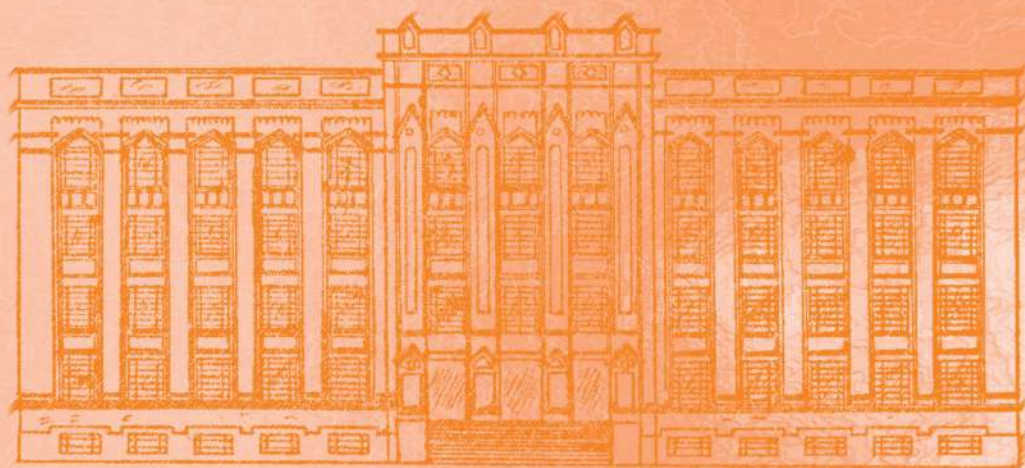


REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ

ISSN 0073-9855
RIALA6



Volume 66 número 3, 2007



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 66 número 3, 2007

ISSN 0073-9855

Setembro – Dezembro - 2007

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 Atui

Conselho Editorial/Editorial Board

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

Lígia Bicudo de Almeida Muradian, São Paulo, Brasil.
Luz Elena Cano Restrepo, Medellín, Colômbia.
Maria José Mendes Gianini, Araraquara, Brasil.
Marluce Bibbo, Pennsylvania, EUA.
Martin Emilio Munk, Copenhagen, Dinamarca.
Myrna Sabino, São Paulo, Brasil.
Paul W. Flinn, Kansas, EUA.
Pedro Paulo Chieffi, São Paulo, Brasil.
Regina Máura 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

1941-2006,
2007, 66 (3)

ISSN 0073-9855
RIALA 6

CDD₁₈ 614.07205

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

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

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

Endereço/Address

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

Apoio:



Ministério
da Educação

Ministério da
Ciência e Tecnologia



INSTRUÇÃO AOS AUTORES

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

7.4. Relato de caso: contempla principalmente a área médica, em que o resultado é anterior ao interesse de sua divulgação ou a ocorrência dos resultados não é planejada. Inclui novas técnicas, terapias, diagnóstico, patologias, materiais e soluções inovadoras para problemas especiais, fenômenos anômicos e fisiológicos. Deve conter os tópicos: título e resumo

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

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

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

8. Preparação do manuscrito ou artigo

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

Estrutura

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

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

Palavra-chave: podem ser utilizados até seis descritores que identifiquem o conteúdo do artigo, se possível baseados no DECS (Descritores em Ciências da Saúde), disponível no www.bireme.br terminologia em saúde e consulta ao DECS ou na *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: URL: <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 Biblio-teca 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://www.ial.sp.gov.br/publicacoes>

Artigos de Revisão/ Review Articles

- 1130 **The use of stem cells in heart disease.**
O uso das células-tronco nas doenças cardíacas.
Fernando P. COMPARSI, Sandrine C. WAGNER, Patricia PRANKE 213-224

Artigos Originais/ Original Articles

- 1131 **Avaliação da segurança dos xampus de uso infantis utilizados no comércio de São Paulo.**
Safety assessment of children shampoos commercialized in the São Paulo city.
Maria C. SANTA BÁRBARA, Adriana B. ALMODÓVAR, Lígia L. MIYAMARU, Adriana BUGNO, Leda M. A. SANTOS, Thais Y. SAITO 225-229
- 1132 **Avaliação da presença de resíduos em leite de vacas tratadas com diflubenzurom**
Determination of pesticide residues presence in milk from cows treated with diflubenzuron.
Silvia A.V. TFOUNI, Regina P. Z. FURLANI, Jefferson D. ARAÚJO, Rosália M. SOUZA 230-233
- 1133 **Determinação de ocratoxinas em cervejas, por injeção direta da amostra.**
empregando uma coluna cromatografica IS-aniônica. Ochratoxins determination in beers by direct injection of the sample using a IS-anionic column chromatography. Eliane M. R. S. SIMIONATO, Manoel L. MENEZES .. 234-239
- 1134 **Estudo da comunidade fitoplancônica no reservatório do Carpina-PE, com ênfase em Cyanobacteria.**
Study of the phytoplankton community with emphasis on Cyanobacteria, in Carpina-PE reservoir.
Nísia K. C. V. ARAGÃO, Cícero T. S. GOMES, Giulliani A. S. T. LIRA, Carolina M. ANDRADE 240-248
- 1135 **Determinação de sucralose em néctares de frutas "light" por CLAE-IR.**
Determination of sucralose in light nectars by HPLC-RI.
Iracema A. KIMURA, Cristiane B. CANO, Maristela S. MARTINS, Letícia A. F. NAGATO 249-255
- 1136 **Níveis de colesterol em ovos de galinha caipira, de granja e de codorna submetidos a diferentes condições de estocagem.**
Cholesterol levels in country chicken eggs, in those of farm raised chickens, and in quail eggs stored under different conditions.
Heryka M. M. RAMALHO, Ana Paula M. COSTA, Nathália K. M. SOARES, Keith H. D. SILVA, Videanny V. A. SANTOS, Roberto DIMENSTEIN 256-260
- 1137 **Nutritional value of crustaceans from Lagoone-Estuary Complex Mundaú/Manguaba-Alagoas.**
Valor nutritivo de crustáceos do Complexo Estuarino-Lagunar Mundaú/Manguaba-Alagoas.
Giselda M. LIRA, Elizabeth A. F. S. TORRES, Rosana A. M. SOARES, Simone MENDONÇA, Mirella F. COSTA, Kelly W. B. SILVA, Sarah J. G. B. SIMON, Katherine M. A. VERAS 261-267

- 1138 **Otimização e validação de método farmacopeico para verificar possíveis desvios de qualidade de matérias primas e cápsulas manipuladas contendo hormônios tireoidianos.**
Optimization and validation of compendia method for verifying improving deviations of quality in drug substances and compounded pharmaceuticals of thyroid hormones.
Blanca E. O. MARKMAN, Maria Regina W. KOSCHTSCHAK, Mariângela T. AURICCHIO 268-274
- 1139 **Avaliação microbiológica de doce de leite pastoso.**
Microbiology quality evaluation of pasty doce de leite.
Cláudio D. TIMM, Rita de Cássia S. CONCEIÇÃO, Francisco J. O. COELHO, Talita B ROOS, Talita S. TEJADA, Pedro S. QUEVEDO, Andréa HENTGES, Nathalia D.A. BRASIL 275-277
- 1140 **Correlação entre métodos cromogênicos e o método tradicional na enumeração de coliformes e *Escherichia coli* em carne bovina moída.**
Correlation between rapid and standard methods for enumeration of coliforms and *Escherichia coli* in raw meat.
Sabrina N. CASAROTTI, Aline T. PAULA, Daise A. ROSSI 278-286
- 1141 **Qualidade da água utilizada em escolas atendidas pelo Programa Nacional de Alimentação Escolar (PNAE), em Salvador-BA.**
Quality of water used in schools supported by National Programme for School Food Provision(NPSFP) in Salvador-BA.
Ryza de Cassia V. CARDOSO, Rogéria C. C. ALMEIDA, Alaíse G. GUIMARÃES, José Ângelo W. GÓES, Sueli A. SILVA, Aisi A.C. SANTANA, Larissa B. HUTTNER, Permínio O. VIDAL Jr., Karla V. N. A. FIGUEIREDO 287-291
- 1142 **Ocorrência de *Staphylococcus* coagulase positiva em queijos Minas tipos frescal e padrão comercializados nas feiras-livres de Goiânia-GO.**
Occurrence of coagulase positive - *Staphylococci* in fresh and cured types Minas cheese sold at open free market of Goiânia-GO.
Marcele L. T. ARRUDA, Edmar S. NICOLAU, Alline P. REIS, Aariane S. ARAÚJO, Albenones J. MESQUITA 292-298

Comunicação Breve/ Brief Communication

- 1143 **Avaliação das características físico-químicas de ricotas comercializadas no município de Campinas-SP e da conformidade das informações nutricionais declaradas nos rótulos.**
Physical-chemical characteristics of the ricotta cheese samples on sale in the local markets of..... Campinas City, SP, Brazil, and the compliance of the nutritional information on the labels assessment.
Luciana M. R. ESPER, Patrícia A. BONETS, Arnaldo Y. KUAYE 299-304
- 1144 **Diferenciação entre *Entamoeba histolytica* e *Entamoeba dispar* por meio de ensaio imunoenzimático para pesquisa de antígenos em amostras fecais.**
Differentiation between *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* by means of immunoenzymatic assay for antigens detection in children fecal samples.
Juliane B. S. TOMÉ, Rejane G. TAVARES 305-307

Relato de Caso/ Case Report

- 1145 **Erro na manipulação de cápsulas de alprazolam.**
Error in pharmaceutical compounding of alprazolam capsules
Luz M. TRUJILLO, Mônica A. BATISTIC-LONGATTO, Maria Ângela P. ZORZETTO, Sueli O.FRANCIOSI 308-310

Resumos de Teses e Dissertações

Avaliação do quadro de estresse metabólico em ratos Wistar expostos à aflatoxina B₁.
Silva, R.A. 311

Avaliação antioxidante do extrato de coentro (*Coriandrum sativum* L.) e do palmitato de ascorbila em óleo de girassol sob aquecimento.
Angelo, P.M. 312

Colaboradores 313-315

The use of stem cells in heart disease

O uso das células-tronco nas doenças cardíacas

RIALA6/1130

Fernando P. COMPARI¹, Sandrine C. WAGNER², Patricia PRANKE^{1,3*}

*Endereço para correspondência: Laboratório de Hematologia e Células-tronco, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Av. Ipiranga n. 2752 Porto Alegre, RS, Brazil, Zip code: 90160-000 Tel. +55 51 3308-5257 or +55 51 3308 5275 Fax.+55 51 3308-5437. E-mail: patriciapranke@ufrgs.br

¹ Faculdade de Farmácia, UFRGS, Porto Alegre, Brazil.

² Curso de Biomedicina, Centro Universitário Feevale, Novo Hamburgo, Brazil.

³ Programa de Pós-graduação em Neurociências, UFRGS, Porto Alegre, Brazil.

Recebido: 27/08/2007 – Aceito para publicação: 28/12/2007

ABSTRACT

Stem cells are undifferentiated cells that are capable of both self-renewal and giving rise to several cell types. Cardiovascular disease is the most important cause of death in western society and, in spite of therapeutic advances in traditional medicine, it has not been possible to recover the original cardiac function. Similarly, Chagas' disease is an important cause of heart failure in Latin America. The differentiation capacity of stem cells makes them an important source of cells for the regeneration of cardiac tissue. Research using animal models of myocardial infarction has shown promising results for the use of stem cells in heart disease therapy. Recent clinical trials have shown the safety and benefit of therapy with stem cells in cardiac regeneration. Research in this field is still in the early stages and needs to be consolidated to permit wider use of stem cells in clinical medicine. Nevertheless, cell therapy has been shown to have potential as a new approach in the treatment of heart disease, which takes the lives of millions people around the world.

Key words. stem cells, myocardial infarction, Chagas' disease, cell therapy, cardiac regeneration.

RESUMO

As células-tronco são células indiferenciadas capazes de auto-renovação e de originar diversos tipos celulares. A doença cardiovascular é a causa mais importante de morte na sociedade ocidental e, apesar dos avanços terapêuticos da medicina tradicional, não tem sido possível recuperar a função cardíaca original. A doença de Chagas é também uma importante causa de insuficiência cardíaca na América Latina. A capacidade de diferenciação das células-tronco faz dessas uma importante fonte de células para a regeneração do tecido cardíaco. As pesquisas utilizando modelos animais com infarto do miocárdio têm mostrado resultados promissores através do uso das células-tronco para a terapia das doenças cardíacas. Recentes ensaios clínicos têm comprovado a segurança e os benefícios da terapia com células-tronco na regeneração cardíaca. No entanto, as pesquisas nesse campo ainda estão em estágios iniciais e necessitam ser consolidadas para permitir uma ampla utilização das células-tronco na medicina. Além disso, a terapia celular tem mostrado grande potencial como uma nova abordagem terapêutica para o tratamento das doenças cardíacas, as quais são responsáveis por tirar a vida de milhões de pessoas ao redor do mundo.

Palavras-chave. células-tronco, infarto do miocárdio, doença de Chagas, terapia celular, regeneração cardíaca.

INTRODUCTION

Stem cells (SCs) are undifferentiated cells with a high proliferation capacity. SCs are capable of self-renewal, which is the ability to divide while remaining undifferentiated, thus maintaining a permanent pool of cells. They also have the ability to differentiate into a number of different cell types, given the appropriate stimuli¹.

Many researchers classify SCs according to their differentiation capacity, which can be totipotent, pluripotent and multipotent. In the fertilized egg, until about the third day, all the cells are considered totipotent SCs, which mean that these cells have the capacity to give rise to any one of the approximately 217 cells types of the human organism and the extraembryonic tissues. Pluripotent SCs give rise to all the more than 200 cell types, derived from the three embryonic germ layers (endoderm, mesoderm and ectoderm), but not the extraembryonic tissues. The capacity of multipotent SCs is limited to giving rise to the cells of a specific tissue or organ, such as those of the hematopoietic system, neurological system, liver, among others^{1,2,3}. Plasticity is the capacity of SCs to give rise to cell types other than those that gave rise to them. This plasticity means that SCs have a promising therapeutic role.

