC, Fernandes MS. Viscosidade de pasta, absorção de água e índice de solubilidade em água dos mingaus desidratados de arroz e soja. *Ciênc Tecnol Aliment* 1999;(19)3: 391-6.
16. Association of Official Analytical Chemists. *Methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. 17th edition. Washington DC, 2000.
17. American Association of Cereal Chemists, *Approved methods of the American Association of Cereal Chemists*. 9. ed. St. Paul, 1995. 2v.
18. Anderson LA, Dibble MV, Turkki PR, Mitchell HS, Rynbergen HJ. *Nutrição*. Rio de Janeiro: Guanabara, 1988. Cap. 10, p. 179-87.
19. Spackman DC, Stein WH, Moore S. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of aminoacids. *Anal Biochem* 1958;(30): 1190-1206.
20. Ferreira DF. Programa Sisvar.exe: sistema de análise de variância. Versão 3.04. Lavras: UFLA, 2000.
21. Bobbio PA, Bobbio FO. *Química do processamento de alimentos*. 3º ed. São Paulo: Livraria Varela, p. 90, 2001.
22. Camire ME. The definition of dietary fiber. *Cereal Foods World*, St. Paul, (46)3: 112-124, Mar. 2001.
23. Dreher ML. Food industry perspective: functional properties and food uses of dietary fiber, In: Kritchevsky D, Bonfield C. (Ed). *Dietary fiber in health & disease*. Minnesota: Eagan Press., 467-74. 1995.
24. Fischer M, Reimanns S, Trovato V, Redgwell RJ. Polysaccharides of green Arabica and Robusta Coffee beans. *Carbohydrate Research*, Oxford, (330)1: 93-101, Jan. 2001.
25. Brasil. Leis, Decretos, etc. Portaria n. 27 de 1998 da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil, poder Executivo*, Brasília – DF, 13 de jan. 1998. Adota o Regulamento técnico referente à informação nutricional complementar. [Acesso em 2007 Out 10]. Disponível em: <<http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=97>>.
26. Brasil. Leis, Decretos, etc. Resolução n. 360, de 2003 da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. *Diário da República Federativa do Brasil, poder Executivo*, Brasília – DF, 26 de dezembro de 2003. Aprova o Regulamento Técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados, tornando obrigatória a rotulagem nutricional. [Acesso em 2007 Out]. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=9059&word=>>>.
27. Food and Agriculture Organization of the United Nations/ World Health Organization. *Protein quality evaluation: report of joint FAO/WHO expert consultation*. Rome, 1991.
28. Silva RF. *Extrusão termoplástica de farinha de arroz com café torrado e moído e sua utilização em produtos de panificação*. Minas Gerais, 2006. 166p. [Tese de Doutorado em Ciência dos Alimentos – Universidade Federal de Lavras].
29. Sgarbieri VC. *Proteínas em alimentos protéicos: propriedades-degradações-modificações*. São Paulo, Livraria Varela, p. 517, 1996.

Estudo comparativo da expressão de carboidratos no sistema ovo-granuloma hepático na esquistossomose humana e experimental

Comparative study on carbohydrate expression in hepatic egg-granuloma system in human and experimental schistosomiasis

RIALA6/1152

Mariana Tavares GUIMARÃES^{1*}, Mario Ribeiro de MELO-JUNIOR^{1,2}, Rodrigo Bacelar da COSTA SILVA¹, Carmelita Bezerra de Lima CAVALCANTE¹, Eduardo Isidoro Carneiro BELTRÃO^{1,3}

*Endereço para correspondência: Universidade Federal de Pernambuco, Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, LIKA, Av. Moraes Rêgo s/n, Campus Universitário, CEP 50670-910, Recife, PE/ Brasil.

Fone/Fax: (081) 3271-8484 / 3271-8485 e-mail: mariormj@gmail.com

¹Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami - LIKA/ Universidade Federal de Pernambuco UFPE, Recife, PE/ Brasil.

²Associação Caruaruense de Ensino Superior - ASCES;

³Departamento de Bioquímica - CCB/ Universidade Federal de Pernambuco UFPE, Recife, PE/ Brasil.

Recebido: 19/11/2007 – Aceito para publicação: 17/03/2008

RESUMO

Em virtude das lesões granulomatosas em animais e humanos aparentemente demonstrarem as mesmas alterações histológicas, poucos dados existem sobre as alterações patobioquímicas relacionadas aos carboidratos expressos pelos tecidos parasitados pelo *S. mansoni*. Neste trabalho, os resultados indicam que todas as lectinas testadas evidenciaram padrões de marcação diferenciados no tegumento do ovo do parasita e no granuloma periovular. A lectina WGA (Wheat germ agglutinin) apresentou uma intensa marcação do sistema ovo-granuloma (SOG) na esquistossomose experimental, enquanto que nas amostras teciduais humanas a WGA, LTA (*Lotus tetragonolobus* agglutinin) e PNA (Peanut agglutinin) marcaram apenas o ovo de *S. mansoni*. A lectina UEA-I (*Ulex europaeus* agglutinin) marcou de forma incipiente e inespecífica o SOG; por outro lado, a LTA marcou preferencialmente os anéis de fibrose do granuloma hepático em humanos. Houve intensa marcação da WGA no SOG e no ovo de *S. mansoni*, enquanto que a PNA marcou apenas o ovo do parasita, o qual indica a presença de resíduos de n-acetil-glucosamina e galactose, respectivamente. As lectinas WGA, PNA e Con A (Concanavalin agglutinin) falharam na distinção de tipos celulares encontrados no granuloma tanto experimental como humano. Conclui-se que a análise histoquímica com o uso de lectinas é uma ferramenta útil na investigação de alterações bioquímicas específicas que caracterizam a esquistossomose humana e experimental.

Palavras-chave. lectinas, histoquímica, granuloma, esquistossomose.

ABSTRACT

Some granulomatous lesions in animals and in humans show the same histological pattern. However, there is no complete information on patho-biochemical alterations related to carbohydrate expression in *Shistosoma mansoni*-infected tissues. In the present study, it was shown that all tested lectins presented distinct staining patterns on both parasite egg-tegment and peri-ovular granuloma. The wheat germ agglutinin (WGA) lectin showed an intense staining on egg-granuloma system (EGS) in the experimental schistosomiasis, whereas the WGA, *Lotus tetragonolobus* agglutinin (LTA) and peanut agglutinin (PNA) lectins stained only the *S. mansoni* egg in human patients material. The *Ulex europaeus* I agglutinin (UEA-I) showed a weak and nonspecific staining pattern on EGS in both human and experimental models. On the other hand, the LTA lectin only stained the fibrosis ring of human hepatic granuloma. The intense staining pattern on both EGS and *S. mansoni* egg by WGA, and the solely *S. mansoni* egg staining by PNA lectin indicated the presence of n-acetil-glycosamine and galactose moieties, respectively. WGA, PNA, and Concanavalin agglutinin (Con A) failed to discriminate the cells type found in granuloma. In conclusion, lectin using-histochemical analysis is an important tool for investigating the specific biochemical alterations in experimental and human schistosomiasis.

Key words. lectin, schistosomiasis, granuloma, histochemistry.

INTRODUÇÃO

No Brasil, a esquistossomose foi detectada em 19 das 27 unidades federadas e o número estimado de portadores de esquistossomose no país é de 2,5 milhões, com aproximadamente 26 milhões de habitantes expostos ao risco, segundo pesquisa da Fundação Nacional de Saúde¹.

A Esquistossomose é uma doença granulomatosa crônica onde as lesões inflamatórias são imunorreguladas por substâncias secretadas pelos ovos do parasita nos tecidos do hospedeiro induzindo o surgimento das principais manifestações patológicas da doença².

O granuloma é uma reação inflamatória crônica focal caracterizado por uma coleção de células do sistema fagocítico-monocitário com ou sem a adição de outros tipos celulares³. As células do sistema fagocítico-monocitário são organizadas e compactadas e células epitelióides predominam uma das formas de granuloma⁴.

O tegumento dos ovos de *Schistosoma mansoni* tem uma estrutura complexa ancorada em um citoesqueleto externo rico em carboidratos com características extremamente dinâmicas permitindo diversas interações entre o parasita e o hospedeiro^{5,6}.

Lectinas são glicoproteínas, de origem não-imunológica, que se ligam especificamente a carboidratos reconhecendo carboidratos livres ou conjugados nas superfícies celulares através de sítios específicos de ligação⁷.

Devido ao fato das lectinas geralmente apresentarem alta especificidade para determinados carboidratos, elas são utilizadas como instrumentos de apoio ao diagnóstico microbiológico⁸ e no monitoramento dos ciclos de desenvolvimento de parasitas⁹. Evidências a partir da utilização da histoquímica com lectinas indicam a presença de glicoconjugados na membrana superficial do *Schistosoma* nos vários estágios de vida (ovo, esquistossômulo e verme adulto)¹⁰. Mesmo assim, muitas das mudanças patobioquímicas que ocorrem nas populações celulares de órgãos como o fígado e o intestino durante a infecção por *S. mansoni*, ainda são desconhecidas¹¹ e pouca atenção tem sido dada à fisiologia do ovo deste parasita enquanto residente nos granulomas hepáticos¹².

Mudanças qualitativas e quantitativas nos glicoconjugados das membranas celulares tornam-se altamente significativas no desenvolvimento e evolução de muitas doenças¹³, e as lectinas podem ser ferramentas úteis no diagnóstico e prognóstico¹⁴. As interações lectina-carboidratos tem sido aplicadas no entendimento de muitas parasitoses, desde os estágios iniciais da infecção até o desencadeamento da resposta imune dos hospedeiros. Devido ao fato das lesões granulomatosas em animais e humanos aparentemente demonstrarem o mesmo padrão de alterações, pouco ainda se sabe sobre a ativação do sistema imune a partir de antígenos carboidratados expressos pelo *S. mansoni*.

Desta forma, este estudo visou comparar os padrões de marcação de diferentes lectinas do sistema ovo-granuloma

hepático, durante a esquistossomíase humana e experimental em camundongos.

MATERIAL E MÉTODOS

Modelo experimental

Oito camundongos albinos foram expostos a uma cepa local (São Lourenço da Mata) de *S. mansoni* isolada da *Biomphalaria glabrata*. A infecção dos animais foi efetuada através da imersão da cauda (2h), em solução aquosa contendo uma suspensão com 50 cercárias previamente contadas com auxílio de lupa estereoscópica (Olympus SZ60). Aos 40 dias após a infecção foram perfundidos e sacrificados, sendo imediatamente removidos os fragmentos de fígado, totalizando 40 seções.

Modelo Humano

Foram selecionados 10 blocos de parafina dos arquivos do Setor de Patologia do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) provenientes de pacientes portadores de esquistossomose mansônica na forma hepatoesplênica, submetidos a biópsia hepática de rotina no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco.

Preparação Histológica

Foram selecionados três fragmentos do fígado (0,8x0,8x0,8cm), preservados em solução de formalina a 10% tamponada. Em seguida, foram submetidos à rotina histológica e incluídos em parafina a fim de se obter cortes histológicos (4µm) que posteriormente foram corados pela hematoxilina-eosina, sendo examinados em microscópio óptico.

Histoquímica com Lectinas

Os novos cortes teciduais montados em lâminas histológicas albuminizadas foram tratados com solução de tripsina (0,1%) a 37°C, em seguida expostas a uma solução de metanol-H₂O₂ e incubados a 4°C por 2 horas com lectinas (*Ulex europaeus* agglutinin, UEA-I; *Tetragonolobus purpureae* agglutinin, LTA; Peanut agglutinin, PNA; Wheat Germ agglutinin, WGA; e Concanavalin A, Con A (Sigma-USA) conjugadas a peroxidase e numa concentração final de 100 µg/ml. A reação da peroxidase foi visualizada após incubação em PBS contendo diaminobenzidina (DAB) e H₂O₂. As lâminas foram contracoradas com Hematoxilina (Sigma-USA) e analisadas através de microscopia óptica. Para controle da marcação, as lectinas foram inibidas utilizando metil-±-D-manose para Con A, D-galactose para PNA, N-acetil-glicosamina para WGA e ±-frutose para UEA-I e LTA (Sigma-USA).

Análise de Imagem

A análise morfométrica foi executada quantificando-se as intensidades de marcação das lectinas no Sistema Ovo-Granuloma (5 campos aleatórios por lâmina de cada animal) e

ovos de *S. mansoni* (3 campos aleatórios por lâmina) presentes no parênquima hepático, através de um sistema computacional de análise de imagens (softwares TCI-Pro® e OPTIMAS 6.1®). As medidas obtidas foram submetidas ao estudo estatístico utilizando-se os Testes t de student e de Tukey, com $p < 0,05$, através do software PRISMA 3.0®. O controle da marcação com as lectinas inibidas foi utilizado para minimizar as distorções nos valores para presença de células não-marcadas. Utilizamos um Fator de Correção (FC) de acordo com a equação $FC = a/A$, onde “a” significa o valor da área relativa e “A” o valor da área total medida¹⁵.

RESULTADOS

A lectina Con A (Figura 1) não marcou nenhuma estrutura do sistema ovo-granuloma (SOG) hepático, tanto nos casos humanos como nos experimentais, enquanto a UEA-I (Figura 2) apenas marcou a cutícula do ovo nos casos de esquistossomose humana.

As demais lectinas reconheceram os glicoconjugados no tegumento do ovo e as células que compõem o granuloma. A lectina WGA apresentou o mais intenso padrão de marcação, em comparação com a PNA e LTA (Tabela 1).

A WGA marcou uniforme e intensamente o SOG, mostrando que esta lectina, dentre as testadas, é a melhor para caracterizar o granuloma periovular esquistossomótico em humanos.

A LTA reconhece preferencialmente o anel de fibrose dos granulomas e o parênquima hepático adjacente no modelo experimental. A WGA e PNA indicaram a presença de N-acetilglucosamina e galactose, respectivamente, nos ovos de *S. mansoni* contidos no SOG de camundongos.

A marcação celular distinta das lectinas WGA e PNA nos granulomas de ambos os modelos estudados (humano e

animal), indicam a participação de diferentes tipos de sacarídeos durante o desenvolvimento da esquistossomose e subsequente formação do SOG.

A análise digital comparativa dos padrões de marcação das lectinas (área medida = $12234 \mu\text{m}^2$) indicou um maior número de células marcadas no SOG em camundongos, marcados pela LTA (259 ± 35) e PNA (238 ± 22), quando comparado aos casos humanos marcados pela WGA (123 ± 14).

DISCUSSÃO

A partir da caracterização de carboidratos superficiais de parasitas durante o desenvolvimento da infecção^{10,16} e através do mapeamento dos açúcares residuais expostos na superfície dos ovos de *S. mansoni*^{10,17}, foram obtidas importantes informações sobre a resposta imune do hospedeiro contra esse tipo de parasita¹⁸.

Para este tipo de mapeamento dos carboidratos celulares, diversos trabalhos têm sugerido a utilização de lectinas vegetais como ferramentas de fácil aplicabilidade e de alta sensibilidade nos resultados de estudos em tecidos humanos ou animais experimentais^{19,20}.

Todo o sistema ovo-granuloma foi especificamente evidenciado pela marcação das lectinas WGA em humanos e pela LTA nos animais experimentais. Uma possível explicação para o padrão de marcação é que estas lectinas reconheceram glicoconjugados presentes na superfície do ovo^{6,9} ou o ovo secretaria glicoproteínas que se difundem e/ou ancoram-se nos tecidos que constituem o granuloma, caracterizando a expressão desses glicoconjugados¹².

A reação granulomatosa em torno do ovo de *S. mansoni*, controlada em sua formação e regulação por mecanismos imunocelulares, tem sido estudada profundamente não se conhecendo a totalidade dos antígenos e dos mecanismos

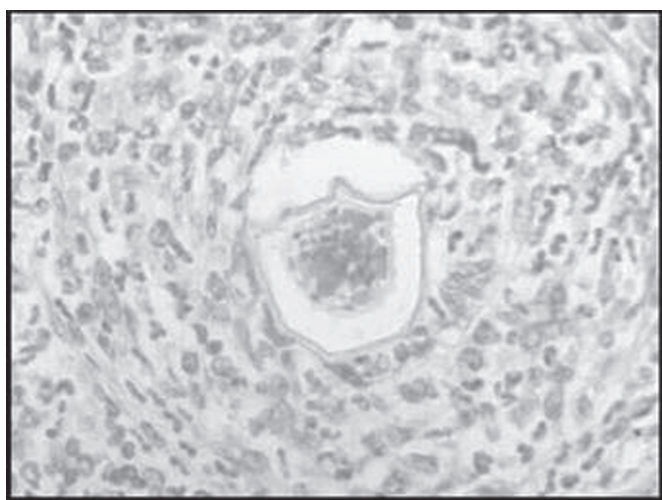


Figura 1. Sistema Ovo-Granuloma esquistossomótico hepático em humano, demonstrando ausência de reatividade para lectina Con A. (Magnificação, 100x).