Stem cells are divided into two large groups, according to their origin: Embryonic Stem Cells (ESCs) and Adult stem cells (ASCs). ESCs are totipotent or pluripotent. Generally, in human beings ESCs are obtained in the period until the blastocyst phase, which corresponds to approximately 150-200 cells, developed by the fifth or sixth day following fertilization^{1,2}. In the blastocyst phase, the cells are considered pluripotent.

These cells also have a great capacity for self-renewal, proliferating in culture and remaining undifferentiated for an undetermined period. Moreover, they are clonable, that is, they have the capacity to give rise to genetically identical cell colonies. ASCs, found in the formed individual, are also capable of self-renewal and differentiation. Several studies have shown that some kinds of ASCs have more plasticity than previously believed^{1,2}. Examples of these are Mesenchymal Stem Cells (MSCs) and Multipotent Adult Progenitor Cells (MAPCs) which, it has been suggested, have a similar degree of plasticity to pluripotent ESCs.

Several studies have reported cases of transdifferentiation, in which ASCs from one tissue type have given rise to mature cells of a different kind. ASCs from bone marrow (BM), which originates from the mesoderm, can give rise to skeletal muscle cells, derived from the mesoderm, neurons, derived from the ectoderm and hepatocytes, derived from the endoderm. Research has shown that SCs can acquire the phenotype of other cells by spontaneous cellular fusion³. When Mononuclear Cells (MNCs) from BM or neural stem cells were cultivated

together with ESCs, they adopted the phenotype and plasticity of the latter through spontaneous cellular fusion. Recent clinical trials in cardiac therapy have demonstrated this. Among the different cell types that can be formed are cardiomyocytes, smooth muscle cells and vascular endothelial cells. The replacement of these cells permits a new approach to the treatment of cardiovascular disease, with marked advantages over conventional therapies⁴.

The aim of this paper is to discuss cell therapy as a novel treatment for heart disease, to be considered as another option which can be combined with conventional therapies to achieve greater survival rates and better quality of life for patients with such morbid and debilitating diseases. We review recent research on the use of stem cells for cardiac regeneration, including *in vitro* studies, animal experimentation and recent clinical trials, which evaluate safety and feasibility of cell therapy in the treatment of heart disease. These have been carried out around the world and in Brazil, which has stood out in this pioneering field, particularly with reference to Chagas' disease (ChD). These studies will support greater future efforts for research in this area and larger, more controlled clinical trials to more precisely determine the benefits of cell therapy in heart disease.

CARDIOVASCULAR DISEASES

Congestive heart failure affects 5 million people in the United States of America with 400,000 new cases per year. Cardiac and circulatory problems represent the main cause of death and invalidity in the United States. According to data from the Brazilian Health Ministry, cardiovascular diseases constitute the most significant cause of death throughout Brazil⁵. In 2001, cardiovascular diseases were responsible for approximately 1.2 million admissions to the Public Health System, and 260 thousand deaths⁶.

Irreversible damage occurs early in the course of myocardial infarction (MI), and the number of cardiomyocytes lost is a major determinant in post-MI cardiac function and prognosis. The limited regenerative capacity of the heart results in the inability of the cardiomyocytes to re-enter in the cellular cycle and proliferate⁴.

Infection by *Trypanosoma cruzi* causes American trypanosomiasis, or Chagas' disease, which affects 16 to 18 million people, mostly in Latin America, 6 million of which are in Brazil⁷. Approximately 30% of these patients suffer a progressive destruction of the myocardium causing chronic chagasic cardiomyopathy⁸ for which there is no cure. Thus, ChD remains a significant cause of morbidity and mortality in the most affected regions⁹. Chronic Chagasic Cardiomyopathy (CChC) may lead to heart enlargement and arrhythmia, causing cardiac dysfunction and death⁸.

CARDIAC REGENERATION

During embryogenesis and the beginning of post-natal life, cardiomyocytes proliferate extensively. However, some months later, the cardiomyocytes become terminally differentiated. Adult ventricular cardiomyocytes are refractory to cell cycle re-entry for reasons that include the lack of telomerase activity¹⁰. These observations have led to the widely held belief that the heart is incapable of regeneration.

Nevertheless, studies have shown that cardiomyocytes are not only capable of dividing, but also that this capacity is increased about ten-fold in severe heart failure. Cases where male patients receive a heart from a female donor offer a unique opportunity to investigate whether primitive cells migrate from receptor to the transplanted organ and whether such cells remain in the donated heart¹². Quaini and colleagues¹¹ used the presence of the Y chromosome in cardiac cells of such patients to determine that the cells were originally from the receptor. They reported that 18% of the myocytes, 20% of the coronary arteries and 14% of the capillaries were of male origin, and were formed from the cells of the receptor in the post-transplant period.

Glaser and colleagues¹² employed the same kind of sex-mismatched heart transplants in order to investigate the migration of receptor cells to transplanted heart. They observed that, on average, 7.5% of the smooth muscle cells originated from the receptor, but no myocytes of male origin were found. At the same time, Müller and colleagues¹³ reported an average of 0.16%, while Laflamme and colleagues¹⁴ found an average of only 0.04% of cardiomyocytes from the receptor in transplanted hearts.

The great disparity between these research findings, and specially the non-confirmation, by other authors, of the notable results obtained by Quaini and colleagues¹¹, have generated intense debate on the methods used and, principally, on the criteria employed in interpreting the results.

Others factors, such as the shorter time interval between the heart transplant and tissue analysis and, consequently, the higher levels of infiltration by inflammatory cells into the cardiac tissue, may be responsible for the high levels of chimerism reported by Quaini and colleagues¹¹. However, if confirmed, these results would lead to a paradigm shift from the accepted dogma that the heart is incapable of regeneration, to one in which stem cells from the host may be recruited to regenerate significant areas of the human heart¹⁵.

Even if the potential of the heart to regenerate is not as great as that suggested by Quaini and colleagues¹¹, proving to be more limited, as indicated by the results reported by Müller and colleagues¹³ and Laflamme and colleagues¹⁴, precedents are opened for both the study and clinical use of the stimulation of this intrinsic regenerative capacity of the heart in the treatment of heart disease.

Recently, Oh and colleagues¹⁶, using cardiac progenitor cells obtained from the myocardium of adult mice, have offered an explanation for myocyte regeneration. These cells, when

injected into the jugular vein of infarcted mice, migrated to the heart, and after two weeks, acquired the phenotype of myocyte, by fusion and differentiation in similar proportions.

A recent interesting finding is that following acute MI, there was a naturally occurring significant increase in the levels of CD34⁺ progenitor cells in the peripheral blood, which peaked between 24 and 48 hours after the first symptoms appeared and gradually returned to normal values after 7 to 60 days¹⁷. CD34 is well known as a hematopoietic stem cell (HSC) marker.

The mobilization of CD34⁺ and endothelial progenitor cells (EPCs) was observed in early stages of chronic heart failure, together with a reduction in circulation levels of these cells in advanced stages of the disease¹⁸. In patients with coronary arterial disease, the level of circulating endothelial progenitor cells is inversely related to the cardiovascular risk. Studies showed that the patients with lower levels of circulating CD34⁺ and KDR⁺ (kinase domain receptor) cells presented higher frequency of important cardiovascular events during the 12 month period in which they were followed¹⁹.

Besides EPCs and HPCs, other subpopulations of cells from the bone marrow, such as cardiac progenitor cells, have been shown to be mobilized following damage to the myocardium^{17,20}. Increased plasma and tissue levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) have also been detected after infarction, as well as the tissue levels of stromal derived growth factor-1 (SDF-1), hepatocyte growth factor (HGF) and leukemia inhibitory factor (LIF), in the damaged region of the heart¹⁷.

These results suggest the existence of cardiac progenitor cells in bone marrow that can be mobilized to the peripheral blood following acute MI and attracted to the heart by the release of chemotactic factors, where they repair the lesion.

It is important to highlight that the proliferation mechanisms of cardiac cells following a trauma such as MI are not capable of regenerating the heart and restoring original cardiac function^{4,16}.

Given this, the development of new therapeutic approaches that permit the regeneration of lost cardiac tissue is extremely important and stem cell therapy has a vital role to play¹.

RESEARCH INVOLVING STEM CELLS IN THE REPAIR OF CARDIAC TISSUE

The use of autologous SC in the tissue engineering for cardiovascular diseases is promising due to the capacity of self-renewal, high proliferation and differentiation rate in specialized progenitor cells²¹.

Several studies aimed at assessing the potential for the use of stem cells in the repair of cardiac tissue have been carried out. This approach has great advantages over heart transplant, especially given the scarcity of available heart donors to meet current transplant needs¹.

ANIMAL EXPERIMENTATION

In order to verify the feasibility, safety and beneficial effects of stem cell transplantation for the treatment of heart disease, especially MI, experiments with animal models have been performed, inducing infarction in rats and mice. This is achieved by the occlusion of the coronary artery which leads to infarction of the cardiac region irrigated by that artery¹.

Orlic and colleagues²² isolated $\text{lin}^- \text{c-kit}^+$ cells from mouse BM, and injected them into the viable myocardium adjacent to the infarcted area, some hours after the arterial occlusion. Nine days after the transplant, 68% of the infarcted area had been replaced by newly formed myocardium. The developing tissue included vascular structures, proliferating myocytes, and expressed markers of cardiac cells in development. The expression of connexin 43, a protein responsible for intercellular connection and electrical coupling between myocytes, which is essential for the functional integration of heart muscle cells was also seen²³. Of even greater significance was the improvement in the systolic and diastolic pressure when compared with mice that did not receive $\text{lin}^- \text{c-kit}^+$ cells following infarction. These data show that the tissue formed from the transplanted cells had a positive impact on cardiac function²². However, direct injection into the heart, through thoracotomy, besides being technically difficult in mice, is highly invasive, resulting in high mortality and low grafting rates.

Therefore, Orlic and colleagues²⁴ checked the effects of the mobilization of BM cells through the injection of granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) and Stem Cell Factor (SCF) in infarcted mice.

Granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) is a hematopoietic growth factor which promotes proliferation and differentiation of neutrophil progenitors and also has immunomodulatory properties. G-CSF promotes the mobilization of stem and progenitor cells from bone marrow to the infarcted heart after acute MI. While there is controversy regarding the capacity of mobilized stem cells to differentiate into cardiomyocytes, the angiogenesis induced by G-CSF is a known effect in the infarcted heart²⁵.

Although some studies show that G-CSF can act directly on cardiomyocytes^{25,26} promoting their survival after acute MI and inducing the regeneration of myocardium in mice, the mechanisms by which these benefits occur are not completely known yet. G-CSF may induce the release of anti-apoptotic proteins and inhibit the apoptosis of cardiomyocytes in the infarcted heart. Furthermore, it seems to reduce the apoptosis of endothelial cells, increasing the vascularization of the infarcted heart, protecting it against ischemia²⁶.

The results were encouraging, showing considerable increase in the survival of treated mice when compared to the control group: 85% to 35%, 6 days after the infarction, and 73% to only 17% after 27 days, respectively. It was seen that repair had only occurred in the treated group, with the reduction

of the infarcted area from 64% to 39%, with the formation of new myocytes. These cells expressed desmin, nestin, α -sarcomeric actin, cardiac myosin and connexin 43, which are heart cell development and integration markers. The myocardium in formation occupied $76 \pm 11\%$ of the infarcted area and consisted of myocytes, endothelial and smooth muscle cells in proliferation. The ejection fraction was 48, 62, and 114% greater in treated than in untreated mice, at 9, 16, and 26 days following coronary occlusion, respectively. These results demonstrated that this non-invasive protocol was well tolerated by the recipient mice, and that autologous circulatory stem cells migrate to the damaged region of the ischemic heart and give rise to new cardiomyocytes and blood vessels, and so restore, at least partially, heart function²⁴.

Embryonic stem cells have the distinct potential for tissue regeneration, including cardiac repair²⁷ and they are promising for cardiac repair²⁸. Human ESCs can give rise to cardiomyocytes *in vitro*²⁹ and ESC-derived cardiomyocytes are viable human heart cells that can functionally integrate with the recipient organ after transplantation³⁰. Cai and colleagues³¹ showed that transplantation of ESC-derived cardiomyocytes improved cardiac function in infarcted rat hearts.

Min and colleagues³² induced MI in rats and used ESCs from mice, cultivated for 7 to 8 days, permitting their differentiation. For the transplant, cells previously transfected with green fluorescent protein (GFP) were used. The cells were injected into two points adjacent to the ischemic region, and one point within the infarcted region, 30 minutes after infarction. Six weeks after the infarction, the animals that received the ESCs showed significant improvement in left ventricular function, when compared with rats that received cell-free culture medium (control). Considerable improvement was also seen in the ventricular contraction of the group transplanted with ESCs. The presence of GFP positive cells in the left ventricle shows that the implanted ESCs not only survived in the damaged myocardium, but also differentiated into mature cardiomyocytes 6 weeks after transplant.

The ability of cardiac-specified human ESCs to differentiate along the cardiomyogenic pathway following transplantation into infarcted myocardium raises the hope that these cells might become effective candidates for myocardial regeneration²⁹. However, it is known that undifferentiated mouse ESCs can form teratomas in infarcted hearts, indicating injury-related signals did not direct cardiac differentiation²⁸. Their propensity for multilineage differentiation carries, however, the liability of neoplastic growth, impeding therapeutic application²⁷. On the other hand, no teratoma was observed in hearts or any other organ of the body in studies from Tomescot and colleagues²⁹, when they studied the differentiation *in vivo* of cardiac committed human embryonic stem cells in postmyocardial infarcted rats²⁹. Behfar and colleagues²⁷ showed that cardiopoietic programming established a strategy to hone stem cell pluripotency, offering a tumor-resistant approach for regeneration.

These controversial results show that the use of embryonic stem cells in patients needs to be more studied before its therapeutic application.

In a study using human peripheral blood MNCs, these cells were expanded in culture medium prepared for endothelial progenitor cells (EPCs) for 7 days. Infarction was induced in rats and after 3 hours 10^6 EPCs were injected intravenously. After 28 days, the rats that received the cells exhibited lower left ventricle systolic and diastolic volumes, as well as greater cardiac contractility than rats from the control group. The increase in the neovascularization produced by EPCs resulted in a reduction in ventricular dilatation and maintenance of cardiac performance after myocardial ischemia in rats³³.

In a study carried out by Yeh and colleagues³⁴, infarction was induced in immunodeficient mice and 2.5×10^6 CD34⁺ cells from human peripheral blood were transplanted by infusion into the caudal vein. The infarcted area, but not the healthy portion of the heart, presented human cardiomyocyte-like cells that expressed HLA-ABC and cardiac protein (troponin T). Blood vessels in the infarcted region were also found to contain cells positive for HLA and smooth muscle α -actin or HLA and VE-cadherin, demonstrating that human CD34⁺ transdifferentiated into smooth muscle and endothelial cells in the damaged tissue. These events were not observed in mice that received only cells, in the absence of infarction.

In another study, BM cells were mobilized by the administration G-CSF in humans and then collected from the peripheral blood by means of leukapheresis. Forty-eight hours after infarction induced by occlusion of the left anterior descending coronary artery in athymic rats, 2×10^6 human CD34⁺ cells were injected into the caudal vein. After 2 weeks, a significant increase in microvascular density was seen in the infarcted area (with vessels constituted of human cells), and in the peri-infarcted region (with vessels containing rodent cells). Moreover, the rats that received human cells showed significant improvement in cardiac function, with relative increase of 22% and 34%, relative to post-infarction values, at 2 and 15 weeks, respectively. Furthermore, the frequency of apoptotic myocytes was 6 times lower in the treated group than in the control group³⁵.

The use of an alternative source of stem cells, from the mononuclear fraction of umbilical cord blood (UCB) has been studied in several diseases, including cardiac diseases. Recent studies in mice have shown that in 50% of animals with myocardial infarction the mononuclear cells (MNCs) from UCB migrate to the heart after the intravenous injection. Again in mice, when cells from UCB or BM enriched with CD133, a marker of EPCs, were directly injected in the infarcted area of myocardium, an improvement in the contractility of myocardium and in the neovascularization of ischemic myocardium was observed³⁶.

In an animal model of chronic ischemia in dogs, an increase in the vascularization and an improvement in the cardiac function were demonstrated after the implant of mesenchymal stem cells (MSCs). These cells differentiated into smooth muscle and endothelial cells, suggesting the formation of new vessels.

Amado and colleagues³⁷ performed an allogeneic transplant of MSCs in pigs and achieved significant improvement in the cardiac function. On the other hand, Deten³⁸ and Balsam³⁹ and their colleagues, with the mobilization and intravenous injection of bone marrow cells, did not detect any sign of myocardium regeneration in the heart of infarcted mice.

These animal experiments have demonstrated the great potential of stem cells obtained from different sources, in the regeneration of cardiac tissue, through the revascularization of damaged tissue, and differentiation into cardiac cells, which leads to tissue restoration and the recovery of cardiac function. The cell types, animals, means of administration and main results of the presented studies are summarized in Table 1.

CLINICAL TRIALS

A number of successful studies in the application of stem cell therapy in heart disease using animal models have stimulated ongoing clinical trials¹.

Perin and colleagues⁴⁰ performed the autologous transplant of MNCs from BM in 14 patients with severe chronic ischemic heart failure. The control group consisted of 7 patients who received only conventional therapy. A NOGA catheter was used to administer 15 transendocardial injections delivering a total of 2 to 3×10^7 cells per patient. The population of cells injected contained $2.4 \pm 1.3\%$ of CD45^{dim} CD34⁺ cells. The patients were evaluated two months after the transplant, and presented significant improvement when compared to the evaluation made prior to the procedure and the control group. The patients that received the transplant showed improvement in heart condition, with fewer symptoms of angina and greater exercise capacity. Improvement was observed in the ejection fraction measured by echocardiogram and the final systolic volume, as well as the cardiac tissue perfusion (a 73% reduction in the total reversible defect). The transplanted group was re-evaluated after 4 months, and angiography showed significant improvement in ejection fraction and end systolic volume. Moreover, improvement in mechanical function was seen in the cell injection sites. This research demonstrated the safety and efficacy of performing autologous transendocardial transplant of MNCs from BM.

Strauer and colleagues⁴¹ were the first to perform the intracoronary autologous transplant MNCs from BM in patient with acute MI. Ten (10) patients received injections of around 2×10^7 MNCs during angioplasty while a control group of 10 patients had only angioplasty. Three months after the procedure the patients that received cell therapy presented a significant reduction in the infarcted area (from $30 \pm 13\%$ to $12 \pm 7\%$), a significant increase in motility in the affected region, as well as reduction in the end systolic volume.

In a study using AC133⁺ cells selected from the BM of patients with MI, a group of 6 patients received 1.5×10^6 cells directly into the peri-infarcted area, together with coronary

Table 1. Experiments in animal models using SCs in cardiac regeneration.

Cells	Animal/Route of Administration	Main Results	References
lin ⁻ c-kit ⁺ from BM from mice	Border of infarcted area in mice	1) Regeneration of 68% of the infarcted region; 2) New My;3) cardiac function improvement	22
Cells mobilized from BM by G-CSF and SCF	Infarcted mice	1)Increased survival; 2) New My;3)cardiac function improvement	24
differentiated ESCs in mouse	around and in the infarcted region in rats	1) New My;2) cardiac function improvement	32
expanded EPCs from human PB	Intravenously in infarcted immunodeficient rats	1) Increased vasculogenesis of ischemic tissue; 2) cardiac function improvement	33
CD34 ⁺ from human PB	Intravenously in infarcted immunodeficient mice	1) New My, SMCs and vascular endothelial cells	34
CD34 ⁺ from human PB mobilized by G-CSF	Intravenously in infarcted immunodeficient rats	1) Vasculogenesis in the infarcted area and angiogenesis in the periphery; 2) cardiac function improvement	35
MNCs from UCB	Intravenously in infarcted mice	Migration of cells to heart in 50% of animals with AMI	36
Selected CD133 cells from UCB or BM	Injection in infarcted area in mice	Cardiac function improvement	

SCs: stem cells; BM: bone marrow; G-CSF: granulocyte colony stimulating factor; SCF: Stem Cell Factor; ESCs: Embryonic Stem Cells; PB: Peripheral Blood; EPCs: endothelial progenitor cells; My: myocytes; AMI: acute myocardial infarction. SMCs: smooth muscle cells; MNCs: mononuclear cells; UCB: umbilical cord blood.

revascularization. This resulted in an increase in global ventricular function and perfusion of the infarcted region 3 to 9 months after the procedure. AC133⁺ cells include a sub-population of CD34⁺ cells, have great potential of inducing angiogenesis, and may be responsible for the increased perfusion in the cardiac tissue, though the affect of revascularization surgery cannot be ignored⁴².

Tse and colleagues⁴³ reported a significant decrease in angina episodes and the use of nitrates in 8 patients with ischemic heart disease, 3 months after autologous transendocardial transplant of MNCs. NOGA system was used to electronically map the hearts of the patients and inject the cells into the ischemic area of the myocardium. A significant improvement in the cardiac contraction was noted in the patients.

Menasché group pioneered the use of skeletal myoblasts, with first implant of autologous myoblasts into a patient suffering from infarction. They followed up 10 patients submitted to the same treatment and noted improved cardiac function and increased ejection fraction. On the other hand, ventricular arrhythmia was seen in 4 patients, which has led to concern regarding the safety of skeletal myoblast transplant⁴⁴. The presence of arrhythmia may be linked to the lack of a functional integration capacity in the newly formed tissue. This incapacity is due to the absence of electrical coupling between

the new muscle cells and the cardiomyocytes, which was confirmed by the absence of connexin 43 and cadherin expression in the grafted cells⁴⁵.

Schächinger and colleagues⁴⁶ performed intracoronary autologous transplant of progenitor cells in 59 patients with acute MI. Twenty nine patients received MNCs from BM and the other 30 received peripheral blood cells expanded *in vitro* and with characteristics of endothelial progenitors cells. In the preliminary evaluation of the first 20 patients, the two groups (9 and patients, respectively) obtained comparable results in the follow-up four months after the procedure. Both showed significant improvement in ejection fraction, end systolic volume, cardiac contraction and perfusion, when compared to baseline values and the control group of 11 patients that received only conventional treatment⁴⁷. After 12 months follow-up of all the patients an even greater improvement was noted in the ejection fraction, along with a decrease in end systolic volume and maintenance of end diastolic volume, demonstrating a favorable ventricular remodeling and no infarction spread⁴⁶. Based on the observation that progenitor cells derived from both BM and peripheral blood increased the neovascularization in ischemic tissue^{33,35}, it has been suggested that improvement in ventricular function following experimental induction of a MI is due to the stimulation of angiogenesis. Thus, the

enhanced blood flow makes it possible to prevent myocardial remodeling and limits myocytic apoptosis, reduces collagen deposition and scar formation^{33,35,47}. While arrhythmia has appeared to be an important limitation to the use of SCs derived from skeletal myoblasts⁴⁴, in this study none of the transplanted patients presented arrhythmia, demonstrating the safety of the procedure⁴⁶.

Another study used SCs from peripheral blood mobilized by G-CSF for the autologous transplant during heart by-pass surgery. The stem cells were infused into the coronary artery or injected into non-fibrotic areas of the myocardium, adjacent to the infarcted region. There was improvement in the clinical conditions of the 5 patients, mainly in those that had recently suffered infarction. However, further research will be necessary to confirm the results⁴⁸.

Fernández-Avilés and colleagues transplanted autologous MNCs from BM in 5 patients with acute MI due to stenosis of the left anterior descending coronary artery. A catheter was used to infuse around 5×10^7 cells into the affected artery, 10–15 days after infarction. Six months after the transplant, an improvement was noted, though not significant, in the ejection fraction and final diastolic and systolic volumes. The same authors later published the results of a study containing 20 patients that showed significant improvement in ejection fraction and end systolic volume after 6 months, reflecting improved cardiac contraction, while in the control group (13 patients) no significant improvement was seen⁴⁹.

A randomized clinical trial was carried out with 60 patients that had suffered acute MI and percutaneous coronary intervention. A catheter was used to transplant 2.5×10^9 nucleated cells from BM (containing approximately 10^7 CD34⁺ cells) into the coronary artery linked to the infarction. The patients were followed-up for 5 to 6 months after the transplant and magnetic resonance was used to determine the left-ventricular ejection fraction. The group of 30 patients that received cell therapy presented a significant elevation of $6.7 \pm 6.5\%$ in LVEF, while in the control group the elevation in LVEF was only $0.7 \pm 8.1\%$. Moreover, the absence of the pro-arrhythmia effect in the transplanted patients demonstrates the safety of cell therapy in cardiac regeneration following MI⁵⁰.

Ince and colleagues⁵¹ studied the effect of mobilization of CD34⁺ cells from BM in patients suffering from acute MI. Fifteen patients received subcutaneous injection of G-CSF for 6 days and traditional treatment, while the control group received only the conventional treatment. During the treatment with G-CSF, the level of circulating CD34⁺ cells increased 20 times, while they remained constant in the control group. In evaluations made 4 and 12 months after the treatment, the patients who received G-CSF showed significant improvement in cardiac motility, ejection fraction and cardiac geometry, when compared to the control group. Moreover, no adverse effects were observed, including electrical instability or accelerated restenosis.

In a randomized double blind study with 114 patients with acute MI, 56 patients received daily subcutaneous doses of G-CSF for five days, while 58 patients received placebo, during the same period. Increases in circulating CD34⁺ cells, as well as in the level of granulocytes, monocytes and lymphocytes were observed in the patients who received G-CSF. However, the study showed that although the treatment produced a significant mobilization of stem cells, the use of G-CSF did not change the size of the infarction or the left ventricular function after the acute MI in patients. On the other hand, in contrast with other studies, the risk of coronary restenosis did not increase and other collateral effects were not observed⁵².

In a study carried out by a group of Brazilian researchers, 9 patients received cell therapy for the treatment of heart failure due to ChD, hypertension and unknown origin (idiopathic dilated cardiopathy). Two patients received GM-CSF to mobilize SCs from BM that were then collected in the peripheral blood for leukapheresis and administered via intracoronary method using a catheter. In the other 7 patients, the cells were merely mobilized to the peripheral blood by the administration of GM-CSF, with the aim of observing whether the cells migrate to the damaged cardiac tissue to induce repair. The preliminary results showed there was improvement in the condition of the first patients that received the treatment, with improved ejection fraction and endurance during exercise. Three of these patients have now left the heart transplant waiting list⁹.

Since October 2003, in Rio Grande do Sul, stem cell transplant has been performed on 7 patients with heart failure, and the patients are responding well to the treatment⁵³. In another study, published in 2004, Sant'Anna and colleagues⁵³ showed the results of SCT in 7 patients with cardiac failure, who responded well to the treatment.