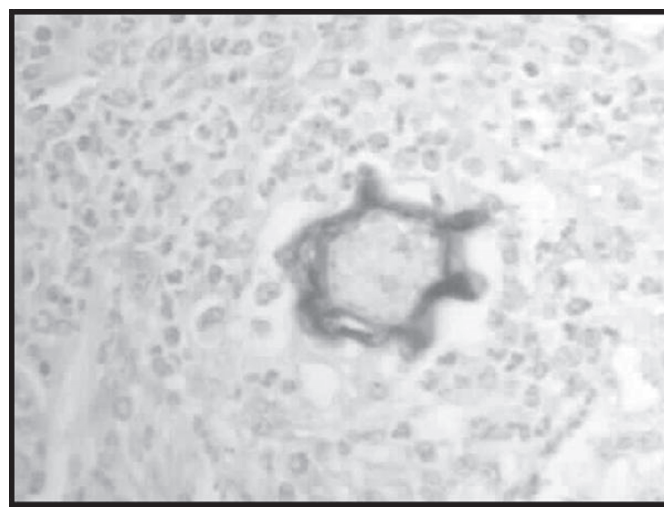


Figura 2. A lectina UEA-1 exibiu forte marcação apenas no tegumento do ovo de Schistosoma em modelo humano. (Magnificação, 100x).

Tabela 1. Reatividade de marcação de lectinas no Sistema Ovo-Granuloma e Ovo-Schistosoma no parênquima hepático em hospedeiro humano e experimental.

LECTINA	MODELO		Experimental	
	Humano SOG ¹	OS ²	SOG	OS
WGA	+	+	-	+
UEA-I	-	+	-	-
LTA	-	-	+	-
PNA	-	-	-	+
Con A	-	-	-	-

1: Sistema Ovo-Granuloma; 2: Ovo-Schistosoma

envolvidos na indução, formação e regulação da reação granulomatosa²¹.

Evidências experimentais sugerem que os açúcares da superfície das células estão envolvidos no processo de reconhecimento entre parasita e hospedeiro, e esta mudança na ordem dos carboidratos superficiais induz modificações estruturais e funcionais nas células do hospedeiro⁵.

As interações lectina-carboidratos tem sido aplicadas no entendimento de muitas parasitoses, desde os estágios iniciais da infecção até o desencadeamento da resposta imune dos hospedeiros. Devido ao fato das lesões granulomatosas em animais e humanos aparentemente demonstrarem o mesmo padrão de alterações, pouco ainda se sabe sobre a ativação do sistema imune a partir de antígenos carboidratados expressos pelo parasita de *S. mansoni*.

Estudos moleculares e imunohistoquímicos têm investigado o desenvolvimento do ovo de esquistossoma e o papel das suas secreções na iniciação, desenvolvimento e ativação da resposta imune do organismo do hospedeiro¹². Entretanto, pouco ainda se sabe sobre o papel dos carboidratos expressos durante o desenvolvimento de parasitoses como a esquistossomose⁵.

De modo geral, nas infecções causadas por helmintos, a patogenicidade está diretamente relacionada com a carga parasitária. Em se tratando do *S. mansoni*, a carga parasitária é de importância relativa, uma vez que a patogênese das infecções por este trematódeo está também relacionada com a presença de reações granulomatosas em torno dos ovos do parasita e, portanto, com a capacidade de oviposição dos vermes²¹.

Em indivíduos infectados, a infecção granulomatosa crônica e a fibrose podem causar hepato-esplenomegalia, hipertensão portal e o desenvolvimento de varizes esofageanas, que podem romper e causar hemorragia fatal, a principal causa de morte por esta doença^{22,23}.

Especificamente, no que se refere à fibrose, neste trabalho foi evidenciado que a lectina LTA reconhece preferencialmente o anel de fibrose dos granulomas no modelo experimental e não nos casos humanos estudados, o que

demonstra alterações específicas na resolução dos granulomas nesses dois modelos investigados.

Pode-se, então, concluir que a histoquímica com lectinas demonstrou ser uma ferramenta útil na investigação do sistema ovo-granuloma hepático, ajudando a elucidar alterações patobioquímicas específicas na expressão de carboidratos durante a evolução da esquistossomose experimental e humana.

REFERÊNCIAS

1. Fundação Nacional de Saúde (FUNASA) – Esquistossomose Mansônica [cited 2003 Oct 13]. Disponível em: <http://www.funasa.gov.br/pub/GBDIP/Gbdip024.pdf>
2. Cass CL, Johnson JR, Califf LL, Xu T, Hernandez HJ, Stadecker MJ, Yates JR, Williams DL. Proteomic analysis of Schistosoma mansoni egg secretions. *Mol Biochem Parasitol* 2007; (2)155: 84-93.
3. Baptista AP, Andrade ZA. Angiogenesis and schistosomal granuloma formation. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005; 100(2): 183-5.
4. Amorim FMS. Patomorfologia e estudo estereológico do jejuno, na primoinfecção crônica de camundongos desnutridos, infectados com Schistosoma mansoni. [Dissertação de Mestrado]. Recife, Pernambuco: Universidade Federal de Pernambuco, 2000.
5. Abdul-Salam F, Mansour MH. Identification and localization of a schistosome-associated fucosyllactose determinant expressed by Fasciola hepática. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2000; 23(2): 99-111.
6. Robijn ML, Koeleman CA, Hokke CH, Deelder AM. Schistosoma mansoni eggs excrete specific free oligosaccharides that are detectable in the urine of the human host. *Mol Biochem Parasitol* 2007; 151(2): 162-72.
7. Melo-Junior MR, Telles AMS, Albuquerque FEB, Beltrão EIC. Altered lectin-binding sites in normal colon and ulcerative colitis. *J Bras Patol Med Lab* 2004; 40(2): 123-125.

8. Melo-Junior MR, Araujo-Filho JLS, Patu VJR, Beltrão EIC, Carvalho Jr LB. Digital image analysis of skin neoplasms evaluated by lectin histochemistry: potential marker to biochemical alterations and tumour differential diagnosis. *J Bras Patol Med Lab*. 2006; 42(6): 455-60.
9. Jacobson RL, Doyle RJ. Lectin-parasite interactions (Review). *Parasitol Today* 1996; 12(2): 55-61.
10. Astoul CH, Peumans WJ, Van Damme EJ, Rouge P. Accessibility of the high-mannose glycans of glycoprotein gp120 from human immunodeficiency virus type 1 probed by in vitro interaction with mannose-binding lectins. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 274 (2): 455-60.
11. Muller E, Rosa Brunet L, Fried B, Sherma J. Effects on the neutral lipid contents of the liver, ileum and serum during experimental schistosomiasis. *Int J Parasitol* 2001; 31(3): 285-7.
12. Aston PD, Harrop R, Shah B, Wilson RA. The schistosome egg: development and secretion. *Parasitology* 2001; 122(Pt3): 329-39.
13. Takano Y, Teranishi Y, Terashima S, Motoki R, Kawaguchi T. Lymph node metastasis-related carbohydrate epitopes of gastric cancer with submucosal invasion. *Surg Today* 2000; 30(12): 1073-82.
14. Petrossian K, Banner LR, Oppenheimer SB. Lectin binding and effects in culture on human cancer and non-cancer cell lines: examination of issues of interest in drug design strategies. *Acta histochem* 2007; 109(6): 491-500.
15. Van Bommel JH, Musen MA. Biostatistical Methods. In: *Handbook of medical informatics*. Springer-Verlag (Ed.) Germany; 1997. p. 387-96.
16. Restrepo BI, Obregón-Henao A, Mesa M, Gil DL, Mesa JS, Vilota GE et al. Characterization of the carbohydrate components of *Taenia solium* metacestode glycoprotein antigens. *Int J Parasitol* 2000; 30(6): 689-96.
17. Jarroll EL, Macechko TP, Steimle PA, Bulik D, Karr CD, van Keulen H et al. Regulation of carbohydrate metabolism during *Giardia* encystment. *J Eukariot Microbiol* 2001; 48(1): 22-6.
18. Okano M, Satoskar AR, Nishizaki K, Abe M, Harn DA Jr. Induction of Th2 responses and IgE is largely due to carbohydrates functioning as adjuvants on *Schistosoma mansoni* egg antigens. *J Immunol* 1999; 163(12): 6712-7.
19. Beltrão EIC, Figueredo-Silva J, Valença MM, Coelho LCBB, Carvalho-Jr LB. *Parkia pendula* lectin as histochemistry marker for meningothelial tumour. *Eur J Histochem* 2003; 47(2): 139-42.
20. Mansour MH, Abdul-Salam F, Al-Shemary T. Distinct binding patterns of fucose-specific lectins from *Biomphalaria alexandrina* and *Lotus tetragonolobus* to murine lymphocyte subsets. *Immunobiology* 2005; 210 (19): 335-48.
21. Yoshioka L, Zanotti-Magalhães EM, Magalhães LA, Linhares AX. *Schistosoma mansoni*: estudo da patogenia da linhagem Santa Rosa (Campinas, SP, Brasil) em camundongos. *Rev Soc Bras Med Trop* 2002; 35 (3): 203-7.
22. Cleva R, Saad WA, Herman P. Portal hyperflow in patients with hepatosplenic mansonic schistosomiasis. *Rev Hosp Clin* 2004; 59(1): 10-4.
23. Melo-Júnior MR, Figueiredo JL, Araújo-Filho JLS, Machado MCFP, Brandt CT, Pontes-Filho NT. Portal hypertension in mansonic schistosomiasis: profile of the gastric mucosa. *Rev Soc Bras Med Trop* 2007; 40(1): 71-5.

Campanha de prevenção de câncer cervical: estudos no Instituto Adolfo Lutz mostram a necessidade de avaliação na faixa etária

Cervical cancer screening programs: study at Instituto Adolfo Lutz show a necessity of an age-group evaluation

RIALA6/1153

Daniela Etlinger^{*1}, Sonia Maria Miranda Pereira¹, Koki Fernando Oikawa², Antonio Carlos Marin², Rosângela Santos de Araújo¹, Cleusa de Jesus de Souza¹, Luzia Setuko Umeda Yamamoto¹

*Endereço para correspondência: ¹Instituto Adolfo Lutz, Divisão de Patologia, Setor de Citologia Oncótica, Av. Dr. Arnaldo 355, CEP 012246-902, São Paulo, SP/ Brasil, e-mail: danielaetlinger@terra.com.br

¹Setor de Citologia Oncótica, Divisão de Patologia, Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr. Arnaldo 355, CEP 012246-902, São Paulo, SP/ Brasil.

²Faculdade e Colégio Mário de Andrade, São Paulo, SP/Brasil.

Recebido: 06/12/2007 – Aceito para publicação: 03/04/2008

RESUMO

O objetivo deste estudo foi identificar a faixa etária das mulheres atendidas nas Unidades de Saúde do Estado de São Paulo, que apresentaram lesão intraepitelial de alto grau e neoplasia cervical, e, também, avaliar se a faixa etária preconizada pelo Ministério da Saúde em campanhas de rastreamento é adequada. Foram analisados os resultados de 30.910 amostras cérvico-vaginais colhidas e analisadas pelo Método de Papanicolaou. Das 14.779 amostras cérvico-vaginais de mulheres da faixa etária ≤ 34 anos, 841 (5,7%) apresentaram alterações epiteliais atípicas (AEA); destas, em 74 (8,8%) o diagnóstico foi de lesão intraepitelial de alto grau (HSIL), 38 (4,5%) de células escamosas atípicas em que não pode excluir lesão intraepitelial de alto grau (ASC-H) e em 369 (43,9%) houve ocorrência de lesão intraepitelial de baixo grau (LSIL). Entre as amostras cérvico-vaginais de 9.710 mulheres da faixa etária de 35-49 anos, 442 (4,6%) foram diagnosticadas como AEA, destas, 41 (9,3%) eram HSIL, 29 (6,3%) ASC-H, 94 (21,2%) de LSIL e 2 (0,5%) carcinomas. Das 6.421 amostras cérvico-vaginais de mulheres da faixa etária ≥ 50 anos 327 (5,1%) foram diagnosticados como AEA; destas, 35 (10,7%) apresentaram HSIL, 23 (7,0%) ASC-H, 26 (8,0%) LSIL, e 8 (2,4%) carcinomas. Os achados mostram que há necessidade de especial atenção às mulheres jovens e adolescentes nos Programas de Rastreamento para Prevenção de Câncer Cervical.

Palavras-chave. lesão intraepitelial cervical, faixa etária, método de Papanicolaou, amostras cervicais

ABSTRACT

The aim of the present study was to identify the age - group of women who referred to Health Centers and were classified as SIL, HSIL and cervical neoplasia, and also to evaluate whether the age-group recommended by the Brazilian Health Ministry for being enrolled in the Cancer Screening Program is adequate. A total of 30,910 cervical smears collected by conventional Pap test were analyzed. For 14,779 women at age-group ≤ 34 years old, 841 (5.7%) were diagnosed as atypical cellular alteration (AEA). Among these women, 74 (8.8%) presented high-grade squamous intraepithelial lesions (HSIL), 38(4.5%) atypical squamous cells of which the high - grade squamous intraepithelial lesion (ASC-H) cannot be excluded, and 369 (43.9%) showed low-grade squamous intraepithelial lesions (LSIL). Of 9,710 women at age-group of 35-49 years old, 442 (4.6%) were diagnosed as AEA, and among them 41 (9.3 %) were HSIL, 29 (6.3%) were ASC-H, 94 (21.2%) were LSIL and carcinoma was evidenced in 2 (0.5%). The age-group ≥ 50 years old was composed by 6,421 women, and among them 327 (5.1%) were diagnosed as AEA, of them 35 (10.7%) were HSIL, 23 (7.0%) were ASC-H, 26 (8.0%) were LSIL and 8 (2.4%) had carcinoma. These findings evidenced that particular and specific attention should be addressed to young women and teenager in accomplishing the Cervical Cancer Screening Programs.

Key words. cervical squamous intraepithelial lesion, age-group, Pap test, cervix smears.

INTRODUÇÃO

O carcinoma cervical é um das principais neoplasias malignas que afetam as mulheres no mundo, sendo a segunda mais comum, com 471.000 novos casos por ano e cerca de 230.000 mortes anuais em todo o mundo. No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimou a ocorrência de 18.680 casos de câncer cervical em 2008¹.

É consenso mundial de que o carcinoma do colo uterino pode ser evitado através do diagnóstico precoce e do tratamento das lesões precursoras. Para este fim, o método de Papanicolaou tem sido advogado como um instrumento eficiente para programas de rastreamento². Dados históricos mostram que em países onde houve um responsável investimento governamental em programas de longo prazo, com adequado treinamento dos profissionais envolvidos e estabelecimento de infra-estrutura apropriada, observou-se uma redução da incidência de câncer cervical após a introdução da citologia cervical que varia de 20% a 90%³.

A infecção pelo Papilomavírus humano (HPV) é a mais comum doença sexualmente transmissível que acomete a mulher em todo o mundo. Aproximadamente 6,2 milhões de novos casos ocorrem a cada ano só nos Estados Unidos, com maior prevalência em mulheres sexualmente ativas com menos de 25 anos^{4,5,6}.

A maioria das infecções pelo HPV genital é transitória e assintomática. Aproximadamente 70% das mulheres com infecção pelo HPV tornam-se HPV-DNA negativo dentro em um ano e 91% em de 2 anos^{7,8,9}. O desenvolvimento gradual da resposta imune é o possível mecanismo para a regressão da infecção¹⁰. Entretanto, é possível que o vírus permaneça em estado transitente e seja reativado muitos anos mais tarde. Isto pode explicar porque o HPV pode ser detectado depois de alguns anos em mulheres que tem um relacionamento monogâmico de longo tempo⁵.

Mulheres com infecção persistente pelo HPV de alto risco apresentam aumento de risco para desenvolver lesão precursora de alto grau e carcinoma cervical¹¹. A presença de HPV de alto risco, alta carga viral e infecção persistente são considerados fatores de risco para progressão de neoplasia intra-epitelial cervical para câncer invasor. Dessa forma, as lesões intraepiteliais neoplásicas podem progredir mais rapidamente nesse grupo de mulheres^{12,13,14}. Nas adolescentes, a imaturidade da cérvix pode contribuir para uma maior suscetibilidade ao HPV, acelerando, assim, a progressão das lesões¹⁵. Outro fator associado com carcinoma cervical é o fato da mulher nunca, ou raramente, ter sido submetida a rastreamento para este câncer. É estimado que metade das mulheres com câncer cervical nunca realizaram um teste de *screening*, e cerca de 10% não o fizeram nos últimos cinco anos¹⁶.