Tura and colleagues⁵⁴ have designed clinical trials to test for the efficacy of autologous bone marrow derived mononuclear cell therapies in four different cardiopathies: acute and chronic ischemic heart disease, and Chagas and dilated cardiomyopathy. In each trial 300 patients will be enrolled and receive optimized therapy for their specific condition. Additionally, half of the patients will receive the autologous bone marrow cells while the other half will receive placebo. Many phase I clinical trials using cell therapy for cardiac diseases have already been performed. The few randomized studies have yielded conflicting results, rendering necessary larger well controlled trials to test for efficacy of cell therapies in cardiopathies.

All the published clinical trials have involved autologous transplants, that is, the patients own cells were used, so avoiding the risk of rejection and the need for immunosuppression, inherent in allogeneic transplants. The cell types used, the administration method, the number of patients and the types of heart disease are summarized in Table 2.

Table 2. Clinical trials using cellular therapy in patients with heart disease

Cells	Administration	Patient disease	N:	References
MNCs from BM	Transendocardial guided by NOGA	CHF	14/7	40
MNCs from BM	Transendocardial guided by NOGA	CHF	8	43
MNCs from BM	intracoronary (catheter)	AMI	10/10	41
MNCs from BM	intracoronary (catheter)	AMI	5	49
MNCs from BM	intracoronary (catheter)	AMI	9/11	47
PB Expanded <i>in vitro</i>	intracoronary (catheter)	AMI	11/11	47
AC133 ⁺ Cells from BM	Direct injection into border of infarcted region, during by-pass surgery	AMI	6	42
Skeletal Myoblasts	Direct injection into infarcted Myc, during by-pass surgery	CHF	10	44
PB mobilized by G-CSF	Injection into coronary and Myc during by-pass surgery	CHF	6	48
Nucleated cells from BM	intracoronary (catheter)	AMI	30/30	50
PB mobilized by G-CSF	Injection of G-CSF	AMI	15/15	51
PB mobilized by G-CSF	Injection of G-CSF	AMI	56/58	52

N: number of patients that received cell therapy / control group (when existent); MNCs: Mononuclear Cells; BM: Bone Marrow; PB: Peripheral Blood; G-CSF: granulocyte colony stimulating factor; Myc: myocardium; CHF: chronic heart failure; AMI: acute myocardial infarction.

STEM CELLS IN CHAGAS' DISEASE

The discovery of the pluripotential capacity of SCs from BM, and with it, the emergence of new perspectives for the treatment of, until then, incurable degenerative diseases, as well as the promising results of the use of these cells in cardiac regeneration^{22,40,50}, has led to the study of the use of cell therapy in the treatment of CChC.

A pioneering study in relation to ChD is being undertaken by a group of researchers from different Brazilian institutions, including Fiocruz from Bahia, a state with a high incidence of this disease. It has recently been demonstrated that BM cells injected intravenously into mice with chronic ChD migrated to the heart and provoked a significant reduction in the inflammatory infiltrates and in interstitial fibrosis, characteristic properties of CChC. Beneficial effects were seen within 6 months after transplant from BM. Massive apoptosis of inflammatory cells in the myocardium was noted after the therapy with BM cells. However, there was no increase in parasitism, indicating that the marked reduction in cardiac

inflammation was not due to a generalized immunosuppression. It was also found that a fraction of the cells expressed cardiac myosin, but only in the hearts of chagasic mice, showing the need for the presence of tissue damage to provoke the migration of the cells and induce repair. Of particular importance is the finding that cells obtained from the BM of both normal and chagasic mice had comparable effects in inducing repair in the chagasic heart. The results show that the transplant of cells from BM is effective in the treatment of CChC and that the autologous transplant of BM can be used as an efficient therapy for patients afflicted by this pathology⁵⁵.

Based on the experience obtained in research with the transplant of SCs for ChD in mice and the encouraging results achieved in these studies⁵⁵, a surgical protocol has been applied, since July 2003, with the aim of improving the quality of life patients with ChD. Preliminary results have demonstrated the success of the procedure in 5 patients⁵⁶ that received an intracoronary autologous injection of SCs from BM via cardiac catheterism⁵⁷. The aim is to extend the study to more 25 patients⁵⁶.

DISCUSSION

Although experiments with animal models of infarction have shown the differentiation of SCs from BM into cardiomyocytes²², the extent to which this is reproducible in humans is unknown. The confirmation of the presence of cardiac cells from the host in the transplanted hearts supports the differentiation of SCs into cardiomyocytes *in vivo* in the human heart. However, the inconsistency of the results from different research groups as hampered the attainment of more solid conclusions.

It is also important to try to discover the action mechanism of SCs. Transdifferentiation and cellular fusion have both been suggested as the action mechanisms involved in the tissue regeneration process induced by SCs. However, the low frequency with which some studies have demonstrated these events³ has led to suggestions that other mechanisms may be involved. One such mechanism would be that the delivered SCs, release growth factors at the damaged tissue, and assist the “modulation” of the damaged environment. These factors may stimulate the proliferation of resident or circulating SCs and tissue regeneration. Much further research will be necessary to improve our understanding of these and other, as yet unknown action mechanisms of SCs.

Other studies with animals have indicated angiogenesis in the ischemic tissue, induced by transplanted cells, as an important mechanism in the recovery of cardiac function^{33,35}. The evidence to support this includes the reduction in the occurrence of angina and increased myocardial perfusion, without alteration to heart contraction, as confirmed by Tse and colleagues⁴³. Another important finding is the increase in perfusion and cardiac contraction in viable but non-functional regions of the myocardium that received BM derived SCs, reported by Perin and colleagues⁴⁰. The findings of Stamm and colleagues⁴² also suggest that angiogenesis plays an important role in the infarcted tissue leading to cardiac regeneration. The group noted the increase in ventricular function and myocardial perfusion in patients that received transplanted cells with high angiogenic potential. Furthermore, Assmuss and colleagues⁴⁷ demonstrated significant improvement in cardiac contraction and perfusion in patients that received *in vitro* expanded EPCs, derived from peripheral blood cells.

Although the results of clinical trials point to angiogenesis as the main process responsible for cardiac regeneration, the proliferation of cardiomyocytes and the differentiation of progenitor cells, probably also play important roles. However, the complete mechanism is far from being understood. Perhaps, the increase in perfusion induced by angiogenesis in the ischemic region facilitates improved intrinsic regenerative capacity of the heart, through the increase availability of oxygen and nutrients for cellular proliferation and tissue regeneration.

Other questions, besides the mechanisms responsible for the cardiac regeneration induced by SCs, regarding the use

of cell therapy in heart disease remain unanswered. An example is the necessity or possibility of cell manipulation for the purification of a specific population or *in vitro* differentiation prior to transplant.

While different studies have used cells derived from different sources, no conclusion has been reached on the cell type best indicated for implant. A further point to be considered is that of the best cell administration route. NOGA appeared to be one of the more promising methods, as the transendocardial injection can be guided by electromechanical mapping, allowing the administration of cells into viable but non-functional regions of the myocardium. Intracoronary infusion via catheter into the artery responsible for the infarction, following its desobstruction, is another strategy and permits the use of larger volumes of cellular suspension and the contact of the cells with all the affected tissue. Though these strategies are less invasive than direct injection into the myocardium through thoracotomy during by-pass surgery, and have been shown to be safer in the clinical trials in which they have been employed, the need to use NOGA has been debated. Attempts have been made to substitute NOGA by other procedures, because of its invasive nature and high cost.

Less invasive methods of SCs implant have shown promising results. Nevertheless, perhaps cell implant itself may not be necessary. Maybe the administration of cytokines, such as G-CSF or SCF, which mobilize BM derived SCs to the peripheral blood, is sufficient to ensure stem cell migration to the damaged cardiac tissue. Alternatively these cells may be collected from the peripheral blood after mobilization with cytokines, and then implanted into the heart to increase their concentration in the target tissue. Though such approaches remove the need for cell aspiration from BM, they have been less tested in animal experiments and clinical trials, and their efficacy and safety have not yet been established.

Kang and colleagues⁵⁸ found a high incidence of restenosis in the infarcted artery in patients that received G-CSF, despite cardiac function improvement. However, there were few patients in the study sample, and the result has not been confirmed by other research⁵¹.

Controversy remains regarding the results and procedures employed in recent studies. Silva and colleagues⁵⁹ demonstrated increased vascularity and improved cardiac function in a canine chronic ischemia model, using mesenchymal stem cells differentiated into smooth muscle cells and endothelial cells. On the other hand, Deten and colleagues³⁷ found no detectable signs of myocardial regeneration in infarcted mouse heart with the mobilization or intravenous injection of BM cells.

An important problem to be solved is that the mobilization of BM derived cells to the peripheral blood takes several days, and hence increases the time delay between infarction and treatment. The early induction of angiogenesis in the infarcted tissue and the consequent increase in perfusion appear to inhibit late ventricular remodeling and the

deterioration of the myocardium, thus preserving cardiac function^{33,35,42,47}. While tissue damage is an important factor for the migration of SCs and their incorporation into the affected tissue, the ideal time period for treatment initiation following infarction remains to be established.

It is known that delivered factors from myocardium during the inflammatory process play an important role in increasing homing, migration and implantation of systematically infused stem cells. Despite the controversy surrounding the capacity of mobilized SC to differentiate into cardiomyocytes and the fact that the effects of G-CSF on the advance of atherosclerosis are not fully understood, the use of this growth factor seems to represent a promising therapy for ischemic events²⁵.

The CXCR4 molecule is a recently discovered marker involved in the process of attraction of stem cells to the sites of damaged tissue. When tissue is damaged, CD34⁺CXCR4⁺ cells migrate to the site of the lesion, attracted by SDF-1 secretion, the ligand of the CXCR4 receptor. Niches of SDF-1 are found in the damaged organs and they are delivered during the tissue damage. The organization of cellular niches is known to have a key role in regulating normal stem cell differentiation and in the regeneration of tissue. Thus, CXCR4⁺ cells are important in the regeneration of damaged organs, showing the regenerative capacity of stem cells⁶⁰, such as HSC and MSC, which express this marker on their cellular surface. Bone marrow and skeletal muscle also contain a population of CXCR4 cells that express specific genes for muscle progenitor cells and that can be mobilized to peripheral blood²⁰. These cells are attracted by the SDF-1 delivered in the damaged area of the organ and they can help in the repair of the infarcted heart^{17,20}.

Clinical trials have included both patients suffering from acute MI, and patients with chronic heart failure. Though it is not yet possible to compare the results due to the low number of studies and of patients, in both cases improvement has been seen in patients. An important factor is that there are more patients with chronic heart failure and their situation is more severe, as frequently there is no option available other than heart transplant. Clinical trials until now have included patient follow-up of at most 12 months, and as yet it is not known whether transplanted cells survive in the heart for longer periods, nor for how long the beneficial effects will remain.

There is a need for continued research with animal models as well as clinical trials to enhance our understanding and facilitate the wider use of SCs in the treatment of heart disease. Though, advances in stem cell therapy have broken paradigms and shown it to be a promising treatment for the regeneration of tissue, especially in the heart.

CONCLUSION

Stem cells have great potential in the regeneration of cardiac tissue, through the formation of new myocytes, endothelial and smooth muscle cells. The partial repair of the

infarcted heart, seen in several studies, suggests that transplanted cells respond to signals from the damaged myocardium, that provoke their migration, proliferation and differentiation within and around the infarcted area. Of greater importance, is the significant improvement observed in the clinical condition of the patients submitted to SCs treatment. In the studies so far performed, improvement has been reported in hemodynamics, cardiac geometry, myocardium perfusion and contraction, and endurance during exercises, as well as reduction in the occurrence of angina. Moreover, the relative safety observed in these studies encourages the performance of larger randomized controlled studies, to better evaluate the potential of cell therapy and disseminate its therapeutic use.

The treatment of the sick heart in patients with ChD by cell therapy is particularly important in Brazil and Latin America. The results obtained with cell therapy in animal models of CChC and the recent implementation of a surgical protocol for the autologous transplant of SCs in chagasic patients give new hope to millions of people that suffer from ChD⁵⁷.

Stem cell therapy therefore points to a promising future for regenerative medicine, and has become a great hope in the treatment of heart disease, adding to the therapeutic arsenal of the clinician in the combat of diseases that represent such a heavy burden for society.