Alguns relatos da Suécia, Estados Unidos e Austrália alertam para o fato de que a incidência de adenocarcinoma invasivo, por exemplo, que costumava responder por 10-15%

de todos os carcinomas cervicais, é cada vez maior em mulheres jovens, ainda que as taxas de câncer cervical em geral estejam em declínio. A causa deste aumento é obscura, mas preocupante, já que o prognóstico para pacientes com adenocarcinoma cervical é pior do que para aquelas com carcinoma de células escamosas¹⁷.

O Ministério da Saúde, por intermédio do Instituto Nacional de Câncer (INCA), em parceria com a Secretaria da Saúde, desenvolveu o Programa Nacional de Controle do Câncer do Colo do Útero e de Mama - Viva Mulher, que direcionou as campanhas de rastreamento do câncer do colo do útero para as mulheres na faixa etária de 25 a 49 anos, e que nunca tinham feito o teste de Papanicolaou; ou que o fizeram há três anos ou mais¹⁸.

Guimarães et al¹⁹ em seu estudo sugerem progressão das lesões intra-epiteliais de baixo para alto grau ou carcinoma com tempo médio de cinco anos em 25% dos casos. É possível que adolescentes com lesão intraepitelial de baixo grau não tratadas desenvolvam em poucos anos lesões de alto grau ou carcinoma²⁰.

Este estudo tem como objetivo identificar a faixa etária das mulheres atendidas nas Unidades de Saúde de São Paulo que apresentam lesão intraepitelial de alto grau ou neoplasia cervical, além de avaliar a faixa etária preconizada pelo Ministério da Saúde em campanhas de controle de câncer de colo uterino.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foi realizado levantamento retrospectivo das 30.910 amostras cérvico-vaginais analisadas pelo Setor de Citologia Oncótica do Instituto Adolfo Lutz em 2006. As amostras foram colhidas pelo método convencional nas Unidades de origem, preparadas pelo Método de Papanicolaou e classificadas segundo o Sistema de Bethesda²¹. Foram compiladas informações sobre idade, média das idades (MI) e diagnóstico anterior, contidas nas requisições de todos os casos diagnosticados com alterações epiteliais atípicas (AEA). Os diagnósticos foram avaliados em três faixas etárias: ≤ 34 anos (14.779), 35 a 49 anos (9.710) e ≥ 50 anos (6.421). O método estatístico utilizado (ANOVA) analisou a possibilidade das médias de lesões serem iguais nas diferentes faixas etárias.

RESULTADOS

Das 30.910 amostras cérvico-vaginais, foram diagnosticadas com alterações epiteliais atípicas (AEA) 1.610 (5,2%), sendo 59 (0,2%) atipia glandular de significado indeterminado (AGC), 812 (2,6%) atipia escamosa de significado indeterminado possivelmente não-neoplásica (ASC-US), 90 (0,3%) atipia escamosa de significado indeterminado que não se pode afastar lesão de alto grau (ASC-H), 489 (1,6%) lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (LSIL), 150 (0,5%) lesão

intraepitelial escamosa de alto grau (HSIL) e 10 (0,3%) carcinomas (CA). (Tabela 1)

Dos 150 (0,5%) casos de HSIL, 74 (49,4%) foram detectadas em mulheres ≤ 34 anos, com destaque para 18 casos (24,3%) nas mulheres < 25 anos. (Tabela 2)

Foram observados na faixa etária ≤ 34 anos (MI=24,7), 841 (5,7%) casos com diagnóstico de AEA, destes 74 (8,8%) apresentaram HSIL, 38 (4,5%) ASC-H e 369 (43,9%) LSIL. Foram compiladas informações sobre citologias anteriores anormais em 99 (11,8%), destes, 23 (23,2%) com diagnóstico anterior de HSIL. Dos 74 casos de HSIL observados nesta faixa etária, 10 casos tinham informação anterior de HSIL.

Dos 9.710 casos na faixa etária de 35 a 49 anos (MI=41,4), 442 (4,6%) foram diagnosticados como AEA, sendo 41 (9,3%) HSIL, 29 (6,3%) ASC-H, 94 (21,2%) LSIL e 2 (0,5%) CA. Foram identificadas informações sobre citologias anteriores anormais em 66 (14,9%) casos: destas, 16 (24,2%) tinham diagnóstico anterior de HSIL.

Dos 6.421 casos da faixa etária ≥ 50 anos (MI=59,1), 327 (5,1%) foram diagnosticados como AEA, sendo 35 (10,7%) HSIL, 23 (7,0%) ASC-H, 26 (8,0%) LSIL e 8 (2,4%) CA. As informações de citologias anteriores mostraram anormalidades citológicas em 39 (12%) casos, sendo que 8 (20,5%) destes tinham diagnóstico anterior de HSIL.

O valor de p foi de 0,0581. Ao considerar-se as faixas etárias ≤ 34 anos e 35 – 49 anos, o valor de p foi de 0,1928.

DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nesse estudo demonstraram que a faixa etária preconizada pelo Ministério da Saúde para realização de rastreio anual pelo método de Papanicolaou excluiu do sistema pacientes jovens, potencialmente portadoras de lesões com rápido curso de progressão. O desfecho da história natural da infecção pelo HPV poderá ser danoso a saúde dessas jovens, uma vez que a orientação oficialmente aceita no Estado brasileiro não está levando em consideração importantes nuances de comportamento e associação de fatores de risco. Este estudo não apresenta propósito epidemiológico para sustentar essa hipótese, mas demonstra que as jovens participantes do programa de prevenção de câncer de colo uterino do Estado de São Paulo apresentam fatores de risco que acentuam a progressão de lesões induzidas pelo HPV.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda prevenção de câncer de colo do útero anualmente, a partir dos 25 anos e, caso os resultados sejam negativos por dois anos consecutivos, o intervalo poderá ser estendido para três anos até os 60 anos de idade²². Programas conduzidos por países como a França e Itália priorizam a faixa etária dos 20 aos 65 anos; outros países, como a Finlândia e Países Baixos priorizam faixas etárias mais restritas, entre 30 e 60 anos; e há ainda países, como a Alemanha, que convidam todas as mulheres a partir dos 20 anos de idade a participarem dos programas de *screening*,

não estabelecendo idade limite para seu término²³. O programa de prevenção do câncer cervical pelo Sistema Nacional de Saúde (NHS) da Inglaterra e país de Gales oferece exames para a faixa entre 25 a 50 anos, com intervalo de três anos²⁴. Se considerarmos os dados obtidos em nosso estudo, e adotássemos as condutas de alguns desses países, muitas de nossas jovens teriam lesões cervicais graves por um período bastante prolongado até chegarem à idade sugerida para rastreamento.

Em 1998, o Ministério da Saúde do Brasil lançou o Programa Nacional de Controle do Câncer de Colo de útero (PNCCC) e estabeleceu-se, como prioridade, o atendimento de mulheres com idade entre 35 e 49 anos e em 2002 o atendimento foi ampliado para aquelas que nunca haviam sido submetidas a um teste de Papanicolaou, ainda que as pertencentes a outras faixas etárias pudessem ser atendidas. Foram examinadas 3 milhões e 263 mil mulheres e identificadas 1,2 milhões de mulheres com algum tipo de infecção vaginal e 53,9 mil mulheres com lesão de colo uterino. Do total dos casos positivos para lesão cervical, 49,2 mil estavam no estágio inicial da doença ou com alguma lesão precursora e 4,7 mil mulheres apresentaram câncer invasivo. As médias de idade das pacientes com lesões de baixo e alto grau foram 29,7 anos e 36,3 anos respectivamente o que demonstra que a maioria das lesões ocorreu em faixas etárias inferiores àquelas prevista pelo PNCC como prioritárias: de 35 a 49 anos²⁵. Em nosso estudo, a média de idade de mulheres com LSIL foi de 28,7 anos e com HSIL 33,0 anos.

Vários estudos têm apontado que a permanência das altas taxas de incidência e mortalidade por câncer cérvico-uterino deve-se à baixa qualidade e cobertura do teste de Papanicolaou, principalmente em países em desenvolvimento. Estudos epidemiológicos realizados com amostras representativas da população feminina brasileira sugerem que além da cobertura ser relativamente deficiente, está distribuída desigualmente entre a população usuária dos serviços de saúde, com a realização do teste concentrando-se, geralmente, entre os grupos de menor risco para o câncer cervical^{26,27}. Dados internacionais mostram que somente 12-45% das adolescentes sexualmente ativas têm realizado exame de prevenção²⁸, por isso tem sido sugerido que o rastreamento deva ser mais freqüente neste grupo de mulheres jovens, em função do aumento na incidência de lesões de alto grau entre as pacientes com 20 a 34 anos de idade^{29,30}. Yamamoto et al³¹ encontraram resultados semelhantes, que reforçam a importância de inclusão da faixa etária entre 25 a 34 anos (34,4% de HSIL), em comparação com a faixa etária de 35 a 44 anos (26,2% de HSIL). No presente estudo, observamos a alta incidência de HSIL na faixa etária ≤ 34 anos com destaque para a ocorrência em adolescentes, sendo que 24,3% (18) dos casos de HSIL ocorreram nas mulheres < 25 anos. Na Suíça, foi observado aumento do número de adenocarcinomas de colo uterino em mulheres com idade de 25 a 39 anos, apesar dos programas de rastreamento estar em efetivo funcionamento há várias décadas³².

Tabela 1. Distribuição dos diagnósticos de alterações epiteliais atípicas, por faixa etária, na população atendida pelo SCO-IAL em 2006.

	AGC		ASC-US		ASC-H		LSIL		HSIL		CA		TOTAL
	n	%	n	%	N	%	n	%	n	%	n	%	n
≤34	18	0,1	342	2,3	38	0,3	369	2,5	74	0,5	—	0,0	14.779
35 - 49	23	0,2	253	2,6	29	0,3	94	1,0	41	0,4	2	0,02	9.710
≥50	18	0,3	217	3,4	23	0,4	26	0,4	35	0,5	8	0,1	6.421
TOTAL	59	0,2	812	2,6	90	0,3	489	1,6	150	0,5	10	0,03	30.910

P=0,0581

Tabela 2. Distribuição, por faixa etária, das lesões intra-epiteliais escamosas.

	≤34		35 - 49		≥50		TOTAL
	n	%	n	%	n	%	
LSIL	369	75,5	94	19,2	26	5,3	489
HSIL	74	49,4	41	27,3	35	23,3	150

Na análise estatística, os valores encontrados (*F valor*) aceitam a hipótese que as médias populacionais das faixas etárias são iguais, porém, a margem de aceitação é maior quando comparamos apenas duas (≤34 anos e 35 – 49 anos), das três faixas etárias analisadas. A diferença no valor de *p* reforça a hipótese de que, estatisticamente, as médias não são diferentes entre as faixas etárias.

Concluimos que a igualdade entre as médias de lesão cervical nas faixas etárias analisadas pode representar uma necessidade de avaliação dos critérios de determinação de idade para a realização de Campanhas Preventivas de Câncer de Colo do Útero, com especial atenção sobre as ações informativas e conscientização das DSTs nas mulheres jovens e adolescentes.

REFERÊNCIAS

1. Incidência de câncer no Brasil: Estimativa 2008. Instituto Nacional do Câncer. [cited 2008 marc 14]. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2008/index.asp>
2. Arcuri RA, Cunha KCF, Alves EC, Castro AA, Maciel RA, Rosmanino AC, Silva PL, Xavier GC. Controle interno da qualidade em citopatologia ginecológica: um estudo de 48.355 casos. *J Bras Patol Med Lab*. 2002; 38(2): 141-7.
3. Kitchener HC, Castle PE, Cox JT. Achievements and limitations of cervical cytology screening. *Vaccine*. 2006; 24(suppl 3): S63-S70.
4. CDC. Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines, 2006. *MMWR*. 2006; 55 (Nº. RR-11): 1-94. [cited 2007 nov 22]. Available from: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr5511a1.htm>
5. Weinstock H, Berman S, Cates W Jr. Sexually transmitted diseases among American youth: incidence and prevalence estimates, 2000. *Perspect Sex Reprod Health*. 2004; 36(1): 6-10.
6. Ault KA. Epidemiology and natural history of Human Papillomavirus infections in the female genital tract. *Infect Dis Obstet Gynecol*. 2006; 14: 1-5.
7. Ho GY, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, Burk RD. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection as measured by repeated DNA testing in adolescent and young women. *N Engl J Med*. 1998; 338(7): 423-8.
8. Moscicki AB, Hills N, Shiboski S, Powell K, Jay N, Hanson E, Miller S, Clayton L, Farhat S, Broering J, Darragh T, Palefsky J. Risks for incident human papillomavirus infection and low-grade squamous intraepithelial lesion development in young females. *JAMA*. 2001; 285(23): 2995-3002.
9. Woodman CB, Collins S, Rollason TP, Winter H, Bailey A, Yates M, Young LS. Human papillomavirus type 18 and rapidly progressing cervical intraepithelial neoplasia. *Lancet*. 2003; 361(9351): 40-3.
10. National Institutes of Health (NIH). NIH Consensus statement: Cervical Cancer. 1996; 14:1-38.
11. Schlect NF, Kulaga S, Robitaille J. Persistent human papillomavirus infection as a predictor of cervical intraepithelial neoplasia. *JAMA*. 2001; 286: 3106-3114.
12. Santos ALF, Derchain SFM, Martins MR, Sarian LO, Martinez EZ, Syrjänen KJ. Human papillomavirus viral load in predicting high-grade CIN in women with cervical smears showing only atypical squamous cells or low-grade squamous intraepithelial lesion. *Sao Paulo Med J* 2003; 121: 238-43.

13. Thomas C, Wright Jr. Cervical Cancer Screening in the 21st Century: Is it time to retire the Pap smear? *Clin Obstet Gynecol*. 2007; 50(2): 313-23.
14. Hein K, Schreiber K, Cohen MI, Koss LG. Cervical cytology: the need for routine screening in the sexually active adolescent. *J Pediatr*. 1989; 91: 123-6.
15. Moscicki A, Winkler B, Irwin CE Jr, Schachter J. Differences in biologic maturation, sexual behavior, and sexually transmitted disease between adolescents with and without cervical intraepithelial neoplasia. 1989; 115: 487-93.
16. Leiden WA, Manos MM, Geiger AM, Weinmann S, Mouchawar J, Bischoff K. Cervical cancer in women with comprehensive health care access: attributable factors in the screening process. *J Natl Cancer Inst*. 2005; 97(9): 675-83.
17. Liu S, Semenciw R, Mao Y. Cervical cancer: the increasing incidence of adenocarcinoma and adenosquamous carcinoma in younger women. *CMAJ*. 2001; 164(8): 1151-2.
18. Instituto Nacional do câncer. Viva mulher. Câncer do colo do útero: Informações técnico-gerenciais e ações desenvolvidas. Rio de Janeiro: Instituto Nacional do Câncer; 2002.
19. Guimarães EM, Pires J, Peli LB, Aguiar RSF. Evolução de displasia leve diagnosticada por citopatologia: Análise retrospectiva de 155 casos. *J Bras Patol*. 1999; 35: 136-40.
20. Wright JD, Davila RM, Pinto KR, Merritt DF, Gibb RK, Rader JS, Mutch DG, Gao F, Powell MA. Cervical dysplasia in adolescents. *Obstet Gynecol*. 2005; 106(1): 115-20.
21. Solomon D, Davey DD, Kurman R, Moriarty A, O'Connor D, Prey M, Raab S, Sherman M, Wilbur D, Wright T Jr, Young N; Forum Group Members; Bethesda 2001 Workshop. The 2001 Bethesda system: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA* 2002; 287: 2114-9.
22. WHO (World Health Organization). Cytological screening in the control of cervical cancer: technical guidelines. Genebra; 1988.
23. Linos A, Riza E. Comparisons of cervical cancer programmes in the European Union. *Eur J Cancer* 2000; 36: 2260-5.
24. Mayor S. NHS cervical screening programme to introduce liquid based cytology. *BMJ*. 2003; 327(7421): 948.
25. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Assistência à Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Estimativas da incidência e mortalidade por câncer no Brasil 2000. Rio de Janeiro: INCA; 2000.
26. Nascimento CM, Eluf-Neto J, Rego RA. Cobertura do teste de Papanicolaou no Município de São Paulo e características das mulheres que realizaram o teste. *Bol Ofic Sanit Panam*. 1996; 121: 491-9.
27. Pinho AA, Fatores associados à realização do teste de Papanicolaou entre mulheres em idade reprodutiva no município de São Paulo. [dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública; 2002.
28. Vetrano G, Lombardi G, Di Leone G, Parisi A, Scardamaglia P, Pate G, Verrico M, Corosu R. Cervical intraepithelial neoplasia: risk factors for persistence and recurrence in adolescents. *Eur J Gynaecol Oncol*. 2007; 28(3): 189-92.
29. Copel K, Paul C, Cox B. An evaluation of the National Cervical Screening Programme Otago site. *N Z Med*. 2000; 113: 48-51.
30. Bano F, Kolhe S, Zamblera D, Jolaoso A, Folayan O, Page L, Norton J. Cervical screening in under 25s: a high-risk young population. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2007; doi: 10.1016/j.ejogrb.2007.08.020
31. Yamamoto LSU, Saito S, Pereira SMM, Uttagawa ML, Longatto-Filho A. Uterine cytopathology in a public health laboratory: impact from 20 years data (1984-2003). *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2006; 65(2): 141-5.
32. Berstrom C, Sparen P, Adami HO. Trends in cancer of the cervix uteri in Sweden following cytological screening. *BJ Cancer*. 1999; 81: 159-66.