REFERENCES

1. Kirschstein R, Skirboll LR. Stem cells: scientific progress and future research directions. National Institutes of Health. <http://stemcells.nih.gov/info/scireport>. From June 17, 2001. Accessed August 23, 2007.
2. Yamanaka S, Li J, Kania G, Elliott S, Wersto RP, Van Eyk J, Wobus AM, Boheler KR. Pluripotency of embryonic stem cells. *Cell Tissue Res* 2008; 331: 5-22.
3. Wang X, Willebring H, Akkari Y, et al. Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature* 2003; 422: 897-901.
4. Abbott JD, Giordano FJ. Stem cells and cardiovascular disease. *J Nucl Cardiol* 2003; 10: 403-12.
5. Nicolau JC. Angina e cuidados pós-infarto do miocárdio. *Manual de Condutas Médicas*, 287-290. <http://ids-saude.uol.com.br/psf/medicina/tema5/pdf/texto67.pdf>. 2001.
6. RIPSAs, Rede Interagencial de Informações para a Saúde. Indicadores e Dados Básicos para a Saúde, Brasil. <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/ibd2003/matriz.htm>, 2003. Accessed August 23, 2007.
7. Dias JCP, Silveira AC, Schofield CJ. The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002; 97: 603-12.
8. Soares MBP, Pontes de Carvalho L, Santos RR. The pathogenesis of Chagas' disease: when autoimmune and

- parasite-specific immune responses meet. *An Acad Bras Cienc* 2001; 73: 547-59.
9. Bocchi EA, Guimarães G, Bacal F, et al. Stem cells mobilization treatment removing severe congestive heart failure patients from heart transplantation indication - preliminary results. *J Heart Lung Transplant* 2003; 22: 124 (Supplement 1) (Abstract).
 10. Oh H, Taffer GE, Youker KA, et al. Telomerase reverse transcriptase promotes cardiac muscle cell proliferation, hypertrophy, and survival. *Proc Natl Acad Sc USA* 2001; 98: 10308-13.
 11. Quaini F, Urbanek K, Beltrami AP, et al. ANVERSA, P. Chimerism of the Transplanted Heart. *N Engl J Med* 2002; 346: 5-15.
 12. Glaser R, Lu MM, Narula N, Epstein J. Smooth muscle cells, but not myocytes, of host origin in transplanted human hearts. *Circulation* 2002; 106: 17-9.
 13. Müller P, Pfeiffer P, Koglin J, et al. Cardiomyocytes of noncardiac origin in myocardial biopsies of human transplanted hearts. *Circulation* 2002; 106: 31-5.
 14. Laflamme MA, Myerson D, Saffitz JE, Murry CE. Evidence for cardiomyocyte repopulation by extracardiac progenitors in transplanted human hearts. *Circ Res* 2002; 90: 634-40.
 15. Anversa P, Nadal-Ginard B. Cardiac chimerism: methods matter. *Circulation* 2002; 106: 129-31.
 16. Oh H, Bradfute SB, Gallardo TD, et al. Cardiac progenitor cells from adult myocardium: Homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc Natl Acad Sc USA* 2003; 100: 12313-8.
 17. Kucia M, Dawn B, Hunt G, et al. Cells expressing early cardiac markers reside in the bone marrow and are mobilized into the peripheral blood after myocardial infarction. *Circ Res* 2001; 95: 1191-9.
 18. Valgimigli M, Rigolin GM, Fucili A, et al. CD34+ and endothelial progenitor cells in patients with various degrees of congestive heart failure. *Circulation* 2004; 110: 1209-12.
 19. Werner N, Kosiol S, Schiegl T, et al. Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *N Engl J Med* 2005; 353: 999-1007.
 20. Wojakowski W, Tendera M, Michalowska A, et al. Mobilization of CD34/CXCR4+, CD34/CD117+, c-met+ stem cells, and mononuclear cells expressing early cardiac, muscle, and endothelial markers into peripheral blood in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 2004; 110: 3213-20.
 21. Wu K, Liu YL, Cui B, Han Z. Application of stem cells for cardiovascular grafts tissue engineering. *Transpl Immunol* 2006; 16: 1-7.
 22. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001; 401: 701-5.
 23. Musil LS, Le ACN, Vanslyke JK, Roberts LM. Regulation of connexin degradation as a mechanism to increase gap junction assembly and function. *J Biol Chem* 2000; 275: 25207-15.
 24. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sc USA* 2001; 98: 10344-9.
 25. Takano H, Qin Y, Hasegawa H, et al. Effects of G-CSF on left ventricular remodeling and heart failure after acute myocardial infarction. *J Mol Med* 2006; 84: 185-93.
 26. Harada M, Qin Y, Takano H, et al. G-CSF prevents cardiac remodeling after myocardial infarction by activating the Jak-Stat pathway in cardiomyocytes. *Nat Med* 2005; 11: 305-11.
 27. Behfar A, Perez-Terzic C, Faustino RS, et al. Cardiopoietic programming of embryonic stem cells for tumor-free heart repair. *J Exp Med* 2007; 204(2): 405-20.
 28. Nussbaum J, Minami E, Laflamme MA, Virag JA, Ware CB, Masino A, Muskheli V, Pabon L, Reinecke H, Murry CE et al. Transplantation of undifferentiated murine embryonic stem cells in the heart: teratoma formation and immune response. *FASEB J* 2007; 21(7): 1345-57.
 29. Tomescot A, Leschik J, Bellamy V, et al. Differentiation in vivo of cardiac committed human embryonic stem cells in postmyocardial infarcted rats. *Stem Cells* 2007; 25(9): 2200-5.
 30. Siu CW, Moore JC, Li RA. Human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes for heart therapies. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets* 2007; 7(2): 145-52.
 31. Cai J, Yi FF, Yang XC, et al. Transplantation of embryonic stem cell-derived cardiomyocytes improves cardiac function in infarcted rat hearts. *Cytotherapy* 2007; 9(3): 283-91.
 32. Min JY, Yang Y, Converso KL, et al. Transplantation of embryonic stem cells improves cardiac function in postinfarcted rats. *J Appl Physiol* 2002; 92: 288-96.
 33. Kawamoto A, Gwon H, Iwaguro H, et al. Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. *Circulation* 2001; 103: 634-7.
 34. Yeh ETH, Zhang S, Wu HD, Körbling M, Willerson JT, Estrov Z. Transdifferentiation of human peripheral blood CD34+ enriched cell population into cardiomyocytes, endothelial cells, and smooth muscle cells in vivo. *Circulation* 2003; 108: 2070-3.
 35. Kocher AA, Schuster MD, Szabolcs MJ, et al. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med* 2001; 7: 430-6.

36. Ma N, Ladilov Y, Kaminski A, et al. Umbilical cord blood cell transplantation for myocardial regeneration. *Transplant Proc* 2006; 38: 771-3.
37. Amado LC, Saliaris AP, Schuleri KH, et al. Cardiac repair with intramyocardial injection of allogeneic mesenchymal stem cells after myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sc USA* 2005; 102: 11474-9.
38. Deten A, Volz HC, Clamors S, et al. Hematopoietic stem cells do not repair the infarcted mouse heart. *Cardiovasc Res* 2005; 65: 52-63.
39. Balsam LB, Wagers AJ, Christensen JL, Kofidis T, Weissman IL, Robbins RC. Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature*. 2004; 428(6983): 668-73.
40. Perin EC, Dohman HFR, Borojevic R, et al. Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure. *Circulation* 2003; 107: 2294-302.
41. Strauer BE, Brehm M, Zeus T, et al. Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans. *Circulation* 2002; 106: 1913-8.
42. Stamm C, Westphal B, Kleine HD, et al. Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet* 2003; 361: 45-6.
43. Tse HF, Kwong YL, Chan JFK, Lo G, Ho CL, Lau CP. Angiogenesis in ischaemic myocardium by intramyocardial autologous bone marrow mononuclear cell transplantation. *Lancet* 2003; 361: 47-9.
44. Menasché P, Hagege AA, Vilquin JT, et al. Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41: 1078-83.
45. Reinecke H, Poppa V, Murry CE. Skeletal muscle stem cells do not transdifferentiate into cardiomyocytes after cardiac grafting. *J Mol Cell Cardiol* 2002; 34: 241-9.
46. Schächinger V, Assmus B, Britten MB, et al. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction: final one-year results of the TOPCARE-AMI Trial. *J Am Coll Cardiol* 2004; 44: 1690-9.
47. Assmus B, Schächinger V, Teupe C, et al. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI). *Circulation* 2002; 106: 3009-17.
48. Ozbaran M, Omay SB, Nalbantgil S, et al. Autologous peripheral stem cell transplantation in patients with congestive heart failure due to ischemic heart disease. *Eur J Cardiothorasc Surg* 2004; 25: 342-51.
49. Fernández-Avilés F, San Román JA, García-Frade J, et al. Experimental and clinical regenerative capability of human bone marrow cells after myocardial infarction. *Circ Res* 2004; 95: 742-8.
50. Wollert KC, Meyer GP, Lotz J, et al. Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet* 2004; 364: 141-8.
51. Ince H, Petzsch M, Kleine HD, et al. Prevention of Left Ventricular Remodeling With Granulocyte Colony-Stimulating Factor After Acute Myocardial Infarction. *Circulation* 2005; 112: suppl I 73-80.
52. Zohlnhofer D, Ott I, Mehilli J, et al. Stem cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor in patients with acute myocardial infarction: a randomized controlled trial. *JAMA* 2006; 295: 1003-10.
53. Sant'Anna R, Nardi NB, Sant'Anna JRM, et al. Transplante autólogo de células mononucleares de medula óssea para regeneração miocárdica durante cirurgia cardíaca. *Arq Bras Cardiol* 2004; 83: 39.
54. Tura BR, Martino HF, Gowdak LH, dos Santos RR, Dohmann HF, Krieger JE, Feitosa G, Vilas-Boas F, Oliveira SA, Silva SA, Bozza AZ, Borojevic R, de Carvalho AC. Multicenter randomized trial of cell therapy in cardiopathies - MiHeart Study. *Trials*. 2007; 8: 2.
55. Soares MBP, Lima RS, Rocha LL, et al. Transplanted bone marrow cells repair heart tissue and reduce myocarditis in chronic chagasic mice. *Am J Pathol* 2004; 164: 441-7.
56. Aguiar R. Cientista da Fiocruz ganha o Prêmio Zerbini de Cardiologia. Assessoria de Imprensa Fiocruz. 2003. http://www.fiocruz.br/ccs/novidades/dez03/premio_raq.htm.
57. Vilas-Boas F, Feitosa GS, Soares MBP, et al. Transplante de Células de Medula Óssea para o Miocárdio em Paciente com Insuficiência Cardíaca Secundária à Doença de Chagas. *Arq Bras Cardiol* 2004; 82: 181-4.
58. Kang H, Kim H, Zhang S, et al. Effects of intracoronary infusion of peripheral blood stem-cells mobilised with granulocyte-colony stimulating factor on left ventricular systolic function and restenosis after coronary stenting in myocardial infarction: the MAGIC cell randomised clinical trial. *Lancet* 2004; 363: 751-6.
59. Silva GV, Litovsky S, Assad JA, et al. Mesenchymal stem cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a canine chronic ischemia model. *Circulation* 2005; 111: 150-6.
60. Denning-Kendall P, Singhs S, Bradley B, Hows J. Cytokine expansion culture of cord blood CD34+ cells induces marked and sustained changes in adhesion receptor and CXCR4 expressions. *Stem Cells* 2003; 21, 61-70.

Avaliação da segurança dos xampus de uso infantis utilizados no comércio de São Paulo

Safety assessment of children shampoos commercialized in the São Paulo city

RIALA6/1131

Maria Cristina SANTA BÁRBARA^{1*}, Adriana B. ALMODÓVAR², Lígia L. MIYAMARU¹, Adriana BUGNO², Leda M. A. DOS SANTOS², Thais Y. SAITO¹.

*Endereço para correspondência: ¹Instituto Adolfo Lutz, Seção de Cosméticos e Produtos de Higiene, Divisão de Bromatologia e Química. Av. Dr. Arnaldo, 355 CEP.01246-902, São Paulo, SP/Brasil.

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

Recebido: 02/07/2007 – Aceito para publicação: 03/12/2007

RESUMO

Os xampus infantis são formulações a base de formulações tensoativas mais suaves e contêm detergentes anfóteros que buscam o benefício de não irritar os olhos. O objetivo deste trabalho foi de verificar a qualidade de xampus infantis quanto aos parâmetros físico-químicos, microbiológicos e toxicológicos. Foram avaliadas 15 amostras de diferentes marcas comercializadas na cidade de São Paulo. As amostras apresentaram-se em conformidade com a Legislação vigente quanto à segurança de seu uso. O teor de princípio ativo (entre 3 e 5%), as aminas livres e o pH estavam de acordo com as formulações apresentadas; e no ensaio microbiológico o resultado foi satisfatório. Quanto à irritação ocular, 6,7% das amostras apresentaram índices de moderada irritação; 93,3% foram levemente irritantes quando foi aplicado o produto puro, conforme estabelecido no protocolo de Draize. Quando produto foi diluído a 50%, 20% das amostras apresentaram-se levemente irritantes, enquanto os demais demonstraram resultados satisfatórios. As amostras não apresentaram irritação ocular quando foram aplicadas diluídas a 10%. Os resultados obtidos mostraram que as diferentes marcas de xampus estudados estão dentro da qualidade esperada para o produto. Sugere-se que seja incluída no rótulo a advertência sobre o cuidado para evitar que o produto puro entre em contato com os olhos.

Palavras-chave. xampu, tensoativo, irritação ocular, aminas, análises microbiológica.

ABSTRACT

Shampoos for children use are based on softer formulations, and including amphoteric detergents to avoid eyes irritation. The objective of this study was to assess the quality of children shampoos as for physical-chemical, microbiological, and toxicological parameters. Fifteen samples of shampoo from different brands commercialized in the city of Sao Paulo, Brazil, were evaluated. The analyzed shampoos samples were in conformity with the enforced laws for the active principles rate (between 3.0 and 5.0%); pH (within neutrality range); amines rate (below 0.5%), as well as for microbiological assays. In relation to ocular irritation, 6.7% of samples showed a moderate irritation; 93.3% caused slight irritation when the undiluted product was used. By diluting the product at 50%, 20% of the analyzed samples resulted in slight irritation, whereas the other 80% presented satisfactory results. No ocular irritation was observed in products diluted at 10%. This analysis showed that the shampoos from different brands are within the quality range expected for these products, although the consumers have to be mindful as for using undiluted shampoos in children, as they might cause ocular irritation in diverse degrees.

Key words. shampoo, tensioactive, ocular irritation, amines, microbiological analyses.

INTRODUÇÃO

De acordo com o Decreto nº 79.094 de 05 de janeiro de 1977, que regulamentam a Lei nº 6.360¹, xampu são produtos de higiene destinada à limpeza do cabelo e do couro cabeludo por ação tensoativa ou de absorção sobre as impurezas, apresentados em formas e veículos diversos, podendo ser coloridos e/ou perfumados, incluídos na mesma categoria dos produtos destinados ao embelezamento do cabelo por ação enxaguatória.

Os xampus ganharam destaque no final da década de 30, pois apresentavam melhor desempenho no resultado estético da lavagem de cabelos, até então era realizada com sabão em barra².