Surveillance epidemiological: parvovirus B19 genotype 1

Vigilância epidemiológica: parvovirus B19 genótipo 1

RIALA6/1154

*Maria Isabel de OLIVEIRA¹, Ana Maria Sardinha AFONSO¹, Cristina Adelaide FIGUEIREDO¹, Ana Lucia FRUGIS YU², Suely Pires CURTI¹

*Endereço de correspondência: ¹Instituto Adolfo Lutz, Serviço de Virologia, Av. Dr. Arnaldo 355, CEP 01242-902, São Paulo, SP/ Brasil. Fone (055 11) 3068.2903 e-mail: olive40@uol.com.br

²GT, Exantemáticas/Ministério da Saúde/São Paulo/Centro de Vigilância Epidemiológica/DDTR, São Paulo, SP/ Brasil. Recebido: 21/09/2007 – Aceito para publicação: 06/03/2008

RESUMO

O parvovirus humano B19 foi isolado e caracterizado de amostra clínica de um paciente, infectado no Japão, e que apresentou os sintomas de febre e erupção cutânea após sua chegada ao Brasil. A infecção por parvovírus foi confirmada por meio de seguintes ensaios: Elisa para detecção de anticorpos IgM anti-parvovirus B19 e técnica de *polymerase chain reaction* (PCR). Um fragmento da região NS1-VP1 foi diretamente submetido ao seqüenciamento do nucleotídeo. A análise filogenética parcial do B19, frente às várias seqüências disponíveis no *GenBank*, indicou que PV B19 isolado correspondeu ao genótipo 1.

Palavras-chave. parvovirus humano B19, epidemiologia molecular, seqüência do nucleotídeo, erythrovirus, eritema infeccioso.

ABSTRACT

Human parvovirus B19 was identified and characterized in sample collected from a patient who was infected in Japan, and the symptoms as fever and rash appeared after arriving to Brazil. The occurrence of virus infection was confirmed by both assays: Elisa parvovirus B19-specific IgM antibody detection and polymerase chain reaction (PCR). A fragment of NS1-VP1 region was directly submitted to nucleotide sequencing. Partial phylogenetic analysis of B19 sequences, including several sequences available in GenBank, indicated that the isolated HPV B19 corresponded to genotype 1.

Key words. human parvovirus B19, molecular epidemiology, nucleotide sequence, erythrovirus, erythema infectiosum.

INTRODUCTION

Human parvovirus B19 (HPV B19) belongs to the genus *Erythrovirus* of the *Parvoviridae* family¹. HPV B19 infection is associated with a wide range of clinical symptoms. The most common manifestation caused by HPV B19 infection in children is an erythema infectiosum disease, which results in mild fever and rash. In adults, the clinical features vary from asymptomatic or mild to acute illnesses including acute arthritis². The most commonly transmission by personal contact is via aerosol or respiratory secretions. Viraemia occurs 1 week after exposure and usually lasts about 5 days, with virus titers peaking on the first 2 days⁽¹⁸⁾. In general, individuals are susceptible to a certain course of infection or differences in the HPV B19 genome that can result in a more virulent strain^{3,4,5}.

As a result of increased awareness of the importance of screening for HPV B19, a number of novel genotypes have been identified. Genetic diversity among HPV B19 virus strains has been reported to be very low, with less than 2% of

nucleotide divergence in the whole genome. Servant et al.⁶ carried out a phylogenetic analysis of partial sequences, combined with the erythrovirus sequences available in GenBank, and thus proposed that the erythrovirus group should be classified into three individualized genotypes. The HPV B19 viruses correspond to genotype 1, whereas the V9 viruses are subdivided into genotypes 2 and 3^{7,8}. In this study, we accounted for a sample of HPV B19 virus that was isolated from a patient, who was infected in Japan but developed symptoms after arriving in the state of Sao Paulo, Brazil. Molecular characterization of viruses and the confirmation of the source of virus infection were possible because of the effectiveness of the measles control program.

MATERIAL AND METHODS

The case was reported as measles, as suspected by health workers from the epidemiological surveillance of the

measles control program in Sao Paulo State, Brazil. A 51-year-old woman who was living in Japan arrived in the state of Sao Paulo on January 18, 2005, featuring fever (38.0°C) for 4 days, followed by the onset of a rash on January 24, 2005. An epidemiological investigation on the virus infection started on January 28, 2005 by collecting blood.

The sample was analyzed at Adolfo Lutz Institute, in the state of Sao Paulo, to detect either measles or rubella infection by employing serological and nested polymerase chain reaction (PCR). Because all tests were negative, the blood sample was then tested for HPV B19 infection, which was demonstrated to be positive. Testing for B19 virus specific antibodies was performed using a commercial IgG and IgM enzyme immunoassay kit (Biotrin®, Dublin, Ireland) that was specific for identifying VP2. The test was performed according to the manufacturer recommendations. DNA was extracted from sera with QIAmp® DNA minikit (Quiagen, Courtabouf, France) according to the manufacturers' instructions. The oligonucleotide primers specific to a conserved region of the NS1 gene encoding for HPV B19 nonstructural protein (positions 1399 to 1659) were used for PCR diagnostic, as previously described⁹. For sequencing a region of the NS1-VP1 gene of an erythrovirus HPV B19 sample was amplified by PCR with oligonucleotides described by Servant et al.⁶. The PCR products were sequenced directly using the "ABI Prism[®] Big Dye^M Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit" according to the manufacturer's protocol. Sequences were determined in an ABI sequencer model 377 (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The phylogenetic analysis of viral strains was compared with the sequences of the GenBank (Table 1). Sequence generated from the HPV B19 sample was submitted to Blast searches in the GenBank¹⁰, and thus

aligned with prototype sequences of genotype 1, strain Pvbua, genotype 2, prototype strain Lali, and genotype 3, prototype strain V9. Sequence alignment was performed using the multiple sequence alignment method implemented in CLUSTALX¹¹. Accuracy of nucleotide sequence alignment was examined using amino acid sequence alignment.

For the phylogenetic analysis we used a fragment of the genes, positions 2103 to 2626. Maximum likelihood (ML) analyses were performed using PAUP 4.0b10¹².

The best model in PAUP was chosen using ModelTest 3.06¹³. This program uses both a hierarchical Likelihood Ratio Test (hLRT) and the AIC (Akaike Information Criterion) to choose among 56 available models. Maximum likelihood searches started with a neighbor-joining tree, on which we then optimized parameters and fixed the values for those parameters for branch swapping on that tree. For each bootstrapped data set PAUP did TBR branch-swapping and only one tree was saved in each replicate. Support for each clade generated for unpartitioned data sets was assessed by 1000 bootstrap replicates using PAUP.

RESULTS

The erythrovirus HPV B19 infection was confirmed by both parvovirus B19-specific immunoglobulin M (IgM) and PCR assay. Sequencing of the sample DQ453960 generated a fragment of 524 bp (positions 2103 to 2626 in the alignment with AF162273) of the NS1 - VP1 gene, which is deposited in GenBank. Both nucleotide and amino acid sequences of DQ453960 were used for comparisons to the same region of the HPV B19 genome by a BLAST search in GenBank (Table 1) to

Table 1. Characteristics of HPV B19 virus subjected to phylogenetic analyses

Strain/year	Group	Locality	GenBank number
Pvbaua, 1986	1	Canadian	M13178
Pvbpro, 1987	1	Canadian	M24682
Pvb19nsvp, 1995	1	London	Z68146
Pvb19x528, 1996	1	Germany	Z70528
N8/K, 1999	1	Japan	AB030673
HV/G, 1999	1	Italy	AF162273
R43, 1999	1	France	AJ249435
V9, 1999	3	France	AX003421
R225, 2001	2	France	AJ249431
R322, 2001	2	France	AJ249434
Lali/K, 2001	2	France	AY044266
E99.2, 2002	3	France	AY083238
E99.3, 2002	2	France	AY083239
Br 543, 2004	3	Brazil	AY647977
*BrSP 1, 2005	1	Brazil	DQ453960

(*) proposed genotype

corroborate the sample identity based on specific immunoglobulin M assay.

Comparisons of the nucleotide and amino acid NS1 - VP1 gene sequences of the strain BrSP1 (DQ453960) with those from representative of the HPV B19 deposited in the GenBank showed a high level of identity. Nucleotide pairwise identity among strains ranged from 88.8% to 99.6% in genotype 1, and 91.6% to 99.4% in genotype 2, and 89.8% to 92.5% in genotype 3. Amino acid identity ranged from 95.9% to 100% in genotype 1, 97.6% in genotype 2, 96.5% to 99.4% in genotype 3 (MEGALIGN, DNASTAR, Inc.).

The alignment of a fragment of the NS1 - VP1 gene sequences, employed for the present study is available upon request. ModelTest 3.06¹⁰ was used to choose among models in PAUP. The hLRT found the HKY + model, while the AIC suggested the TVM + model (Transversion Model with gamma distributed site-to-site rate variation). The latter model was chosen. ML analysis under the TVM + model generated a single topology with a log ML of -2535.70709. The ML topology recovered a clade consisting of all eight sequences of the genotype 1; a second clade consisting of genotype 2

sequences, AJ249431, AJ249434, AY044266, AY083239; and a third clade leading to AX003421, AY083238, AY647977 sequences of genotype 3. Sequence DQ453960 generated from the BrSP1 isolate was recovered in the clade formed by sequences representatives of the genotype 1 (Figure 1).

DISCUSSION

Human Parvovirus B19 exanthem is highly variable, and may be misdiagnosed as rubella or measles if a laboratory investigation is not performed. Both the virological surveillance and standard epidemiological case investigation carried out by the Measles Control Program in Sao Paulo State, Brazil, confirmed that a human female was infected in Japan and traveled to Brazil during the incubation period, arriving in Sao Paulo with clinical symptoms of the disease. The patient was first investigated for both measles and rubella by specific IgM and PCR assays. The results were negative for both viruses, and thus further investigated for HPV B19, for which was positive.

HPV B19 specific IgM antibodies are detected late in the viraemic stage, about day 10 or 12, and can persist for up to 5 months¹⁴. For the case reported here, we detected day 10 specific IgM and the IgM was complemented with a specific diagnostic HPV B19 PCR test that improved the sensitivity of the detection of the B19 infection, just as many clinical laboratories now complement by Saldanha et al.¹⁵. In chronic B19 infection, DNA virus persists in the host without the presence of B19 IgM or IgG. However, it has also been shown that HPV B19 DNA can persist in healthy, immunocompetent individuals at low levels for long period of time^{14,16,17}.

The genetic diversity among B19 virus isolates has been reported to be very low in the whole genome, although full-length sequences are available in the GenBank only for DQ453960 number of isolates BrSP1. A PCR assay was used for screening the new isolate erythrovirus V9, but because false-negatives may be observed with respect to non-HPV B19 strains, it was necessary to use a nested PCR using separate sets of primers for both B19 and V9¹⁸. This nested PCR can distinguish between different gene lineages within the Erythrovirus. The evolutionary relationships among these viruses, the high ratio of synonymous to no synonymous substitutions might be indicative of an ancient separation between the B19 and V9 lineages, which accumulate with time and are not subjected to selection pressure^{6,19}. Genotype 3 is markedly different from other HPV B19, 11%. The high degree of variance emphasizes the need for new diagnostic tools. Although the taxonomic grouping of V9 is unclear, and this genotype 3 is not prevalent in communities, 99% of samples were found to contain B19 DNA¹⁸. A molecular epidemiological investigation was carried out in Brazil to investigate which genotype was circulating in 2003 (GenBank AY647977), and

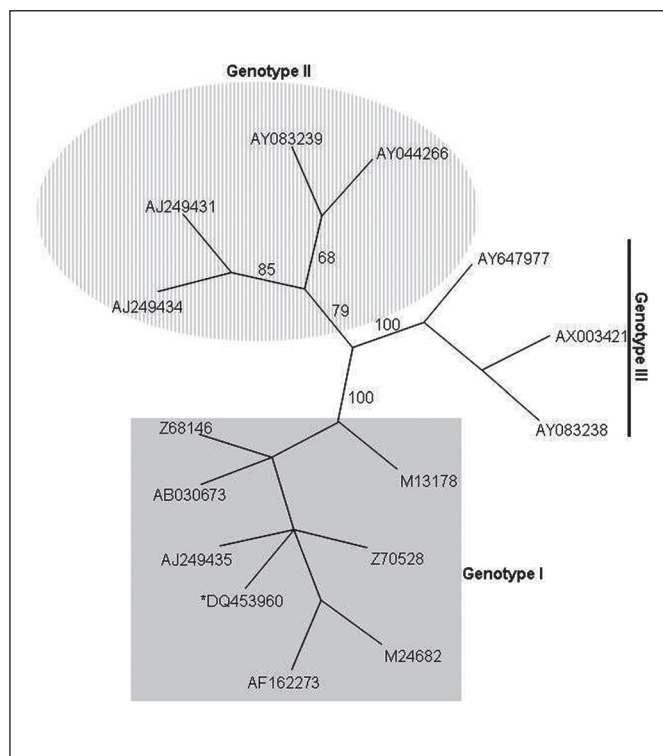


Figure 1. Phylogenetic analysis of HPV B19 based on the NS1/VP1 genes. The unrooted topology identified in the maximum likelihood analysis of 524 base pairs. Genotypes 1, 2 and 3 are labeled according to the scheme by Servant et al., 2002, Log likelihood of - 2535.70709, gamma shape = 0.198752. (*) = the propose genotype.

2004 (GenBank DQ229351). Comparisons of amino acid and nucleotide sequences of both samples confirmed that they belong to the genotype 3.

In contrast, to examine the epidemiological role of HPV B19 genotype 1 and 2, serological tests and PCR were conclusive in demonstrating a response characteristic of acute HPV B19 infection, because these genotypes are known to undergo to 1-2% of genetic variation in the entire genome^{8,19,20}

Several studies described genotype of erythrovirus samples but none could differentiate between cases of endemic or imported HPV B19 virus. As previously mentioned, the sequence BrSP1, was compared to three different genotypes. The results of the phylogenetic analysis as well as of the sequence data analysis showed that this samples belongs to genotype 1, and that it is similar to those groups which were circulating in Japan in 1999, France 1999, 2001, 2002, Italy in 1999, Canadian in 1986, 1987, Brazil in 2004 (GenBank DQ229355), 2005 (GenBank DQ229359).

Further studies are needed to establish a new classification for the Erythrovirus gens based on genotypes and to evaluate the virological and medical significance of these genotypes. Therefore it is important to help the public health surveillance services to monitor the pathways of transmission worldwide.

ACKNOWLEDGMENT

The authors thanks Maria Anice Mureb Sallum PhD for the phylogenetic analysis, Departamento de Epidemiologia, Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo.SP., Cecília L. Simões Santos PhD, for help in preparing the manuscript, and Marcia Theobaldo for the serological diagnosis of the measles and rubella virus. Adolfo Lutz Institute, São Paulo, Brazil.

REFERENCES

1. Siegl GR, Bates RC, Bern KI, Carter BJ, Kelly DC, Kurtak E, et al. Characteristics and taxonomy of Parvoviridae. *Intervirology*. 2005;23:61-71.
2. Chen YS, Chou PH, Li SN, Tsai WC, Lin KH, Tsai KB, Yen JH, Liu HW. Parvovirus B19 infection in patients with rheumatoid arthritis in Taiwan. *Rheumatol*. 2006 ;33:887-91.
3. Corcoran A, Doyle S. Advances in the biology, diagnosis and host-pathogen interactions of parvovirus B19. *J Med Microbiol*. 2004;53: 469-75.
4. Hemauer A., Poblitzki AV, Gigler A, Cassinotti P, Siegl G, Wolf H, et al. Sequence variability among different parvovirus B19 isolates. *J Gen Virol*. 1996;77:1781-5.
5. Parsyan A, Szmardt C, Allain JP, Candotti D. Identification and genetic diversity of two human parvovirus B19 genotype 3 subtypes. *J Gen Virol*. 2007;88:428-31.
6. Servant A, Laperche S, Lallemand F, Marinho V, De Saint Maur G, Meritet JF, et al. Genetic diversity within human erythroviruses: identification of three genotypes. *J Virol*. 2002;76:9124-34.
7. Ekman A, Hokynar K, Kakkola L, Kantola K, Hedman L, BondÅ©n H, Gessner M, Aberham C, Norja P, Miettinen S, Hedman K, SA¶derlund-Venermo M. Biological and immunological relations among human parvovirus B19 genotypes 1 to 3. *J Virol*. 2007;81:6927-35.
8. Baylis SA, Fryer JF, Grabarczyk P. Effects of probe binding mutations in an assay designed to detect parvovirus B19: implications for the quantitation of different virus genotypes. *J Virol Methods*. 2007;139:97-9.
9. Durigon EL, Erdman DD, Gary GW, Pallansch MA, Torok TT, Anderson LJ. Multiple primer pairs for polymerase chain reaction (PCR) amplification of human parvovirus B19 DNA. *J Virol Methods*. 1993;44:155-65.
10. Altschul S, Madden T, Schaffer A, Zhang OZ, Miller W, Lipman D.G. Blast and PSI-Blast. A new generation of protein tatabasc search programs. *Nucleic Acids Res*. 1997; 25:3389-402.
11. Yaegashi N, Shiraiishi H, Takeshita T, Nakamura M, Yajima A, Sugamura K. Propagation of human parvovirus B19 in primary culture of erythroid lineage cells derived from fetal liver culture. *J Gen Virol*. 1989;63:2422-6.
12. Swofford DL. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). In: Sinauer Associates 4th ed. Sunderland: Massachusetts; 2003.
13. Posada D, Crandall KA. ModelTest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatic*. 1998;14: 817-8.
14. Broliden K, Tolfvenstam T, Norbeck O. Clinical aspects of parvovirus B19 infection. *J Intern Med*. 2006;260:285-304.
15. Saldanha J, Lelie N, Yu MW, Heath A. B19 Collaborative Study Group. Establishment of the first World Health Organization International Standard for human parvovirus B19 DNA nucleic acid amplification techniques. *Vox Sang*. 2002;82:24-31.
16. Cohen BJ, Gandhi J, Clewley JP. Genetic variants of parvovirus B19 identified in the United Kingdom: implications for diagnostic testing. *J Clin Virol*. 2006;36:152-5.
17. Us T, Ozune L, Kasifoglu N, Akgun Y. The investigation of parvovirus B19 infection in patients with haematological disorders by using PCR and ELISA techniques. *Braz J Infect Dis*. 2007;11:327-30.
18. Heegaard ED, Jensen IP, Christensen J. Novel PCR assay for differential detection and screening of erythrovirus B19 and erythrovirus V9. *J Med. Virol*. 2001;65:362-7.
19. Umene K, Nunoue T. The genome type of human parvovirus B19 strains isolated in Japan during 1981 differs from types detected in 1986 to 1987: a correlation between genome type and prevalence. *J Gen Virol*. 1990;71:983-6.
20. Sanabani S, Neto WK, Pereira J, Sabino EC. Sequence variability of human erythroviruses present in bone marrow of Brazilian patients with various parvovirus B19-related hematological symptoms. *Clin Microbiol*. 2006;44:604-6.

Avaliação microbiológica e físico-química durante o processamento do leite pasteurizado

Physical-chemical and microbiological evaluation during the pasteurized milk processing

RIALA6/1155

Walécia Souza de ATAÍDE¹, Janeeyre Ferreira MACIEL^{1*}, Pedro Luciano Alcântara de LIMA¹, Ana Raquel Carmo de LIMA¹, Fernanda Vanessa Gomes da SILVA¹, João A. SILVA¹.

*Endereço para correspondência: ¹ Universidade Federal da Paraíba, Centro de Tecnologia, Departamento de Tecnologia Química e de Alimentos. Rua Manoel Belarmino, 365,ap.404, Jardim Cidade Universitária. João Pessoa, PB/Brasil. CEP 58052-290, e-mail: janeeyre@bol.com.br

Recebido: 11/09/2007 – Aceito para publicação: 28/01/2008

RESUMO

No presente estudo foram avaliadas as características microbiológicas e físico-químicas dos leites cru, dos produtos recém pasteurizados e dos leites pasteurizados embalados, de uma indústria de laticínios, localizada no Estado da Paraíba, a fim de avaliar os parâmetros em comparação aos padrões estabelecidos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Quatorze amostras de cada tipo de leite foram submetidas as seguintes análises microbiológicas: contagem de bactérias mesófilas viáveis, Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e termotolerantes, contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva e negativa, pesquisa de *Escherichia coli* e de *Salmonella*. Para análises físico-químicas foram determinados pH e acidez, além dos testes de fosfatase e peroxidase no leite recém pasteurizado. O leite cru apresentou números elevados de bactérias mesófilas viáveis e coliformes totais. *Staphylococcus* coagulase positiva foi detectado em 78,6% dessas amostras. Em 35,7% das amostras de leite recém pasteurizado e 64,3% das de leite pasteurizado embalado foram detectados coliformes totais, em números acima do limite estabelecido pela legislação em vigor. A enzima fosfatase não foi detectada no leite recém pasteurizado, indicando que a presença de coliformes pode ter ocorrido em função da recontaminação pós-pasteurização. Nenhuma amostra demonstrou a presença de *Salmonella*. Os três tipos de leite apresentaram amostras com acidez abaixo do limite mínimo estabelecido na legislação.

Palavras-chave. leite pasteurizado, processamento, avaliação físico-química, condições higiênico-sanitárias.

ABSTRACT

The present research aimed to evaluate the microbiological quality of raw milk, newly pasteurized milk, and packed pasteurized milk from a dairy industry located in the State of Paraíba, Brazil. Fourteen samples of each type of milk were submitted to the following microbiological analysis: viable mesophiles bacteria counting, Most Probable Number (MPN) of thermotolerant and total coliforms, positive- and negative - coagulase *Staphylococcus* counting, and detection of *Escherichia coli* and *Salmonella*. Also, pH and acidity were determined in all samples. In addition, phosphatase and peroxidase tests were performed in newly pasteurized milk. High rates of viable mesophiles bacteria count and total coliforms NMP were observed in all of raw milk samples. The positive coagulase *Staphylococcus* presence was verified in 78.6% of these samples. In 35.7% of the newly pasteurized milks and 64.3% of the packed pasteurized milk samples the total coliforms counts were higher than the established limit for this type of milk. No phosphatase was detected in newly pasteurized milk samples, indicating that the post-pasteurization recontamination should be the most probable cause to explain the coliforms presence in these samples. *Salmonella* was not detected in all analyzed samples. Among these three types of milk, some samples showed acidity value lower than the limit established by Brazilian legislation.

Key words. pasteurized milk, processing, physical chemical evaluation, hygienic-sanitary conditions.

INTRODUÇÃO

O leite é um alimento utilizado na dieta humana em todas as faixas etárias, principalmente por ser um dos produtos mais completos do ponto de vista nutricional^{1,2}. Porém, devido à sua riqueza em nutrientes, torna-se suscetível ao desenvolvimento de um grande número de microrganismos, provenientes do próprio animal, do ambiente, do homem e dos utensílios usados na ordenha.

O Brasil é um dos maiores produtores de leite do mundo, tendo produzido 23.475 milhões de litros de leite fluido em 2004, e essa produção tem aumentado a cada ano. A maior parte do leite produzido no Brasil é destinada ao mercado de leite fluido e à produção de queijos³. O segmento do leite fluido tem passado por importantes transformações desde o início da década de 90. Uma delas foi a crescente participação do leite longa vida no mercado nacional, com conseqüente redução na produção de leite pasteurizado⁴. Para incentivar a retomada do crescimento na produção e consumo do leite pasteurizado, é indispensável à melhoria de sua qualidade e segurança, conseqüentemente, aumentando a vida-de-prateleira do produto final.

Inúmeras pesquisas têm verificado a ocorrência de amostras de leite pasteurizado fora dos padrões legais vigentes, o que acarreta risco à saúde do consumidor^{5,6,7}. Com base nessas evidências, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) resolveu criar novas políticas de incentivo à produção leiteira, resultando no desenvolvimento do Programa Nacional de Melhoria da Qualidade do Leite (PNQL) e na elaboração da Instrução Normativa 51 (IN51)⁸. A IN51 estabelece limite para a contagem de bactérias mesófilas aeróbias viáveis no leite cru (máximo: 10⁶UFC/mL).

Além da contagem de bactérias mesófilas aeróbias viáveis, é importante avaliar a presença de *Staphylococcus aureus* e de coliformes totais e termotolerantes no leite cru. O *S. aureus* pode contaminar o leite, principalmente por estar presente como agente etiológico da mastite. Uma vez presente, e encontrando condições favoráveis à sua multiplicação, esse microrganismo pode atingir números elevados, com produção de enterotoxinas potencialmente capazes de causar toxinfecção alimentar⁹. A pesquisa de coliformes termotolerantes é indicadora de condições higiênico-sanitárias insatisfatórias, podendo ou não estar associada à presença de enteropatógenos, como *Salmonella*¹⁰.

Outro importante ponto de controle no processamento do leite pasteurizado, além do controle de qualidade da matéria-prima, é a etapa de pasteurização. Esse processo, quando eficiente deve eliminar todas as células vegetativas de bactérias patogênicas e a maioria dos microrganismos deteriorantes, não produzindo alterações significativas, quanto à qualidade nutricional do produto. A IN51 estabelece que a pasteurização é eficiente quando reduz o número de coliformes totais à < 0,3NMP/ml, imediatamente após ter sido submetido a este processo.

Nesse trabalho, características microbiológicas e físico-químicas dos leites cru, recém pasteurizado e pasteurizado embalado, de uma indústria de laticínios, no Estado da Paraíba, foram avaliadas com o objetivo de certificar-se de que os mesmos atendiam aos padrões de qualidade estabelecidos pelo MAPA⁸.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

Amostras dos leites cru, recém-pasteurizado e pasteurizado embalado foram obtidas em uma indústria de laticínios no Estado da Paraíba. Essa indústria possui registro no Serviço de Inspeção Estadual e processa em média 12.600 litros de leite cru, por dia, para a obtenção de leite pasteurizado tipo C, sendo o mesmo recebido a granel, e proveniente de diferentes produtores e municípios do estado. Amostras foram coletadas semanalmente, no período de abril a julho de 2006. O experimento foi conduzido segundo o delineamento casualizado, com 14 repetições. Foi coletado um litro de leite cru no tanque de espera, um litro de leite recém-pasteurizado e de leite pasteurizado embalado (em sacos de polietileno). As amostras foram identificadas e transportadas até o laboratório em caixas isotérmicas contendo gelo. No laboratório, foram homogeneizadas e diluídas, utilizando-se solução salina peptonada 0,1%¹¹.

Métodos

Análises microbiológicas

As amostras foram submetidas às seguintes análises: contagem de bactérias mesófilas viáveis, determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e termotolerantes, pesquisa de *Escherichia coli*, pesquisa de *Salmonella* e contagem de *Staphylococcus coagulase-positiva* e negativa. A pesquisa de *E. coli* foi realizada de acordo com o método descrito no *Bacteriological Analytical Manual*¹⁰. As demais análises foram realizadas de acordo com a metodologia recomendada pelo MAPA¹¹.

Análises físico-químicas

A acidez titulável, em graus Dornic (°D), foi determinada por titulação com solução de NaOH 1N/9 e o pH foi determinado em potenciômetro¹². A pesquisa da enzima fosfatase no leite pasteurizado utilizou um "Kit" comercial para fosfatase (Bio-diagnóstica Indústria Química LTDA) sendo acompanhada por análise simultânea de amostras de leite cru, fervido e água destilada, sendo estes o controle. A pesquisa da enzima peroxidase foi realizada de acordo com a metodologia recomendada pelo Instituto Adolfo Lutz¹².

Análise estatística

Os resultados das contagens de microrganismos e das determinações de pH e acidez foram submetidos aos cálculos de média e desvio padrão, utilizando-se o programa Excell, 1998¹³. Os valores máximo e mínimo da série foram identificados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Características microbiológicas e físico-químicas de leite cru

O leite cru apresentou bactérias mesófilas viáveis em números elevados, sendo a média $5,4 \times 10^6$ UFC/mL, estando todas as amostras acima de 10^6 UFC/mL (Tabela 1), padrão recomendado pelo MAPA⁸. O Número Mais Provável de coliformes totais, nestas amostras, esteve acima de 10^3 NMP/mL (Tabela 1), indicando deficiências nas condições de higiene durante o processo de obtenção do leite. Os coliformes termotolerantes e *E.coli* foram encontrados, respectivamente, em 78,6% e 42,9% das amostras. Contagens de bactérias mesófilas viáveis e de coliformes no leite cru, acima dos limites estabelecidos pela legislação⁸, têm sido verificadas em diversas regiões do país^{14,15,16,17,18}, comprometendo a qualidade do produto final.

A média das contagens de *Staphylococcus* coagulase positiva no leite cru foi $3,9 \times 10^4$ UFC/mL (Tabela 1), estando abaixo do intervalo considerado significativo (10^5 - 10^6 UFC/mL) para causar intoxicação alimentar¹⁹. Embora a produção de enterotoxina estafilocócica seja comumente associada a *S. aureus* coagulase e termonuclease positiva, outras espécies de *Staphylococcus* (coagulase positivas e negativas) podem produzir enterotoxinas^{19,20,21}. A média da contagem de *Staphylococcus* coagulase negativa foi $2,7 \times 10^4$ (Tabela 1). Carmo et al.¹⁹ relataram um surto envolvendo *Staphylococcus* coagulase negativa em leite cru, com valores que excediam a 2×10^8 UFC/g. A ocorrência de mastite nos rebanhos e as condições higiênico-sanitárias insatisfatórias dos locais onde foram feitas as ordenhas são as hipóteses mais prováveis para a verificação da contaminação por *Staphylococcus* coagulase positiva e coagulase negativa.

Em nenhuma das amostras de leite cru foi detectada a presença de *Salmonella*. Oliveira²², não detectou *Salmonella* ao estudar as características microbiológicas em amostras de leite comercializado no Município de Piracicaba-SP.

Esses resultados indicam a necessidade de implementação ou revisão das práticas de higiene antes e durante a ordenha, adotadas pelos produtores, sendo importante um programa de conscientização dos envolvidos em todas as etapas do processo. A capacitação em organização social, administração e gerenciamento de propriedade rural, a ação mais efetiva dos órgãos competentes locais, como os da Vigilância Sanitária, Vigilância Epidemiológica e Secretaria da Agricultura e Abastecimento, e a divulgação de informações sobre a qualidade do leite e sua importância na saúde humana, são algumas das medidas que devem ser adotadas para a promoção da melhoria da qualidade da matéria-prima.

Com relação às características físico-químicas, as médias obtidas para acidez e pH do leite cru foram, respectivamente, 14,82°D e 6,72 (Tabela 2). Três amostras apresentaram acidez de 13°D, não atendendo a legislação⁸, que considera adequada a acidez do leite entre 14 e 18°D. Substâncias neutralizantes podem ser adicionadas ao leite para reduzir sua acidez com a intenção de fraude²³. Nesta pesquisa, não foram realizadas análises qualitativas para essas substâncias. O pH das amostras esteve situado no intervalo de 6,5 a 6,8, adequado para esse tipo de leite⁸.

Características microbiológicas e físico-químicas de leite recém pasteurizado

A contagem de bactérias mesófilas viáveis no leite recém pasteurizado variou de $1,4 \times 10^4$ a $5,8 \times 10^3$ UFC/mL, sendo a média de $1,4 \times 10^3$ UFC/mL (Tabela 1). Esses resultados estiveram abaixo do limite estabelecido pela IN51 (3×10^5 UFC/mL) para esse grupo de microrganismos em leite pasteurizado tipo C. A permanência de microrganismos viáveis nessas amostras pode ser devida à sobrevivência de bactérias termodúricas e/ou a recontaminação na seção de pré-aquecimento, bem como na seção de resfriamento do pasteurizador^{24,25}. Com relação à contagem de coliformes totais, 35,7% das amostras não atenderam a IN 51, que considera a pasteurização eficiente quando o número desses microrganismos

Tabela 1. Médias e desvios-padrões das análises microbiológicas dos leites cru, recém pasteurizado e pasteurizado embalado, processados em uma indústria de laticínios no estado da Paraíba.

Amostras	Contagem de bactérias mesófilas viáveis (UFC/mL)	Contagem de Coliformes Totais (NMP/mL)	Contagem de coliformes termotolerantes (NMP/mL)	Contagem de <i>Staphylococcus</i> coagulase Positiva (UFC/mL)	Amostras
Leite cru	$5,4 \times 10^6$ $\pm 2,9 \times 10^6$	$2,1 \times 10^5$ $\pm 3,1 \times 10^5$	$9,7 \times 10^4$ $\pm 1,4 \times 10^5$	$3,9 \times 10^4$ $\pm 9,0 \times 10^4$	$2,7 \times 10^4$ $\pm 1,7 \times 10^4$
Leite recém pasteurizado	$1,4 \times 10^3$ $\pm 1,6 \times 10^3$	ND	ND	ND	ND
Leite pasteurizado embalado	$1,4 \times 10^4$ $\pm 3,8 \times 10^4$	ND	ND	ND	ND

ND= Média não determinada

no leite recém pasteurizado não excede a 0,3NMP/mL. Os coliformes termotolerantes estiveram presentes em 4 amostras (28,6%), e *E.coli* foi confirmada em 2 (14,3%) das 14 amostras. As médias do NMP de coliformes totais e termotolerantes não foram determinadas porque em 9 das 14 amostras os resultados estiveram abaixo de 0,3NMP/mL. *Staphylococcus* coagulase negativa esteve presente em duas das 14 amostras, e *Staphylococcus* coagulase positiva em nenhuma das amostras. Por essa razão, não foram determinadas médias dessas contagens. Em nenhuma das amostras foi detectada a presença de *Salmonella*.