Xampus contêm detergentes, substâncias espumantes, condicionadores, espessantes, opacificantes, substâncias sequestrantes, fragrâncias, conservantes e aditivos especiais. Os detergentes também conhecidos como surfactantes, são usualmente tensoativos aniônicos, catiônicos, anfotéricos e/ou surfactantes naturais^{3,4}. Os tensoativos anfotéricos são menos agressivos, apresentam poder detergente menor que os de uso freqüente, podem conferir aos cabelos uma aparência gordurosa. Não são utilizados como único tensoativo em formulações, sendo que se obtêm melhores resultados quando estão associados à tensoativos aniônicos. O xampu deve apresentar boa ação detergente, cumprindo a sua finalidade de uso, porém não deve retirar a oleosidade natural dos cabelos, para não deixá-los opacos, e nem ressecados, e não devem causar irritação ao couro cabeludo⁴.

A Legislação vigente classifica o xampu de uso infantil como de risco 2; produto que exige comprovação de segurança e/ou eficácia, bem como informações e cuidados, modo e restrições de uso⁵.

A diversidade de matérias primas utilizadas para formular xampus contribui para obtenção das diferentes apresentações do produto. Há xampus em pó, sob a forma líquida e em creme. São diferenciados quanto à finalidade de uso em xampus básicos, para bebês, condicionadores, medicamentosos e profissionais^{3,6}.

A pele da criança e, particularmente do bebê, difere histológica e fisiologicamente da pele de adultos, por ser mais fina, menos cornificada e apresentar menos pêlos; análises químicas mostram maior proporção de água e fluidos minerais extracelulares; além disso, é altamente susceptível a irritação e infecções, pois as funções imunológicas estão pouco desenvolvidas. Estas diferenças resultam na necessidade de formulações adequadas aos pequenos consumidores. Os xampus para uso infantil, em especial bebês, destinam-se à limpeza branda e não devem ser irritantes aos olhos^{7,8}.

As formulações de xampus infantis apresentam tensoativos anfotéricos, os quais conferem maior viscosidade ao produto final. A viscosidade não está diretamente ligada ao xampu infantil e sim as formulações

de xampus em geral, pois normalmente o consumidor associa a qualidade de um xampu à sua viscosidade⁹. Em formulações de xampus, alguns componentes, como as alcalonamidas de ácidos graxos (amina secundária), tem a finalidade de oferecer ao usuário a idéia de estar utilizando um produto mais concentrado e sobreengordurante, pois aumentam a viscosidade do produto e estabilizam a espuma. Porém, a Legislação vigente para cosméticos em geral estabelece que o teor de aminas secundárias livres deva ser no máximo 0,5% p/p, pois quando em meio ácido, estas substâncias podem reagir com compostos nitrosantes (nitrito, óxido de nitrogênio) e formar as nitrosaminas, que são carcinogênicas¹⁰.

Considerando que os xampus destinados às crianças, são produtos de livre acesso ao consumidor o mesmo deve ser seguro nas condições normais ou razoavelmente previsíveis de uso, porém com certa probabilidade de ocorrência de uso inadequado sendo assim a importância da avaliação quanto aos parâmetros microbiológicos, físico-químicos e toxicológicos¹¹.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras

Foram analisadas 15 amostras de xampu infantil, de diversas marcas, disponíveis no comércio da cidade de São Paulo.

Métodos

Avaliação microbiológica

Foram avaliados os parâmetros estabelecidos na Resolução nº 481¹², de 23 de Setembro de 1999, destinados ao uso infantil, para área dos olhos e aqueles que entram em contato com mucosas (enumeração de microrganismos totais aeróbios, ausência de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, além de coliformes totais e fecais), sendo utilizada metodologias conforme se encontram descritas em compêndios farmacopêuticos^{13,14}.

Ensaio de pH.

A determinação do pH foi realizada na amostra pura, utilizando-se potenciômetro digital¹⁵.

Ensaio de determinação do tensoativo aniônico

O ensaio de determinação do tensoativo aniônico foi realizado por método titulométrico, utilizando-se solução padronizada de cloreto de benzetônio 0,004 M e solução indicadora, composta por dissulfine blue e brometo de dimidium¹⁶.

Ensaio de Irritação ocular

O ensaio de irritação ocular, preconizado como avaliação de segurança *in vivo* pode ser realizado em humanos ou animais. Neste estudo, foram utilizados seis

coelhos albinos, com peso entre 2 e 3 kg, cujos olhos foram observados 24 horas antes da execução do ensaio, para garantir ausência de lesões e, portanto evitar a ocorrência de resultados falso-positivos. Foi aplicado 0,1mL da amostra no saco conjuntival de um dos olhos de cada animal, de acordo com o estabelecido pelo método de Draize. As observações dos efeitos foram realizadas após 1, 24, 48, 72 horas e 7,0 dias após a aplicação da amostra, sendo consideradas manifestações positivas de irritabilidade, a presença de ulceração e/ou opacidade da córnea, ou inflamação da íris e conjuntiva. As interpretações das observações obedecem às regras de Draize^{17,18}.

Ensaio de amina livre

O ensaio de determinação de amina livre foi realizado por titulação, com solução de ácido clorídrico em isopropanol utilizando azul de bromofenol como indicador¹⁹.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um dos requisitos críticos para a formulação de um xampu infantil seguro refere-se ao pH, o qual deve ser tamponado ao pH do fluido lacrimal, entre 6,3 e 8,3⁸. A medida de pH também pode ser utilizada como triagem inicial para avaliar a segurança de um produto mas não se pode concluir que mesmo apresentando pH entre 4 e 8 o produto não é irritante para os olhos²⁰. As medidas de pH realizadas nas amostras indicaram valores em torno de 7,0±0,3, próximos ao pH da lágrima, e portanto em conformidade com os requisitos estabelecidos.

Os xampus para uso infantil são caracterizados por pH próximo ao lacrimal e por apresentarem tensoativos suaves, responsáveis pela limpeza dos cabelos ao emulsificar as impurezas não solubilizadas pela água. Os detergentes atuam pela supressão da tensão superficial da pele e cabelos, entretanto, quanto maior for a supressão obtida, maior é o risco de danos à pele e ao couro cabeludo. Além disso, deve-se ressaltar que algumas crianças podem apresentar intolerância a estes componentes dos xampus demonstradas por irritabilidade e dificuldade em dormir^{21,22}.

Embora a legislação brasileira não defina limites máximos para a concentração de tensoativos em produtos para uso infantil, estabelece que sua quantidade deva ser suficiente para limpar os cabelos e, quando no comércio, devem estar em conformidade com a formulação registrada na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA/MS). Neste estudo, verificou-se que a concentração dos tensoativos aniônicos estava de acordo com a formulação registrada na ANVISA, cujas formulações nos foram concedidas pelas empresas fabricantes dos produtos avaliados.

A legislação estabelece que os teores de amina secundárias, em produtos cosméticos em geral, devem ser inferiores a 0,5% p/p, sendo que todas as amostras analisadas estavam em conformidade com a legislação.

Com relação à avaliação da qualidade microbiológica, os resultados obtidos indicaram que todas as amostras analisadas estavam em conformidade com os parâmetros definidos em legislação específica.

No ensaio de irritação ocular, 93,3% das amostras analisadas foram classificadas como irritantes leves, enquanto que 6,7% foram classificadas como irritantes moderadas, quando avaliadas sem diluição. Foram avaliados na forma pura para comparar os índices de irritação ocular com a forma diluída e pH. Embora o pH do produto apresentou-se dentro da neutralidade houve irritação ocular; onde 14 amostras apresentaram-se irritante leve e 01 irritante moderado.

Reações associadas ao uso de produtos cosméticos podem ser observadas, desde diferentes níveis de irritação até sensibilização. Estas reações envolvem mecanismos imunológicos e podem aparecer em áreas distintas da área de aplicação e ter efeito sistêmico.

Considerando-se o risco associado à utilização de produtos cosméticos, a avaliação de segurança deve ser feita em diferentes condições de uso e áreas de contato, sendo que neste estudo, a irritação ocular foi avaliada tanto na amostra não diluída, como anteriormente relatado, como na amostra diluída a 50% e na amostra diluída a 10%. Os resultados obtidos indicaram que apenas 20% das amostras diluídas a 50% evidenciaram resultados levemente irritantes, enquanto que nenhuma das amostras diluídas a 10% evidenciou irritação ocular mesmo quando observadas após uma hora de contato, conforme preconiza o método de Draize.

Diversos estudos sugerem diminuir a quantidade aplicada no olho do animal de 0,1mL como no método de Draize para 0,01mL sem alterar a sensibilidade do método. A redução do volume sugerida visa ainda, a tornar o ensaio mais próximo do emprego do produto, passando a refletir o modo de uso real em humanos²³. Também foram avaliados detergentes líquidos nas mesmas condições, em voluntários humanos e coelhos, confirmaram que o teste de irritação ocular com baixo volume em coelhos permite prever o perigo de irritação ocular no ser humano, pois a sensibilidade geralmente é maior que a observada no homem²⁴.

Os resultados obtidos neste estudo representado na tabela 1 indicam que os produtos estavam em conformidade com a legislação vigente quanto aos aspectos físico-químicos, microbiológicos e toxicológicos avaliados, denotando a preocupação dos fabricantes em colocar, no mercado, produtos seguros e eficazes.

Tabela 1. Valores obtidos na avaliação da segurança de xampus infantis.

Amostra	pH	IOPP	IOPD50%	IOPD10%	Teor de ativo % p/p	Teor de aminas	Microbiológico
01	7,2	IL	NI	NI	5,00	0,44	Negativo
02	7,3	IL	IL	NI	5,00	0,40	Negativo
03	7,0	IL	NI	NI	5,00	0,40	Negativo
04	7,1	IL	NI	NI	5,10	0,44	Negativo
05	7,0	IM	NI	NI	5,00	0,43	Negativo
06	7,0	IL	NI	NI	4,90	0,42	Negativo
07	7,2	IL	NI	NI	4,80	0,41	Negativo
08	7,0	IL	NI	NI	4,70	0,40	Negativo
09	7,0	IL	NI	NI	4,30	0,45	Negativo
10	6,9	IL	NI	NI	4,60	0,42	Negativo
11	7,0	IL	NI	NI	4,60	0,40	Negativo
12	6,9	IL	NI	NI	4,50	0,34	Negativo
13	6,9	IL	NI	NI	4,70	0,33	Negativo
14	7,1	IL	NI	NI	5,80	0,30	Negativo
15	7,3	IL	NI	NI	3,00	0,32	Negativo

IOPP: Índice de irritação ocular para produtos puros
IOPD: Índice de irritação ocular para produtos diluídos
IL: Irritante leve
NI: Não irritante
IM: Irritante moderado

CONCLUSÃO

Os resultados dos ensaios realizados nos xampus atendem as Boas Práticas de Fabricação e Controle e estão dentro das especificações da legislação. O detergente pediátrico ideal deve ser suave o bastante para evitar dermatites e ser livre de substâncias potencialmente irritantes ou sensibilizantes. O consumidor deve atentar para o uso do xampu infantil puro, o que por descuido pode acarretar irritação ocular. Sugerimos que se inclua no rótulo do produto a advertência para o cuidado do produto puro entrar em contato com os olhos.

REFERÊNCIAS

1. Brasil. Decreto nº 79.094, de 05 de jan.1977 da Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Regulamenta a Lei nº 6360 de 23 de setembro de 1977, que submetem a Sistema de Vigilância Sanitária os produtos de medicamentos, insumos farmacêuticos, drogas. Correlatos, cosméticos, produtos de higiene, saneantes e outros. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 07 jan.1977.

2. Draelos ZD. Xampus. In: Draelos ZD, editor. *Cosméticos em Dermatologia*. 2nd ed. Rio de Janeiro: Ed Revinter; 1999. p.121-28.
3. Fox C. Introdução à formulação de xampus. *Cosmet Toiletr* 1989; 1(1):17-31.
4. Leonardí GR, Matheus LGM. *Cosmetologia Aplicada*. São Paulo (SP): Medfarma; 2004.
5. Brasil. Resolução RDC nº 211, de 14 de jul. 2005 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Define e classifica os produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes em seu grau de risco. *Diário Oficial [da] Republica Federativa do Brasil, Poder Executivo*, Brasília, DF, 18 jul 2005. Seção 1, p.58-60.
6. Prista LN, Bahia MFG, Vilar E. *Dermofarmácia e Cosmética*. Porto: Associação Nacional de Farmácia; 1995.
7. Wilkinson JB, Moore RJ. Shaving preparations. In: Wilkinson JB, Moore RJ, editores. *Harry's Cosmeticology* 7th ed. London: George Goodwin; 1982. p.156-89.
8. Balsam MS, Sagarim E, Gershon SD, Rieger MM, Strianse SJ, Baby Toiletries. In: Balsam MS, Sagarim E editores. *Cosmetics Science and Technology*. 2nd ed. New York: Ed Wiley; 1972. p.115-77.
9. Barata EA. Higiene do Cabelo. In: Barata EA, editor. *A Cosmetologia Princípios Básicos*. 1^o ed. São Paulo: Ed Tecnopress; 1995. p.145-58.
10. Brasil. Resolução RDC nº 215, de 26 de jul. 2005 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Estabelece a lista de substâncias que os produtos de higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes não devem conter exceto nas condições e com as restrições estabelecidas. *Diário Oficial [da] Republica Federativa do Brasil, Poder Executivo*, Brasília, DF, 26 jul 2005. Seção 1, p.22-7.
11. Guia para Avaliação de segurança de Produtos Cosméticos Manual Online, 2003. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/cosméticos/guia/index.htm>.
12. Brasil. Resolução RDC nº 481 de 23 de set de 1999 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Dispõe sobre o controle de qualidade microbiológica para os produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes. *Diário Oficial [da] Republica Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 06 de out. 1999. Seção 1, p.06.
13. *Farmacopeia Brasileira*. Parte I. 4^a ed. São Paulo: Ed: Atheneu; 1988. p.V.5.1.6-1-V.5.1.7-6.
14. *British Pharmacopoeia*. London: The Stationery Office, 2004, V. IV. p.A 334, A 44.
15. Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde [INCQS]. Determinação de pH. Rio de Janeiro; 2001.
16. Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde [INCQS]. Determinação tensoativo aniônico. Rio de Janeiro; 2002.
17. Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde [INCQS]. Teste de irritação ocular. Rio de Janeiro; 2002.
18. Kay JH, Calandra JC. Interpretation of eye irritation tests. *J Soc Cosmet Chem* 1962; 13: 281-9.
19. Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists Society – Forth Edition Total Amine Value of fatty Amines (indicator method AOCS-TF 1b 64).
20. Worth AP, Cronin MTD. The use of pH measurements to predict the potential of chemicals to cause acute dermal and ocular toxicity. *Toxicology*. 2001; 169: p.119-31.
21. Gelmetti C. Skin Cleansing in Children. *J Eur Academy Dermatol Venereol*. V.15 p. 12-15, 2001.
22. Griffin JJ, Corcoran RF, Akana KK. The pH of hair shampoos. *J Chem Educ*. 1977; 54: 553-4.
23. Cruz AS, Barbosa ML, Pinto TJA. Testes *in vitro* como alternativa aos testes *in vivo* de Draize. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2004; 63 (1): 1-9.
24. Roggeband R, York M, Perigo M, Braun W. Eye irritation responses in rabbit and man after single applications of equal volumes undiluted model liquid detergent products. *Food Chem Toxicol*. 2000; 38: 727-34.