Com relação às análises físico-químicas, as médias obtidas para acidez e pH foram, respectivamente, 14,5°D e 6,69 (Tabela 2). A enzima fosfatase não foi detectada, indicando que a temperatura de pasteurização foi atingida²⁶. Em 4 amostras, a peroxidase não foi detectada, e em duas dessas, estiveram presentes coliformes e *Staphylococcus*, o que não deveria ocorrer, considerando que essas amostras foram superaquecidas e que essas bactérias são sensíveis as condições de tempo-temperatura da pasteurização²⁷. Isto evidencia que existiram problemas no pasteurizador, resultando na recontaminação do produto. Lamaita et al.²⁸ detectaram a enzima fosfatase em 7,5% das amostras de leite pasteurizado tipo C, e ausência da enzima peroxidase em 17,5%.

Análises microbiológicas de leite pasteurizado embalado

A contagem de bactérias mesófilas viáveis no leite pasteurizado embalado variou de $1,3 \times 10^2$ a $1,4 \times 10^5$ UFC/mL, sendo a média de $1,4 \times 10^4$ UFC/mL (Tabela 1). Esses resultados estiveram abaixo do limite estabelecido pela IN51 (3×10^5 UFC/mL) para esse grupo de microrganismos em leite pasteurizado tipo C. Quanto ao número de coliformes totais, os resultados variaram de abaixo de 3 a igual ou acima de $2,4 \times 10^3$ NMP/mL, tendo 9 amostras excedido ao limite máximo tolerado (4NMP/mL) para esse tipo de leite. Em 57,1% das amostras foi detectada a presença de coliformes termotolerantes, em números que excediam o limite máximo permitido (2NMP/mL). A presença de *Escherichia coli* foi confirmada em 35,7% das amostras. A contaminação do leite pasteurizado tipo C com coliformes termotolerantes também foi verificada por outros autores^{5,6,7}, em valores acima do padrão estabelecido pelo MAPA, colocando em risco a saúde dos consumidores. Em nenhuma das amostras foi detectada a presença de *Staphylococcus* coagulase positiva e *Salmonella*. Entretanto, *Staphylococcus* coagulase negativa esteve presente em 21,4% das amostras.

O pH e acidez médios do leite pasteurizado embalado foram, respectivamente, 14,5°D e 6,70 (Tabela 2). Quatro (28,6%) amostras apresentaram acidez abaixo de 14°D, não atendendo ao limite mínimo estabelecido pela legislação⁸. Caldeira et al.²³, ao avaliarem características físico-químicas de três marcas de leite pasteurizado tipo C, comercializadas em Belo Horizonte, observaram que a acidez foi a característica que apresentou maior coeficiente de variação, variando de 11,0 a 16,2°D. Esses

autores fizeram análises qualitativas para substâncias neutralizantes, mas essas não foram detectadas. Lamaita et al.²⁸ verificaram que a acidez titulável de 37,5% das amostras de leite pasteurizado tipo C, beneficiado em Minas Gerais, não atendeu a legislação brasileira.

CONCLUSÕES

As amostras de leite cru analisadas nessa pesquisa apresentaram contagens de bactérias mesófilas viáveis e o número de coliformes elevados, excedendo ao recomendado para um leite obtido em condições de higiene adequadas. 35,7% das amostras de leite tipo C recém-pasteurizado apresentaram coliformes totais, indicando falhas no processo de pasteurização. O teste da fosfatase não foi suficiente para avaliar o bom funcionamento do pasteurizador, sendo necessária à realização de análises microbiológicas de rotina do leite na saída do pasteurizador. O aumento no número de amostras que não atenderam aos limites máximos estabelecidos pela legislação, para coliformes totais, verificado nas amostras de leite pasteurizado tipo C embalado, indicou haver deficiências nas condições higiênico-sanitárias após a pasteurização do leite. A determinação de acidez titulável é um teste simples e rápido que fornece informações sobre a qualidade microbiológica e físico-química do leite.

REFERÊNCIAS

1. Garcia CA, Silva NR, Luquetti BC, Silva RT, Martins IP, Vieira RC. Influência do ozônio sobre a microbiota do leite "in natura". *Hig Aliment* 2000; 14(70): 36-50.
2. Paschoa MF. A importância de se ferver o leite pasteurizado tipo "C", processado por algumas mini e micro usinas de beneficiamento do estado de São Paulo. *Hig Aliment*. 1997; 11(50): 24-8.
3. EMBRAPA. Empresa Brasileira de Agropecuária. Disponível em: <http://www.cnpq.embrapa.br/leite/index.php>
4. Martins RS, Santos CV, Teixeira SR. Alterações da rede logística e expansão do mercado de leite longa vida no Brasil, 1999. Disponível em: <http://www.adae.ufla.br/>.
5. Cerqueira MMO, Souza MR, Fonseca ML. Características físico-químicas e microbiológicas de leite integral pasteurizado em propriedades rurais e colhido no comércio varejista da grande Belo Horizonte – MG. *Rev Inst Latic "Cândido Tostes"* 1997; 52 (299): 28-32.
6. Hoffmann FL, Garcia-Cruz CH, Vinturim TM, Fazio MLS. Microbiologia do leite pasteurizado tipo C, comercializado na região de São José do Rio Preto-SP. *Hig Aliment* 1999; 3 (65): 51-4.
7. Cordeiro CAM, Carlos LA, Martins ML. Qualidade microbiológica de leite pasteurizado tipo C, proveniente de micro-usinas de Campos dos Goytacazes, RJ. *Hig Aliment* 2002; 16 (92/93): 41-44.

8. Brasil 2002. Secretaria de Defesa Agropecuária do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 20 set 2002. Seção 1, p.13.
9. Silva WP. Caracterização fenotípica e genotípica de cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas de leite de vacas com mastite subclínica e de outras fontes em propriedades produtoras de leite. [Tese de Doutorado] – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.
10. Feng P, Weagant SD, Grant MA. Enumeration of *Escherichia coli* and the coliform bacteria. In: Jackson GJ, Merker RI, Bandler R, editors. Bacteriological Analytical Manual Online. General Guidelines/Procedures [cited 2005 sept5]. Available from URL: <http://www.foodinfonet.com/publication/fdaBAM.htm>.
11. Brasil 2003. Secretaria de Defesa Agropecuária do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 18 set 2003. Seção 1, p.14.
12. Instituto Adolfo Lutz. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. 3rd ed. São Paulo: O Instituto; 2005.
13. Neufeld JL. Estatística aplicada à administração usando Excel. São Paulo: Prentice Hall, 2003. 434p.
14. Brito MAVP, Brito JRF, Portugal JAB. Identificação de contaminantes bacterianos no leite cru de tanques de refrigeração. *Rev Inst Latic “Cândido Tostes”* 2002; 57(327): 83-8.
15. Nero LA. *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. em leite cru produzido em quatro Regiões leiteiras no Brasil: ocorrência e fatores que interferem na sua detecção. [Tese de Doutorado] – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.
16. Catão RMR, Ceballos BSO. *Listeria* spp., coliformes totais e fecais e *E.coli* no leite cru e pasteurizado de uma indústria de laticínios, no Estado da Paraíba (Brasil). *Ciênc e Tecnol Aliment* 2001; 21(3): 281-7.
17. Ramos MPP, Furtado MM, Junior JIR, Muller ES, Souza JG, Ladeira SA. Avaliação microbiológica de leite cru a granel e leite pasteurizado na Região de Viçosa - MG. *Rev Inst Latic “Cândido Tostes”* 2002; 57 (327):170-4.
18. Lange CC, Portugal JAB, Anna APS, Abreu ANI, Brito MAVP, Souza GN. Avaliação da contagem de bactérias mesófilas e psicotróficas no leite cru estocado a 4°C por 48 horas. *Rev Inst Latic “Cândido Tostes”* 2006; 61 (351): 185-7.
19. Carmo LS, Dias RS, Linardi VR, Sena MJ, Santos DA, Faria ME, et al. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. *Food Microbiol* 2002; 19 (1): 9-14.
20. Sena MJ. Perfil epidemiológico, resistência a antibióticos e aos conservantes nisina e sistema lactoperoxidase de *Staphylococcus* sp isolados de queijos coalho comercializados em Recife-PE. [Tese Doutorado] – Escola de veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2000. 75p.
21. Jay JM. Gastreenterite estafilocócica. In: Jay JM. Microbiologia de Alimentos. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. p.471-89.
22. Oliveira RP. Condições microbiológicas e avaliação da pasteurização em amostras de leite comercializadas no Município de Piracicaba - SP. [Dissertação de Mestrado] - Escola Superior de Agricultura – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.
23. Caldeira LA, Resende MFS, Viegas RP, Leite MO, Fonseca LM, Penna CFAM, Cerqueira MMOP, Souza MR. Avaliação da qualidade físico-química de leite pasteurizado tipo C comercializado em Belo Horizonte-MG. *Rev Inst Latic “Cândido Tostes”* 2006; 61 (351):107-10.
24. Fonseca LFL, Santos MV. Qualidade do leite e controle de mastite. São Paulo: Lemos Editorial, 2000. 175p.
25. Zocche F, Bersot LS, Barcellos VC, Paranhos JK, Rosa STM, Raymundo NK. Qualidade microbiológica e físico-química do leite pasteurizado produzido na Região oeste do Paraná. *Arch Veter Sci* 2002; 7 (2): 59-67.
26. Tronco VM. Manual para inspeção da qualidade do leite. 1nd ed. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria; 2003.
27. International Commission on Microbiological Specifications for Foods. Ecologia microbiana de los alimentos 2. Zaragoza: Acribia; 1980.
28. Lamaita HC , Hotta JM, Veras JF, Silva ACO, Souza MR, Cerqueira MOP, Penna CFAM, Almeida, MR, Mendes RPR. Segurança alimentar de leite pasteurizado tipo C beneficiado em Minas Gerais avaliado por parâmetros microbiológicos e físico-químicos. *Rev Inst Latic “Cândido Tostes”* 2002; 57(327): 297-300.

Pesquisa de anorexígenos e benzodiazepínicos em formulações emagrecedoras e avaliação de rotulagem, em análises da Seção de Farmacognosia do Instituto Adolfo Lutz no período de junho de 2004 a março de 2007

Detection of anorexigen and benzodiazepinic drugs in weight reducers compounded formulations and analysis on label contents adequacy by Pharmacognosy Laboratory - Instituto Adolfo Lutz, from June 2004 to March 2007

RIALA6/1156

*Helena Miyoco YANO, Ana Paula SANTOS, Adriana BUGNO, Mariangela Tirico AURICCHIO

* Endereço para correspondência: Instituto Adolfo Lutz Central, Seção de Farmacognosia, Av. Dr. Arnaldo 355, São Paulo, SP/ Brasil, CEP 01246-902, e-mail: heleyano@ial.sp.gov.br

RESUMO

A obesidade tem se tornando significante problema de saúde pública no Brasil. Atualmente, os produtos denominados “fórmulas emagrecedoras” são encontrados em profusão no mercado, com o argumento de promover redução de peso corpóreo. No período de junho de 2004 a março de 2007, foram efetuadas na Seção de Farmacognosia do Instituto Adolfo Lutz Central/ SP análises de 22 amostras de fórmulas para pesquisar a presença de anorexígenos (dietilpropiona, femproporex, mazindol) e benzodiazepínicos (clordiazepóxido, clonazepam, diazepam, bromazepam, lorazepam). Foi empregada a cromatografia em camada delgada comparativa frente aos respectivos padrões; a avaliação de conformidade da rotulagem foi realizada seguindo-se a legislação vigente. Os limites de detecção foram determinados para cada fármaco pesquisado, com os padrões utilizados na respectiva técnica de cromatografia. Três amostras apresentaram dietilpropiona ou diazepam com femproporex, as quais não estavam declaradas nos seus rótulos e nos rótulos de todas as amostras analisadas houve a menção da presença de substâncias laxantes. Das amostras analisadas, 16 estavam em desacordo com a legislação específica vigente quanto aos dizeres de rótulo. A associação de anorexígenos com benzodiazepínicos e laxantes, embora proibida pela legislação brasileira, é ainda encontrada nos produtos comercializados, constituindo-se importante risco à saúde dos usuários. Este fato merece assim, atenção especial e constante dos órgãos de fiscalização.

Palavras-chave. produto emagrecedor, anorexígeno, benzodiazepínico, limite de detecção, cromatografia em camada delgada comparativa, fraude.

ABSTRACT

Obesity has turned to be an important public health issue in Brazil. Nowadays, there are many products so called “weight reducer compounded pharmaceuticals” claiming effectiveness as weight reducers. From June 2004 to March 2007, the Pharmacognosy Laboratory of Instituto Adolfo Lutz analyzed 22 samples of compounded pharmaceuticals formulations in order to identify anorexigenic drugs (diethylpropione, fenproporex, mazindol and benzodiazepinic) drugs: (chlordiazepoxide, clonazepam, diazepam, bromazepam and lorazepam). The analysis was carried out using comparative thin layer chromatography technique. The label contents were also evaluated in accordance with Brazilian legislation. Detection limit was established to each analyzed compound in accordance with the respective reference standards. Although compound combination of anorexigen, benzodiazepinic and laxative agents are forbidden by Brazilian laws, three out 22 samples were positive for diethylpropione or diazepam with fenproporex. In addition, these substances were not mentioned in the label content. Sixteen samples were in disagreement regarding to the labeling requirements for omitting essential information. These findings showed that much concerns have to be taken by the rule authorities on these compounded pharmaceuticals in order to avoid harmful misuse.

Key words. weight reducer product, anorexigen, benzodiazepinic, detection limit, comparative thin layer chromatography, fraud.

INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), mais de um bilhão de pessoas no mundo estão acima do peso, e um total de 300 milhões são clinicamente obesas¹. No Brasil, estima-se que cerca de 40% da população adulta sofre excesso de peso e 11% são obesas². A obesidade pode ser definida como o acúmulo excessivo de gordura pelo organismo e, devido as proporções que vem atingindo, é considerada um problema de saúde pública no Brasil e em outros países^{1,3}. Sua incidência independe de fatores sócio-econômicos e as conseqüências observadas vão desde morte prematura ao desenvolvimento de doenças graves não letais, que afetam diretamente a qualidade de vida dos indivíduos¹.

As fórmulas emagrecedoras, ditos “produtos emagrecedores naturais”, se propõem a ser efetivas no tratamento de obesidade. Estas têm sido procuradas e difundidas entre os consumidores devido à existência de campanhas de propaganda em emissoras de rádio, televisão e internet⁴. A profusão destes produtos suscita a preocupação e a desconfiança de que substâncias anorexígenas e benzodiazepínicas possam ser utilizadas de maneira indiscriminada e por isso perigosa, uma vez que ambas são substâncias de uso controlado e com notificação especial e retenção de receitas, segundo preconiza o SVS/MS N° 344/98⁵.

Os anorexígenos são estimulantes do sistema nervoso central (SNC), e a perda de peso ocorre por supressão do apetite. Efeitos adversos no tratamento incluem potencial de abuso de droga, distúrbios de sono, palpitações, aumento da pressão arterial, secura na boca e depressão. Fazem parte desta classe a anfepramona (dietilpropiona), o femproporex, o mazindol dentre outros^{6,7}.

Os benzodiazepínicos são agentes ansiolíticos, depressores gerais não-seletivos do SNC. Fazem parte desta classe o clordiazepóxido, o diazepam e o lorazepam e são usados para reduzir a inquietação, tensão emocional e induzir sono e sedação. Doses elevadas causam dependência física e psíquica. O etanol pode potencializar a ação, resultando em overdose. Um efeito adverso é o estímulo do apetite, com conseqüente aumento de peso^{6,8}.

É proibida a associação de drogas em medicamentos e preparações magistrais que contenham anorexígenos associados entre si, ou com substâncias ansiolíticas, diuréticas, hormonais, extratos hormonais, laxantes, bem como qualquer outra substância medicamentosa segundo o Artigo 47 da Portaria SVS/MS N°344/98⁵, a RES. GMC n° 39/99⁹, a RES. CFM N° 1.477/97¹⁰ e a RES. CFF N° 273/95¹¹.