Avaliação da presença de resíduos em leite de vacas tratadas com diflubenzurom

Determination of pesticide residues presence in milk from cows treated with diflubenzuron

RIALA6/1132

Sílvia A.V. TFOUNI^{1*}, Regina P.Z. FURLANI¹, Jefferson D.ARAÚJO², Rosália M. SOUZA²

*Endereço para correspondência: ¹Centro de Química de Alimentos e Nutrição Aplicada, Instituto de Tecnologia de Alimentos – ITAL, Av Brasil, 2880, CEP 13070-178, Campinas/SP, Brasil. Fax: (19) 3242-4585, e-mail: tfouni@ital.sp.gov.br.

²Champion Farmoquímico Ltda, Av. Principal, Lote 12, DAIA, Anápolis, GO/Brasil. CEP: 75133-600

Recebido: 07/05/2007 – Aceito para publicação: 03/01/2008

RESUMO

O diflubenzurom é um pesticida que pode ser utilizado na pecuária como regulador do crescimento de insetos, entre eles a mosca-do-chifre. Esse composto é usualmente administrado oralmente ao gado e é efetivo contra larvas de Díptera que crescem no estrume. O objetivo do presente estudo foi de avaliar a presença de diflubenzurom em amostras de leite cru coletadas de seis vacas leiteiras da raça Girolanda tratadas com uma marca comercial de diflubenzurom em pó. A determinação dos resíduos envolveu a extração do composto com acetato de etila, remoção da gordura com hexano e análise cromatográfica por CLAE com detector UV-Visível (254nm). O princípio ativo diflubenzurom não foi detectado nas seis amostras analisadas (<0,01mg/kg). Dessa forma, os resultados fornecem indicativos de que a utilização do princípio ativo, em níveis suficientes para se obter o efeito inseticida desejado, pode resultar em um leite considerado seguro para o consumo em termos da presença de resíduos de diflubenzurom.

Palavras-chave. diflubenzurom, pesticida, mosca-do-chifre, girolanda, leite, 1-(4-chlorofenil)-3-(2,6-difluorobenzoi)uréia.

ABSTRACT

Diflubenzuron has been a pesticide that can be used in cattle breeding as insect growth regulator, and the horn fly has been an insect that can be controlled by the use of this compound. Diflubenzuron has usually been orally administered to cows, and it has been effective against Diptera larvae growing in manure. The objective of the present study was to evaluate the occurrence of diflubenzuron in milk samples collected from six Girolanda dairy cows treated with a commercial brand of diflubenzuron powder. The pesticide residues determination included the compound extraction with ethyl acetate, fat removal with hexane, and chromatography analysis by HPLC with UV detection (254nm). Diflubenzuron was not detected (<0.01 mg/kg) in any of the six analysed samples. These data indicate that the use of this compound, in adequate doses for achieving a proper insecticide effect, may result in milk considered safe regarding to the presence of diflubenzuron residues.

Key words. diflubenzuron, pesticide, horn fly, girolanda, milk, 1-(4-chlorophenyl)-3-(2,6-difluorobenzoyl)urea.

INTRODUÇÃO

O Brasil é o sétimo maior produtor mundial de leite tendo produzido 23.320 milhões de litros em 2005 e ordenhado em torno de 20.820 mil cabeças de vacas leiteiras¹.

A mosca-do-chifre (*Haematobia irritans*) é um inseto hematófago que se alimenta do sangue de animais através de picadas constantes e doloridas, resultando em um desconforto do animal que passa a apresentar dificuldades para dormir e se alimentar adequadamente. Como consequência, as vacas leiteiras podem apresentar uma queda de até 50% na produção de leite².

A mosca-do-chifre pode ser controlada com o uso de diflubenzurom (1-(4-chlorofenil)-3-(2,6-difluorobenzoil) uréia), um pesticida que é utilizado como regulador do crescimento de insetos, atuando na interrupção da síntese e deposição da quitina^{3,4}. Esse princípio ativo é usualmente administrado por via oral ao gado e é efetivo contra larvas de Díptera que crescem no estrume. O composto, após a administração oral, permanece no estômago dos animais tratados prevenindo que larvas de insetos cresçam no estrume.

O diflubenzurom apresenta baixa toxicidade oral aguda e baixa toxicidade para mamíferos, sendo que o FAO/WHO *Joint Meeting on Pesticide Residues* (JMPR) avaliou o diflubenzurom em 2001 e a IDA (ingestão diária aceitável) de 0,02mg/kg de peso corpóreo estabelecida previamente em 1985 foi mantida⁵.

A administração para o gado de produtos que apresentam o diflubenzurom como princípio ativo são permitidos no Brasil pelo Ministério da Agricultura e foram recentemente introduzidos no mercado nacional. Na legislação brasileira não há LMR (limite máximo de resíduo) estabelecido para diflubenzurom em leite e o *Codex Alimentarius* por sua vez estabelece um LMR de 0,02mg/kg⁶.

Apesar de o diflubenzurom ter seu uso aprovado e ser largamente empregado nos EUA e na Europa, não existem muitos dados disponíveis na literatura relativos à sua presença em leite. Corley et al.⁷ verificaram que não houve detecção de resíduos (<0,1mg/kg) em cinco amostras de leite coletadas de uma vaca leiteira tratada com 1mg/kg de peso corpóreo do princípio ativo. IVIE⁸ estudou o destino de diflubenzurom com marcador após administração de uma única dose oral de 10 mg/kg de peso corpóreo. O estudo foi realizado com uma vaca leiteira e o autor sugere que o uso de diflubenzurom para controle de insetos não resulta em contaminação apreciável do leite. Miller et al.⁹, por sua vez, detectaram resíduos de 0,02mg/kg de diflubenzurom em leite de vaca tratada por três meses com 16mg/kg de peso corpóreo. Com exceção de Ivie⁸, que utilizou um animal da raça Jersey, os outros autores não discriminam a raça empregada no estudo.

Desta forma, apesar da utilização de baixas doses do princípio ativo não apresentar preocupação aparente em relação à presença de seus resíduos em leite, os animais utilizados no Brasil para produção de leite podem ser de raças diferentes daquelas utilizadas nos estudos citados anteriormente, assim

como o clima e a alimentação dos animais são também distintas. Adicionalmente, esse pesticida foi recentemente introduzido no mercado nacional para utilização no controle de insetos na pecuária. Assim sendo, torna-se importante realizar um estudo quanto à possibilidade da presença de resíduo de diflubenzurom em amostras de leite provenientes de vacas leiteiras brasileiras tratadas com esse princípio ativo.

Os objetivos do presente estudo foram adaptar e validar uma metodologia para análise de diflubenzurom em leite e avaliar a sua presença em amostras de leite coletadas de vacas leiteiras da raça Girolanda tratadas de modo a verificar se os níveis encontrados estão de acordo com o LMR estabelecido pelo *Codex Alimentarius*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Padrões e reagentes

O padrão secundário de diflubenzurom utilizado foi validado com um padrão analítico do mesmo princípio ativo da *Chem Service*. Foram utilizados: acetato de etila, metanol e hexano (grau HPLC) da Malinckrodt; acetonitrila (grau HPLC) e sulfato de sódio anidro da J.T. Baker. A água foi obtida através de um sistema de purificação Milli-Q da Millipore.

Amostras

No presente estudo seis (6) vacas leiteiras foram tratadas com uma marca comercial de diflubenzurom em pó (Difly S3, Champion Farmoquímico Ltda.) que contém 3% do princípio ativo na formulação. O diflubenzurom foi adicionado ao sal mineral, na proporção de 20g do produto comercial por quilo de sal e fornecido às vacas diariamente por um período de sete (7) meses.

As vacas Girolanda (cruzamento entre Gir e Holstein) utilizadas eram provenientes do cerrado brasileiro e tinham entre 36 e 72 meses de idade e pesavam de 480 a 560kg. Ao final do sétimo mês de administração do composto aos animais, as amostras de leite foram coletadas de cada uma das vacas após cuidadosa higiene do úbere. As amostras de leite *in natura* foram congeladas e armazenadas até serem analisadas.

Extração e limpeza

A metodologia para extração e limpeza da amostra foi baseada no método descrito por Corley et al.⁷.

Após a homogeneização da amostra no laboratório, 5g foram pesados e secos com adição de sulfato de sódio anidro. As amostras foram extraídas em agitador orbital, por 30 minutos, sucessivamente com três alíquotas de acetato de etila (50, 30 e 30mL). As soluções foram filtradas em papel de filtro e os filtrados foram combinados e concentrados em evaporador rotativo a 40°C até aproximadamente 4mL e secos sob fluxo de nitrogênio. O resíduo foi dissolvido em 20mL de acetonitrila e transferido para um funil de separação onde duas alíquotas de 20mL de hexano foram usadas para extração da gordura. A solução de acetonitrila foi concentrada em evaporador

rotativo a 40°C e depois seca sob fluxo de nitrogênio. O resíduo foi dissolvido em 1mL de acetonitrila e filtrado em filtro com porosidade de 0,45µm (PVDF Millex-HV, Millipore) antes da injeção. Todas as amostras foram analisadas em duplicata.

Cromatografia líquida (CLAE)

As análises foram realizadas utilizando-se um sistema cromatográfico equipado com uma bomba Varian modelo 9002 e detector UV-Visível Varian modelo 9050 (comprimento de onda de detecção de 254nm). Para a separação foi utilizada uma coluna analítica C18 (Vydac 201 TP54, 250 x 4,6mm, partículas de 5µm) estável a 30°C e fase móvel composta de 50% água, 25% acetonitrila e 25% metanol (v/v/v) a uma vazão de 1mL/min. O volume de injeção foi de 20µL. Os picos nas amostras foram identificados através de comparação com o tempo de retenção das soluções padrão (16,5min) e através da adição do padrão de diflubenzurom aos extratos para confirmação (co-cromatografia).

Quantificação

A quantificação foi feita por padronização externa. Para a construção da curva analítica foram realizadas injeções de 20µL, em duplicata, das soluções padrão de diflubenzurom em 6 diferentes concentrações (0,05 a 0,52µg/mL). O limite de quantificação foi estimado tomando como base o desvio padrão calculado de sete replicatas de uma mesma amostra de leite de vaca não tratada adicionada de padrão de diflubenzurom no nível de 0,02mg/kg^{10, 11}.

Recuperação

O estudo de recuperação foi realizado adicionando-se quantidades conhecidas de diflubenzurom em amostra de leite,

coletada de uma vaca não tratada, em três diferentes concentrações variando de 0,02 a 0,1mg/kg. As análises das amostras fortificadas, assim como as controles, foram feitas em duplicata. As recuperações foram calculadas pela diferença entre a concentração do composto nas amostras fortificadas e não-fortificadas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos na validação da metodologia, como recuperação e o limite de quantificação para diflubenzurom em leite estão apresentados na Tabela 1. O coeficiente de variação médio entre as injeções dos pontos da curva analítica foi de 6,5% e coeficiente de correlação (r²) foi igual a 0,9809.

Os valores de recuperação obtidos ficaram entre 78,3% e 83,67%, esses resultados são considerados satisfatórios para determinações em níveis de mg/kg¹² e indicam que os procedimentos de extração e análise empregados são adequados para a matriz analisada.

A Tabela 2 apresenta o consumo médio mensal de diflubenzurom pelas 6 vacas leiteiras utilizadas no estudo. Conforme apresentado na tabela, pode-se verificar que a ingestão média do composto foi de 60,2mg/dia. De acordo com a dosagem indicada pelo fabricante do produto comercial Difly S3, o animal deve consumir em torno de 30mg/dia do princípio ativo para se obter o efeito inseticida desejado. Assim sendo, o consumo médio registrado pelas vacas utilizadas no estudo foi duas vezes maior do que o recomendado, gerando uma margem de segurança quando da avaliação da presença de resíduos no leite.

Tabela 1. Parâmetros obtidos na validação da metodologia para a determinação de diflubenzurom em leite: limite de quantificação (LQ), recuperação (R) e desvio padrão (DP).