Muitos autores já verificaram a eficácia da cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) na identificação de substâncias anorexígenas e benzodiazepínicas em formulações emagrecedoras^{4,12}. Este método apresenta como vantagens rapidez, robustez, simplicidade, análise de amostras complexas sem pré-tratamento e baixo custo.

A Seção de Farmacognosia da Diretoria de Serviço de Medicamentos do Instituto Adolfo Lutz Central – SP tem recebido amostras de órgãos como Vigilância Sanitária, Prefeituras, Hospitais, Delegacias de Polícia e consultórios médicos, com solicitação de pesquisa da possível presença de benzodiazepínicos e anorexígenos em formulações emagrecedoras. Estas amostras geralmente são acompanhadas de queixas dos usuários relatando sinais e sintomas clínicos indesejáveis de onde decorre a suspeita da presença de tais fármacos, como possíveis adulterantes.

Este estudo tem como objetivo comunicar o compilado de resultados de análises de amostras de produtos emagrecedores com suspeita de adição não declarada de substâncias anorexígenas e benzodiazepínicas, recebidas na Seção de Farmacognosia do Instituto Adolfo Lutz durante o período de junho de 2004 a março de 2007 com base no limite de detecção (LD) determinados para cada fármaco, por cromatografia em camada delgada comparativa.

MATERIAL E MÉTODOS

Preparo da amostra

Análise por cromatografia em camada delgada

As amostras foram extraídas de acordo com metodologia descrita por Auricchio et al. 1991¹². Cerca de 500mg da amostra foi transferida para um béquer juntamente com 15,0mL de solução de ácido clorídrico 3 M, mantida em banho ultra-som por 5 minutos, após o que foi filtrada através de algodão para funil de separação. Foi realizada a extração do filtrado com três porções de 10mL de clorofórmio, sendo estas reunidas e filtradas sobre sulfato de sódio anidro. As frações tiveram o solvente evaporado à secura e o resíduo foi ressuspensionado em aproximadamente 0,5mL de clorofórmio (extrato 1). A fase aquosa ácida que permaneceu no funil de separação foi alcalinizada com hidróxido de amônio, seguida de extração com clorofórmio e ressuspensionada conforme o procedimento descrito anteriormente, obtendo-se o extrato 2.

Foram utilizados os seguintes padrões: diazepam, bromazepam, clonazepam, lorazepam, cloridrato de clordiazepóxido, femproporex, mazindol e cloridrato de anfepramona (obtidos de fabricantes de medicamentos e acompanhados de certificado de análise) na concentração de 1 % (p/v) em álcool etílico PA. Os padrões e os extratos obtidos no preparo das amostras foram analisados por cromatografia em camada delgada comparativa utilizando-se placas de gel de sílica G60 Merck® (20 x 20 cm) com 0,25mm de espessura. A análise foi realizada em triplicata com desenvolvimento ascendente utilizando três sistemas de solventes para a eluição:

- Eluente 1: acetato de etila: metanol: hidróxido de amônio (85:15:10, v/v/v);
- Eluente 2: ciclohexano: tolueno: dietilamina (75:15:10, v/v/v) e

- Eluente 3: ciclohexano: clorofórmio: dietilamina (70:20:10, v/v/v).

Após a eluição e a evaporação do solvente a temperatura ambiente, as placas foram reveladas com solução de iodoplatinado acidificado (manchas violáceas) e solução de Dragendorff (manchas acastanhadas)¹³. A verificação da presença ou não de anorexígenos e benzodiazepínicos foi realizada comparando-se o Rf(s) e cor da(s) mancha(s) das amostras com as dos padrões testados.

Determinação do limite de detecção

O limite de detecção (LD) foi determinado para cada padrão baseando-se na avaliação visual da mancha na menor quantidade de massa conhecida por cromatografia em camada delgada¹⁴.

Cada padrão foi pesado e transferido quantitativamente para balão volumétrico e diluídos com álcool etílico PA, obtendo-se soluções de concentrações de 0,5mg/mL. Estas foram aplicadas em volumes de 1 a 5µL que correspondem a quantidade em massa de 0,5 a 2,5µg, em placas de gel de sílica G 60 Merck®, com auxílio de microseringa. Quando necessário, foi realizada diluição 1:10 da solução inicial. A determinação do LD foi realizada em triplicata utilizando-se o eluente 1, com saturação prévia da cuba de 1 hora, desenvolvimento ascendente e percurso de 10cm. Após a evaporação do solvente a temperatura ambiente, a placa foi revelada com solução de Dragendorff¹³. O LD foi determinado pelo estabelecimento do menor nível de concentração para o qual a revelação, a coloração da substância revelada na cromatografia foi visualizada com confiabilidade.

Especificidade

A especificidade foi determinada preparando-se uma amostra placebo com componentes comuns nas formulações analisadas, tais como gelatina, glucomanan, amido de milho, cáscara sagrada, fucus vesiculosus, sene, spirulina, sene, quitosana, castanha da índia, vitamina C em proporções semelhantes de cada componente e analisadas de acordo com o método empregado.

Análise de rótulo

A análise de rótulo das amostras foi realizada seguindo-se a legislação vigente: RDC n°33/2000¹⁵ para formulações manipuladas, RDC n° 333/2003¹⁶ para formulações industrializadas e do Código de Defesa do Consumidor¹⁶.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 22 amostras analisadas, 6 foram provenientes de análises fiscais e 16 de orientações, 4 de formulações farmacêuticas industrializadas e 18 de formulações magistrais. As formulações declaravam conter em geral gelatina,

glucomanan, carboximetilcelulose, cáscara sagrada, sene, quitosana, castanha da índia, vitamina C entre outros, cujo placebo analisado com o método empregado não revelou manchas com mesmo aspecto, coloração e RF dos padrões utilizados.

O resultado dos limites de detecção dos padrões de benzodiazepínicos e anorexígenos analisados estão na Tabela 1 e variaram desde 0,05µg até 1,5µg.

Os resultados da Tabela 1 mostraram as quantidades mínimas (LD de benzodiazepínicos e anorexígenos) capazes de ser detectadas na técnica cromatográfica utilizada neste trabalho.

Das 22 amostras analisadas, uma foi considerada insatisfatória por conter anfepramona e duas outras por revelarem presença de femproporex e diazepam, sem estarem declarados na formulação e associados a drogas vegetais laxantes, como sene (*Senna alexandrina*) ou cáscara sagrada (*Rhamnus purshiana*), em desacordo com o Artigo 47 da Portaria SVS/MS N°344/98⁵ e a Resolução n° 39/99⁹. Na Portaria SVS/MS N°344/98⁵ o diazepam consta na Lista-B1 (Lista das Substâncias Psicotrópicas, sujeitas a Notificação de Receita “B”) e a anfepramona e o femproporex, na Lista – B2 (Lista das Substâncias Psicotrópicas Anorexígenas, Sujeitas a Notificação de receita “B”), portanto obrigatoriamente devem estar declaradas no rótulo. Segundo resolução do Conselho Federal de Medicina¹⁰ (CFM N°1.477) o uso de substâncias tipo anfetaminas, isoladamente ou em associação com benzodiazepínicos, diuréticos, hormônios, laxantes, com finalidade exclusiva de tratamento da obesidade ou emagrecimento não possuem fundamentação científica e têm causado graves riscos à saúde humana, podendo inclusive provocar dependência.

Quanto à análise de rótulo, cinco amostras (23%) ficaram prejudicadas devido a Vigilância Sanitária coletar amostra a granel e acondicionar diretamente em invólucro plástico lacrado. Apenas uma amostra teve resultado satisfatório e dezesseis

Tabela 1. Limite de detecção de benzodiazepínicos e anorexígenos por cromatografia em camada delgada comparativa.

Padrões	Limite de detecção (µg)	Rf
Diazepam	0,3	0,90
Lorazepam	1,5	0,70
Clonazepam	1,5	0,82
Bromazepam	0,5	0,83
Cloriazepóxido	0,5	0,77
Femproporex	0,5	0,91
Mazindol	0,3	0,84
Anfepramona	0,05	0,92

Placa de gel de sílica G 60; Eluente: acetato de etila:metanol:hidróxido de amônio (85:15:10, v/v); Revelador: solução de Dragendorff. Cor das manchas: acastanhadas.

(72%) foram consideradas insatisfatórias. As infrações mais freqüentes verificadas no ensaio foram as ausências de: nome do prescritor, nome do paciente, posologia, gênero e espécie da droga vegetal em questão e CNPJ do estabelecimento comercial ou produtor e por constar indicação terapêutica, fato grave por induzir a automedicação. Foi observada a ocorrência de formulações magistrais declarando conter tiratricol, utilizado como um hormônio tireoidiano, e cujo registro já foi cancelado pela ANVISA¹⁸, em razão de uso indiscriminado para o tratamento da obesidade. Neste caso não foi realizada análise de identificação de tiratricol devido ao laboratório não dispor do padrão.

Nas três amostras que tiveram resultados insatisfatórios por conterem substâncias como anfepramona, diazepam e femproporex, não declaradas no rótulo e todas contendo laxantes na formulação, não constavam no rótulo da embalagem destas, o endereço comercial e CNPJ de seus fabricantes. A falta de tais informações essenciais dificultam ou até mesmo impedem a ação fiscalizatória da autoridade. No caso das preparações magistrais a presença do nome do prescritor e do paciente é fundamental para mostrar que a mesma foi individualizada, conforme preconiza a legislação. A ausência destas duas informações, ao contrário, podem indicar que a preparação foi fabricada e não manipulada, em quantidades mais próximas da semi-industrialização. Há que se levar em conta também que a amostragem enviada ao laboratório é muito pequena diante da quantidade que é oferecida no comércio.

CONCLUSÃO

Produtos contendo anorexígenos e benzodiazepínicos em associação com drogas vegetais laxativas ainda podem ser encontrados à venda ou distribuídos de forma fraudulenta e em total desacordo com a legislação. Este fato constitui sério risco à saúde em razão dos efeitos colaterais que o uso indiscriminado destas substâncias pode acarretar. Logo, produtos manipulados ou não, utilizados na redução de peso merecem atenção especial dos órgãos de fiscalização a fim de controlar o emprego das substâncias da Lista B1 e B2 da Portaria 344 de 12 de maio de 1998.

AGRADECIMENTO

As autoras agradecem a todos os funcionários da Seção de Farmacognosia pela colaboração nas atividades realizadas neste trabalho.

REFERÊNCIAS

1. Obesity. Acesso em: 25 abr 2007. Disponível em <<http://www.who.int/topics/obesity/em/>>.
2. IBGE. Pesquisa de orçamentos familiares - POF2002-2003. Excesso de peso atinge 38,8 milhões de brasileiros adultos. Comunicação Social de 16 de dezembro de 2004. Acesso em 04 abr 2007. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=278>.
3. Pereira LO, Franchini RP, Lancha Jr, AH. Obesidade: hábitos nutricionais, sedentarismo e resistência à insulina. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2003, 47(2), 111-27.
4. Azevedo FS, Guimarães RI, Paula JR, Cunha LC. Validação de técnica analítica em cromatografia em camada delgada comparativa para identificação de fármacos anorexígenos sintéticos em produtos fitoterápicos. *Infarma* 2005, 17 (5/6), 86-8.
5. Brasil. Portaria n° 344, de 12 de maio de 1998 da Secretaria da Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Regulamento Técnico sobre substâncias e medicamentos sujeitos a controle especial. Acesso em 03/04/2007. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=17235&word=3>.
6. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. Fármacos ansiolíticos e hipnóticos In: *Farmacologia*, 5 edição. Rio de Janeiro: Elsevier; 2004. p. 589-595.
7. Hoffman BB, Lefkowitz RJ. Catecholamines, Sympathomimetic Drugs, and Adrenergic Receptor Antagonists. In: Hardman JG, Limbird LE. Goodman & Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 9ª edição. New York: McGraw Hill, 1996. p.224.
8. Hobbs WR, Rall TW, Verdoorn TA. Hypnotics and Sedatives; Ethanol. In: Catecholamines, Sympathomimetic Drugs, and Adrenergic Receptor Antagonists. In: Hardman JG, Limbird LE. Goodman & Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 9ª edição. New York: McGraw Hill, 1996. p. 362-386.
9. MERCOSUL/GMC/RES. N.º 39/99 Regulamento Técnico Sobre Associações de Drogas em Medicamentos e Preparações Magistrais que contenham Anorexígenos Acesso em 04 abr. de 2007. Disponível: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/mercosul/39_99.htm>.
10. Brasil. Resolução n° 1477, de 11 de julho de 1997 do Conselho Federal de Medicina. Dispõe sobre o uso de substâncias tipo anfetaminas, isoladamente ou em associação com benzodiazepínicos, diuréticos, hormônios e laxantes, com finalidade exclusiva de tratamento de obesidade ou emagrecimento. Acesso em 04 abr 2007. Disponível em: <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=6320>.
11. Brasil. Resolução CFF n° 273, 30 de agosto de 1995 do Conselho Federal de Farmácia. Dispõe sobre manipulação medicamentosa. Acesso em 04 abr 2007. Disponível em <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=6320>.
12. Auricchio MT, Bactistic MA, Markman BEO. Detecção de anorexígenos e benzodiazepínicos em formulações "naturais" empregadas em regime de emagrecimento. *Rev Inst Adolfo Lutz* 1990; 51(1/2): 105-10.
13. Moffat AC, Editor. Clarke's isolation and identification of drugs. 2nd ed. London: The Pharmaceutical Press; 1986, 1223 p.

14. Ribani M, Bottoli CBG, Collins CH, Jardim ICSF, Melo LFC. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quim Nova* 2004; 27(5): 771-80.
15. Brasil. Resolução RDC nº 33, de 19 de abril de 2000 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Regulamento Técnico sobre Boas Práticas de Manipulação de Medicamentos em farmácias. Acesso em 04 abr 2007. Disponível em <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=16678&Word=>.
16. Brasil. Resolução RDC nº 333, de 19 de abril de 2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Dispõe sobre rotulagem de medicamentos e outras providências. Acesso em: 04 abr 2007. Disponível em <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=15220&Word=>.
17. Brasil. Lei nº 8.078, de 11 de setembro de 1990 da Presidência da República: Subchefia para Assuntos Jurídicos. Código de Defesa do Consumidor. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, v. 128, nº 176, supl., p. 1, 12 set. 1990.
18. Anvisa suspende tiratricol. Acesso em: 04 abr 2007. Disponível em http://www.endocrino.org.br/noticia_c_exibe_be.php?id=.

Molecular surveillance of an imported measles virus infection in Sao Paulo, Brazil

Vírus do sarampo: vigilância molecular de um caso importado em São Paulo, Brasil

RIALA6/1157

*Maria Isabel de OLIVEIRA¹, Ana Maria Sardinha AFONSO¹, Cristina Adelaide FIGUEIREDO¹, Ana Lucia FRUGIS YU², Suely Pires CURTI¹

¹Endereço de correspondência: Instituto Adolfo Lutz, Serviço de Virologia- Av. Dr. Arnaldo 355, CEP 01242-902, São Paulo, SP/Brasil. Fone (055 11) 3068.2903 e-mail: olive40@uol.com.br

²GT, Exantemáticas/Ministério da Saúde/São Paulo/Centro de Vigilância Epidemiológica/DDTR, São Paulo, SP/ Brasil. Recebido:14/02/2008 – Aceito para publicação: 06/03/2008

RESUMO

No estado de São Paulo, Brasil, em função da eficiente estratégia para a vigilância do vírus do sarampo (VS), não houve registro de casos nativos de sarampo no período de 2001 a 2007. No estado de São Paulo foram registrados casos de sarampo importados, sendo 01 paciente em 2001, outro em 2002 e em 2005 foi alvo de investigação uma criança não vacinada, de 18 meses de idade com exantema e febre, que foi admitida em hospital privado. O Centro de Vigilância Epidemiológica descobriu que o irmão desta criança teve uma doença semelhante uma semana antes. A infecção pelo vírus do sarampo foi confirmada no Instituto Adolfo Lutz pela detecção de anticorpo IgM anti-VS, isolamento do vírus por meio de cultivo em células Vero/hSLAM e amplificação de RNA viral por RT-PCR. A região do gene da nucleoproteína do vírus isolado foi amplificada. O resultado da análise filogenética mostrou que o vírus isolado correspondeu ao genótipo D5. Este genótipo circula no continente da Ásia e há relatos sobre sua anterior circulação em São Paulo.

Palavras-chave. vírus do sarampo, vigilância do sarampo, genótipo do vírus do sarampo.

ABSTRACT

Owing to the efficient strategies for measles virus (MV) surveillance in São Paulo State, Brazil, no circulation of native measles virus was registered during the period from 2001 to 2007. In Sao Paulo State the imported measles cases were registered, being one in 2001, one in 2002, and in 2005 an unvaccinated 18-month-old child presenting fever and exanthema admitted to a private hospital was the target of epidemiological study. The Center of Epidemiological Surveillance found out that a brother of this child had had a similar disease one week before. The measles virus infection was confirmed at Adolfo Lutz Institute by detecting the MV-specific IgM antibody, by virus isolation on Vero/hSLAM cells culture, and by means of MV-RNA amplification on RT-PCR technique. A region of nucleoprotein gene from isolated virus was amplified. The phylogenetic analysis data showed that the isolated virus corresponded to genotype D5. This genotype circulates in the Asian continent, and it had circulated before in Sao Paulo State.

Key words. measles virus; measles surveillance; measles virus genotype

INTRODUCTION

In Brazil the goal of interrupting the transmission of endemic measles virus (MV) by the end of 2000 using strategies developed by the Pan American Health Organization (PAHO), which included recommendations for vaccination activities, intended to achieve high population immunity together with sensitive surveillance for suspected measles cases, including effective virological and serological surveillance^{1,2}. However

this strategy was not implemented in many countries of worldwide and measles outbreaks continued occurring^{3,4,5}.

Analysis of the variability in the nucleotide sequences of wild type Measles Virus (MV) has enabled the use of molecular epidemiologic techniques for measles surveillance. The molecular data, when used in conjunction with standard case reporting and investigation, can help to identify epidemiological links between geographically distinct cases and outbreaks as well as track importations

of measles⁶ Also, approximately 5% of vaccine recipients experience mild symptoms (rash and fever) after vaccination and some of these cases could be misclassified as wild-type measles. Genetic characterization of viral isolates or RT-PCR products is the only laboratory test that can differentiate between vaccine associated cases and wild-type infection⁷.

The virological surveillance carried out in the late 1980s and 1990s increased substantially the number of genotypes detected in cases outbreaks to eight clades designated from A to H including 23 genotypes recognized by the World Health Organization⁸. However, some genotypes (B1, D1, E, F, and G1) have not been detected in the last 15 years and are considered inactive⁹.

In this study we investigated by serologically, isolation of the virus and the filogenetic analysis an imported case of the measles virus in Sao Paulo.

MATERIALS AND METHODS

Epidemiological history

On June 17th, 2005 during an airplane trip a sportsman who was returning home from a 14-day-long stay in the Asian continent (Maldives) after serological tests, he was diagnosed as having measles some days later. In same flight from Sao Paulo to Florianopolis the transmission occurred to a 5-year-old child¹⁰.

Patient

On July 15th, 2005 an unvaccinated 18-month-old child was admitted to a private hospital to investigate a febrile rash. The epidemiological investigation carried out by the Center of Epidemical Surveillance uncovered that this child was infected by his 5-year-old brother who had had a similar disease one week before during an airplane trip.

Specimen collections

A blood sample was analyzed at the Adolfo Lutz Institute, state of Sao Paulo, Brazil. Measles infection was serologically confirmed as IgM-positive using IgM ELISA Test commercial Kit (Behring Diagnostics Gmb H Marburg). Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were purified from whole blood by using Ficol-Hypaque gradient centrifugation for virus isolation.

Virus Isolation

The specimens were added onto a Vero/hSLAM cells¹¹ recommended by Ronveaux et al¹² to isolate MV. The cell cultures were infected with 200ul of PBMC and maintained in DMEM plus and 2% fetal calf serum incubate at 37°C. After two passages in cell cultures about 75% for characteristic cytopathic effect (CPE) was observed. Next, the cells were centrifuged and RNA was extracted from the cell pellet.

RT-PCR and Sequencing

RNA was extracted using TRIZOL reagent (Invitrogen, Carlsbad, Calif, USA), and reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to amplify either the 550-nucleotide (nt) coding for the COOH terminus of nucleoprotein (N)¹³. The reaction products were analyzed by using the DyeDeoxy terminator sequencing Kit in an ABI automatic 373 DNA sequencer (Applied Biosystems Ltd.,UK). Phylogenetic trees were constructed either by maximum likelihood(ML) analysis was carried out wit the PAUP 4.0 b10 (Sinauer Associate, Inc., Sunderland, MA, USA).

RESULTS

In 2005 and 2006 at the Adolfo Lutz Institute analyzed a total of 1.011 and 968 samples respectively, for measles specific antibodies by Elisa and two positive cases were confirmed in Sao Paulo. The genetic characterization was possible only one case during commercial air trips to Sao Paulo because the other child was diagnosed some days after the onset of symptoms. The results of the 18-month-old child indicated positive for measles-specific immunoglobulin (IgM) and were confirmed by positive virus isolation. The sequence coding for the carboxyl terminus of the nucleoprotein (243) nucleotides of this isolate was compared with the sequences of the GenBank reference strains (Table 1). The results indicated that this virus had identical N gene sequence and were member of genotype D5 (figure1). The sequence of Mvi/Sao Paulo.BRA/05 has been deposited in GenBank (accession number EF151191)

DISCUSSION

In Brazil measles has bend notifiable disease since 1968. With the adaptation of the Measles Elimination Plan in 1992, the national immunization campaign showed coverage of 96%, in 1995, 77% and 2000, 100%¹⁴. After the last epidemic in 1997, the experience was particularly instructive as a means to evaluate the surveillance system and Adolfo Lutz Institute, which is the reference state laboratory. Although Sao Paulo is the largest state in Brazil, with a population of 37 million people (IBGE 2007), the good strategies adapted for measles elimination were successful. From 2001 to 2006 no indigenous measles case was reported and only 3 imported cases two from Japan in 2001 and 2002 group D5¹⁵, and one from Asia (2005) group D5 were registered. Measles imported-associated outbreaks continue to occur sporadically because of the persistence of endemic measles in other countries and the high volume of international trips. This fact strengthens the importance to continue measles surveillance and to investigate coverage in order to determine whether new policies are needed for the elimination of measles in the world.

Table 1. Characteristics of MV strains/isolates subjected to phylogenetic analysis

Isolation year	Genotype	Strain/isolate	Locatlity	Acc. No.
1954	A	Edm wt	USA	U01987
1990	C2	MVi/Vic.AU/3.90	Victoria, AUS	AF243460
1990	C2	Erlangen.DEU/90 “wtf”	Erlangen, DEU	X84872
1991	C2	MVi/Vic.AU/5.91	Victoria, AUS	AF243462
1992	C2	Prague243/92	Prague,CZN	Y17027
1993	D6	Stuttgart/2/93	Stuttgart, DEU	Y13825
1993	D5	Palau.BLA/93	Palau,BLA	L46758
1993	D5	Bangkok. THA/93/1	Bangkok,THA	AF079555
1994	D3	Taipeh.TWN/94	Taipeh, TAW	AJ250068
1994	D6	Sma94B	SPA	X84864
1995	D6	High Wycombe/234/95	High Wycombe, UNK	U29302
1997	D6	Novosibersk/97	Wroclaw, RUS	Y17032
1997	D3	MVi/OSaka C.JPN/17.97	Osaka, JAP	AB088149
1997	H1	MVi/Ámsterdam.net/27.97	China,JAP	AF193512
1997	C2	Funen 9/97	Funen, DEN	Y17025
1997	D6	BRA/42.97/35175	São Paulo, BRA	AF495863
1997	D6	Angra dos Reis/485/97	Angra dos Reis, BRA	AJ272480
1998	D6	Wroclaw/98	Wroclaw,POL	Y17026
1998	D5	MVs/Vic.AU/52.98	Victoria, AUS	AF243473
1998	D5	MVs/Vic.AU/51.98	Victoria, AUS	AF243472
1998	D5	MVs/Vic.AU/27.98	Victoria, AUS	AF243471
1998	D4	Amsterdam.Net/3.98	Nepal,DEU	AF193513
1999	D4	Pokhara.NEP/5.99	Pokhara, NEP	AJ250073
1999	D8	Janakpur.NEP/2.99/2	Janakpur, NEP	AJ250070
1999	D8	Janakpur.NEP/2.99/1	Janakpur, NEP	AJ250069
2001	H1	MVs/Toyota C.JPN/30.01	Toyota, JAP	AB104874
2001	D5	MVi/Sapporo.JPN/19.01	Sapporo, JAP	AB104876
2001	D5	MVi/São Paulo.BRA/01	São Paulo, BRA	AY425711
2001	D3	MVi/Okinawa.JPN/21.01	Okinawa, JAP	AB104875
2005	D5	*MVi/São Paulo.BRA/05	São Paulo, BRA	EF151191

(*) porposed genotype

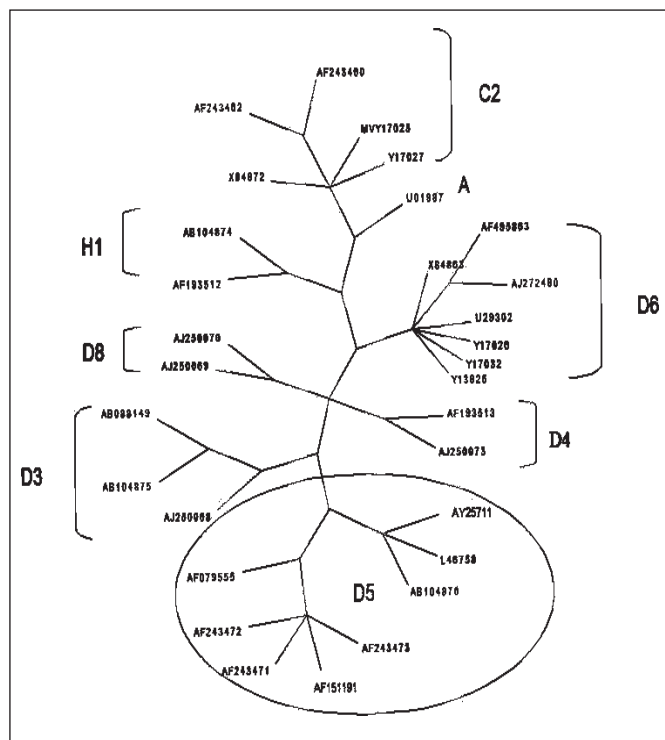


Figure 1. Phylogenetic analysis of 243nt of nucleoprotein gene of Measles Virus (MV) isolates circulating in São Paulo, Brazil. MV clustered in eighth genotypes: A, C2, D3, D4, D5, D6, D8, H1. Numbers refer to strains in Table 1.

ACKNOWLEDGMENT

The authors thanks Maria Anice Mureb Sallum PhD for the phylogenetic analysis, Departamento de Epidemiologia, Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, SP, and Marcia Theobaldo for the serological diagnosis of the measles and rubella virus. Adolfo Lutz Institute, São Paulo, Brazil.

REFERENCES

1. Dietz V, Rota J, Izurieta H, Carrasco P, Bellini W. Laboratory confirmation of suspected measles in settings of low measles transmission: conclusions from the experience in the Americas. *Bull World Health Organiz* 2004; 82:11.
2. Muller CP, Kremer JR, Best JM, Dourado I, Triki H, Reef S et al. Reducing global disease burden of measles and rubella:

- Report of the WHO steering Committee on research related to measles and rubella vaccines and vaccination, 2005. *Vaccine* 2007; 25: 1-9.
3. Gioula G, Papa A, Exindari M, Melidou A, Chatzidimitriou D, Karabaxoglou D et al. Greek measles epidemic strain, 2005-2006. *Epidemiol Infect* 2006; 12: 1-4.
4. Siedler A, Tischer A, Mankertz A, Santibanez S. Two outbreaks of measles in Germany 2005. *Eurosurveillance* 2006; 11: 131-4.
5. Chironna M, Prato R, Sallustio A, Martinelli D, Germinario C, Lopalco P et al. Genetic characterization of measles virus strains isolated during an epidemic cluster in Puglia, Italy 2006-2007. *Virology* 2007; 21: 4:90.
6. Mulders MN, Truong AT, Muller CP. Monitoring of measles elimination using molecular epidemiology. *Vaccine* 2001; 19: 2245-9.
7. Rota PA, Liffick SL, Rota JS, Redd S, Papania M, Bellini WJ. Molecular epidemiology of measles viruses in the United States, 1997-2001. *Emerg Infect Dis* 2002; 8: 902-8.
8. World Health Organization. Weekly Epidemiol Record. Global distribution of measles and rubella genotypes update. 2006; 81:474-9.
9. Riddell MA, Rota JS, Rota PA. Review of the temporal and geographical distribution of measles virus genotype in the prevaccine and postvaccine eras. *Virology* 2005; 87: 1-9.
10. Barros AFR, Segatto TC, Luna E, Darnovaro-Holliday MC, Vicari A et al. Measles transmission during commercial air travel in Brazil. *J Clin Virol* 2006; 36: 235-6.
11. Ono N, Tatsuo H, Hidaka Y, Aoki T, Minagawa H, Yanagi Y. Measles viruses on throat swabs from measles patients use signaling lymphocytic activation molecule (CDw150) but not CD46 as a cellular receptor. *J Virol* 2001; 75: 4399-401.
12. Ronveaux O, Rickert D, Hadler S, Groom H, Lloyd J, Bchir A et al. The immunization data quality audit: verifying the quality and consistency of immunization monitoring systems. *Bull World Health Organ* 2005; 83: 503-10.
13. Liffick S, Thoung N, Xu W, Li Y, Lien HP, Bellini WJ, Rota PA. Genetic characterization of contemporary wild-type measles viruses from Vietnam and the people's Republic of China: identification of two genotypes within clade H1. *Virus Res* 2001; 77: 81-7.
14. Prevots DR, Parise MS, Segatto CV, Siqueira MM, Santos ED, Ganter B et al. Interruption of measles transmission in Brazil, 2000-2001. *J Infect Dis* 2003; 187: S111-20.
15. Oliveira MI, Curti SP, Figueiredo CA, Afonso AMS, Sallum MAM, Durigon EL. Molecular analysis of a measles virus isolate from Brazil: a case originating in Japan. *Acta Virol* 2004; 48: 9-14.

Nutritional labeling of sweet and salted foods consumed by children and adolescents

Lobanco, CM. **Rotulagem nutricional de alimentos salgados e doces consumidos por crianças e adolescentes.** São Paulo, SP/Brasil, 2007. [Dissertação de Mestrado – Área: Nutrição – Faculdade de Saúde Pública – Universidade de São Paulo, SP/Brasil] Orientadora: Profa. Dra. Deborah Helena Markowicz Bastos

The consumers have the right to informations about both the characteristics and the nutritional composition of the foods they buy, allowing them for healthy choices. Therefore, the Sanitary Inspection National Agency (ANVISA) makes nutritional labeling of the commercialized foods obligatory. Must be informed, among the nutritional informations, the following nutrients rates: carbohydrates, proteins, total fats, saturated fats, trans fats, sodium, alimentary fibers, and caloric value. The purpose of this work was to evaluate the conformity of nutritional data present in the labels of some packed foods, normally consumed by children, its experimental value being obtained by means of analyses by official methods, leading to an evaluation of the quality of the information available to the consumer. The data declared in foods labels were compared with those obtained in the laboratory. Some packed foods consumed by children were choose, like corn and wheat products of different flavors and forms, some types of potato chips, peanuts, filled biscuits, wafer biscuits, and filled milk chocolate, both in bars and in bonbons. The rates of proteins, total fats, saturated fats, alimentary fibers and sodium were evaluated utilizing the methods described in the “Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz”. The value for carbohydrates was calculated by the difference between 100 and total amount of humidity, ash, proteins, total fats and alimentary fibers, according to the Resolution 360 of ANVISA. The caloric value was calculated utilizing the Atwater factors. The data were treated statistically by the distribution of percent frequency. The non-compliance of the protein rates declared on the nutritional labeling oscillated between 0 to 50%, with the highest index in the potato chips, that of carbohydrates varied between 0 and 40%, with the highest indexes found in

peanuts and wheat snacks, that of saturated fat, 12 to 41%, the highest indexes being found in potato chips, peanuts and corn snacks, whilst fiber presented non-compliance going from 8 to 69%, whereby all products did not comply, total fats, 0 to 85%, the highest index found in the corn snacks. About the sodium, the disapproval interval oscillated between 12 and 72%. With regard to the sweet products, the condemnation interval for total fats oscillated from 0 to 75%, the highest percent rate being found in the chocolate bonbons. Saturated fats presented a disapproval interval between 0 to 52%, the widest one found in the filled biscuits. As for fibers, the disapproval interval went from 0 to 36%, the highest percent rate being found in the chocolate bonbons. The protein disapproval interval oscillated from 10 to 40%, the highest being in the filled milk chocolate bars and in the bonbons. Among the analyzed products, potato chips, corn snacks, and peanuts presented the highest disapproval rates by the parameters of proteins, carbohydrates, fiber, and saturated fat, where the rates of saturated fat acids and fiber stood out. Among the sweet products, chocolate bonbons, filled biscuits and wafer biscuits were the most condemned according to the parameters of total fats, saturated fats and fiber, leading to a preoccupation about the daily ingestion of these products by children and adolescents.

Dissertação disponível na Biblioteca da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo e Biblioteca do Instituto Adolfo Lutz
E-mail: cmlobanco@ial.sp.gov.br

ISSN 0073-9855



9 770073 985009