	LQ (mg/kg)	Nível de fortificação (mg/kg)	R ± DP (%) ^a
Diflubenzurom		0,02	83,6 ± 20,9
	0,01	0,05	82,5 ± 3,3
		0,10	78,3 ± 13,0

^a Média de duplicata

Tabela 2. Ingestão média de diflubenzurom pelas vacas leiteiras utilizadas no estudo.

Ingestão de diflubenzurom (mg/vaca/dia)*	Mês (ano de 2006)							Média
	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez	
	57,6	60,6	68,4	50,4	58,2	64,2	61,8	60,2

* Média da ingestão das 6 vacas.

Os resultados obtidos para as análises das seis amostras de leite coletadas das vacas leiteiras que receberam o princípio ativo mostraram que o diflubenzurom não foi detectado ($< LQ = 0,01 \text{ mg/kg}$) em nenhuma das amostras. Esses resultados estão de acordo com os encontrados em estudos realizados por Corley et al.⁷ e Ivie⁸, que também não detectaram resíduo nas amostras de leite proveniente de vacas que foram tratadas com o mesmo princípio ativo.

As amostras de leite analisadas estão de acordo com o LMR estabelecido pelo Codex para leite, ou seja, menor que $0,02 \text{ mg/kg}$.

Considerando-se que as doses de diflubenzurom consumidas pelos animais no estudo foram superiores à indicada pelo fabricante do produto, verificou-se por meio deste estudo que a utilização do princípio ativo, em níveis suficientes para se alcançar o efeito inseticida desejado, pode resultar na obtenção de leite com níveis de resíduo menores do que o máximo recomendado pela legislação internacional (*Codex Alimentarius*).

REFERÊNCIAS

1. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA - Embrapa Gado de Leite. Classificação mundial dos principais produtores de leite – 2005. Disponível em: <http://www.cnpqgl.embrapa.br/producao/producao.php>. Acesso em 12 março 2007.
2. Bonafé VL, Carvalho MF. Mosca-do-chifre. CATI Responde, Campinas, n.5, 1996. Disponível em: <http://www.cati.sp.gov.br/novacati/tecnologias/catiresponde/catiresp.html>. Acesso em 12 março 2007.
3. Martins F, Silva IG. Avaliação da atividade inibidora do diflubenzuron na ecdiase das larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera, Culicidae). *Rev Soc Bras Med Trop*. 2004; 37(2):135-8.
4. Silva JJ, Mendes J. Effect of diflubenzuron on immature stages of *Haematobia irritans* (L.) (Diptera: Muscidae) in Uberlândia, State of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002; 97(5):679-82.
5. JMPR – Joint FAO/WHO Meetings on Pesticides Residues. Pesticides residues in food 2001. Part II - Toxicological. Geneva: WHO, 2001.
6. *Codex Alimentarius*. Pesticides Residues in Food (MRLs/EMRLs). Disponível em: http://www.codexalimentarius.net/mrls/pestdes/jsp/pest_q-e.jsp. Acesso em 12 março 2007.
7. Corley C, Miller RW, Hill KR. Determination of N-(4-chlorophenyl)-N'-(2,6-difluorobenzoyl)-urea in milk by high speed liquid chromatography. *JAOAC Int*. 1974;57(6):1269-71.
8. Ivie GW. Fate of diflubenzuron in cattle and sheep. *J Agric Food Chem*. 1978;26(1):81-8.
9. Miller RW, Corley C, Oehler DD, Pickens LG. Feeding TH-6040 to cattle: residues in tissues and milk and breakdown in manure. *J Agric Food Chem*. 1976; 24 (3): 687-8.
10. Taylor JK. Quality assurance of chemical measurements. 1ed. Chelsea: Lewis Publishers Inc. 1987.
11. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO); Orientação sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos - Documento de caráter orientativo. DOQ-CGCRE-008, Revisão 02 - Junho/2007.
12. Horwitz W, Kamps LR, Boyer KW. Quality Assurance in the analyses of foods for trace constituents. *JAOAC Int*. 1980;63(6):1344-54.

Determinação de ocratoxinas em cervejas, por injeção direta da amostra empregando uma coluna cromatografica IS-aniônica

Ochratoxins determination in beers by direct injection of the sample using a IS-anionic column chromatography

RIALA6/1133

Eliane M. R. S. SIMIONATO^{1*}; Manoel Lima de MENEZES²

*Endereço para correspondência: ¹Universidade do Sagrado Coração (USC), Centro de Ciências da Saúde, Rua Irmã Arminda 10-50, Bauru, SP/Brasil, CEP 17011-160, fone: 2107-7258. Fax: 2107-7000. esimionato@usc.br

²Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências, Departamento de Química, Campos Bauru, SP/Brasil. Av. Eng. Luiz Edmundo Carrijo Coube n° 14-01, CEP 17033-360.

Recebido: 26/07/2007 – Aceito para publicação: 28/12/2007

RESUMO

A ocratoxina A é nefrotóxica e tem sido encontrada em milho, soja, trigo, cevada, arroz e amendoim. O brasileiro consome em média 49 litros de cerveja por ano, sendo que a matéria-prima principal é a cevada, além de milho e o arroz. A determinação das ocratoxinas A e B em bebidas requerem o *clean up* ou colunas de imunoafinidade. Um método analítico, por injeção direta da amostra, empregando cromatografia líquida de alta eficiência, com uma coluna cromatográfica IS-aniônica (Internal Surface Reverse Phase) foi desenvolvido. A recuperação do método variou de 78,5 a 92,1% para os níveis de ocratoxina A na faixa de 0,25 a 4,00 $\mu\text{g.L}^{-1}$; e de 76,5 a 93,1% para a ocratoxina B na faixa de 1,25 a 20,00 $\mu\text{g.L}^{-1}$; limites de detecção de 0,15 e 0,35 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para ocratoxina A e B, e os limites de quantificação 0,25 e 0,60 $\mu\text{g.L}^{-1}$, respectivamente. Num total de 42 amostras de cervejas comercializadas em Bauru e região 2,4 % das amostras de cervejas nacionais, e 11,1 % das cervejas importadas estavam contaminadas com ocratoxina A entre 0,32 e 0,80 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Quanto a ocratoxina B, foi encontrada apenas em 2,4% das amostras de cervejas nacionais, no nível de 0,78 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

Palavras-chave. cerveja, cromatografia, ocratoxinas, injeção direta, IS-aniônica.

ABSTRACT

Ochratoxin A is nephrotoxic and has been found in corn, soy, wheat, barley, rice, sorghum and peanut samples. Brazilians consume in average 49 liters of beer yearly, barley being the main raw material, besides maize and rice in a second level. The determination of the ochratoxins A and B in alcoholic beverages require clean-up or immunoaffinity columns. A new analytical method by direct injection of the sample of beer, using liquid chromatography of high efficiency, with a IS-anionic chromatographic column (*Internal Surface Reverse Phase*) was developed. The considered method presented a recovery that varied from 78.5 to 92.1% for the levels of ochratoxin A in the range of 0.25 to 4.00 $\mu\text{g.L}^{-1}$; and 76.5 to 93.1% for the ochratoxin B at the level of 1.25 to 20.00 $\mu\text{g.L}^{-1}$. The limits of detection were 0.15 and 0.35 $\mu\text{g.L}^{-1}$ and the limits of quantification 0.25 and 0.60 $\mu\text{g.L}^{-1}$ for ochratoxins A and B, respectively. In a total of 42 samples of beers commercialized in Bauru and region, 2.4% of the samples of national beers and 11.1% of the imported ones were contaminated with ochratoxin A above the of quantification, being the level detected between 0.32 and 0.80 $\mu\text{g.L}^{-1}$. ochratoxin B was detected in only 2.4% of national beer samples at the level of 0.78 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

Key words. beer, chromatography, direct injection, ochratoxins, IS-anionic.

INTRODUÇÃO

Dentre as micotoxinas o grupo das ocratoxinas divide-se em ocratoxina A, ocratoxina B e ocratoxina C. Quimicamente, são compostos que apresentam uma fenilalanina ligada a uma isocumarina por ligação amida. A ocratoxina A apresenta fluorescência verde e uma molécula de cloro na fórmula, responsável pelo caráter tóxico. A ocratoxina B, possui fluorescência azulada, não revela toxicidade pela ausência de molécula de cloro. A ocratoxina C com fluorescência verde, constitui um etil éter da ocratoxina A, sendo muito menos tóxica que a outra¹.

A ocratoxina A (OTA), produzida por *Aspergillus ochraceus* e *Penicillium verrucosum*, é classificada pela Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer (IARC) como sendo uma substância do Grupo 2B, ou seja, um agente possivelmente cancerígeno para o homem². O Comitê Científico para Aditivos e Contaminantes (JECFA) da Organização Mundial de Saúde/Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO/WHO) propôs um limite máximo tolerável para ingestão semanal de 0,1 µg.kg⁻¹ de peso corpóreo³.

São vários os alimentos que têm apresentado OTA, dentre eles alguns fazem parte do consumo alimentar diário do brasileiro, como arroz, feijão, café, milho, cevada, trigo e vinho^{4,5,6,7,8}.

A cerveja é a bebida não destilada obtida pela fermentação alcoólica de mosto de cereal maltado, geralmente malte de cevada. É facultativa a adição de outro material amiláceo (milho, arroz) e de lúpulo; em geral o teor alcoólico é baixo, entre 0,5% para o tipo sem álcool e 7% ou mais para cerveja de alto teor alcoólico⁹.

No mercado de cerveja, o Brasil ocupa a quinta posição. Em 2005 apresentou aumento na produção em relação ao ano anterior, totalizando 9,02 bilhões de litros, sendo o consumo per capita do brasileiro de 49,0 litros/ano, segundo estimativa do Sindicato Nacional da Indústria da Cerveja, SINDICERV¹⁰.

O processo de fermentação não é capaz de eliminar totalmente a OTA presente no malte e nos demais cereais, o que torna bastante viável a ocorrência deste composto na cerveja^{11,12,13}.

A separação e quantificação das ocratoxinas em diferentes tipos de amostras, tem apresentado algumas dificuldades no que se refere à preparação da amostra, fase que visa remover os interferentes, aumentando a seletividade do método; concentrar o analito, tornando o método mais sensível; converter o analito, se necessário, em um analito mais adequado para detecção ou separação. Além disso, o procedimento de preparo da amostra deve ser rápido e prático, com perdas mínimas de analito e baixo custo de análise.

Há várias técnicas ditas *off-line* para o pré-tratamento de amostras, sendo as mais clássicas a extração em fase sólida (*solid-phase extraction*) e a extração líquido-líquido (*liquid-liquid extraction*).

O uso de procedimentos de extração *on-line* é particularmente atrativo em situações onde um grande número

de amostras deva ser analisado rotineiramente e/ou materiais perigosos (tóxicos) ou altamente infectantes devam ser processados. Dentre as técnicas de injeção direta e repetitiva de amostras não tratadas no sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), a que utiliza fases RAM (*Restricted-Access Media*) tem um enorme destaque, sendo extremamente vantajosa em pesquisas e análises clínicas, toxicológicas e farmacêuticas e outras, devido a sua capacidade de reduzir o tempo e o manuseio laborioso empregados no procedimento analítico.

Visando acelerar a velocidade analítica, desenvolvemos um novo método por injeção direta da amostra de cerveja, empregando cromatografia líquida de alta eficiência com uma pré-coluna cromatográfica IS-aniônica (Internal Surface anionic Phase).

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

Preparo das amostras para a validação da metodologia

Uma amostra de 50 mL de cerveja, considerada amostra controle, foi desaerada em banho ultrassônico por 30 minutos e depois foi fortificada com a quantidade calculada para cada nível desejado, a seguir, foi diluída na proporção de 1:5 (cerveja:água destilada) e realizada a determinação por CLAE utilizando a técnica de padrão externo com auxílio de uma curva padrão.

Amostras de cervejas

As amostras de cerveja foram adquiridas no comércio de Bauru, Estado de São Paulo e região, no período de maio a agosto de 2005, foram analisadas 42 amostras de cervejas nacionais e 09 amostras de cervejas importadas sendo: 03 da Alemanha, 02 do México, 01 Argentina, 01 Canadá, 01 da Holanda e 01 do Japão. Das cervejas líderes de mercado foram analisadas 3 amostras diferentes de cada marca, das demais apenas uma amostra foi analisada.

Entre as cervejas analisadas estão relacionadas cervejas do tipo Pilsen, cervejas escuras e sem álcool.

Metodologia

A coluna aniônica (IS-aniônica) empregada como pré-coluna foi obtida com a fase estacionária cloreto de N, N-propiltriethylaminônio silano. A imobilização da proteína nesta coluna seguiu o procedimento descrito por Menezes e Félix¹⁴. A coluna analítica empregada posteriormente a IS-aniônica foi uma coluna cromatográfica C₁₈, 5 µm, 110 Å, 250mm x 2,0mm DI.

Os experimentos cromatográficos foram realizados sob condições isocráticas em um sistema de CLAE - Varian modelo Pro Star Polaris, com detector de fluorescência emissão em 325nm e excitação 460nm. As soluções padrão foram injetadas em uma válvula Rheodyne 7125. Foi utilizada uma alça de

injeção com volume de 1000 μ L. Uma segunda válvula Rheodyne 7000 foi empregada para efetuar a mudança de fluxo para a segunda fase móvel, empregando a técnica de *column switching* (Figura 1). As fases móveis empregadas foram: Bomba A - água destilada, vazão 1,0mL.min⁻¹, por 10 minutos,

para a extração dos analitos e Bomba B - solução aquosa de ácido clorídrico 1,0% (v/v): acetonitrila (60:40) (v/v), vazão 0,4mL.min⁻¹, por mais 35 minutos, para a separação analítica. Os tempos de retenção foram 31 e 40 minutos para OTB e OTA respectivamente.

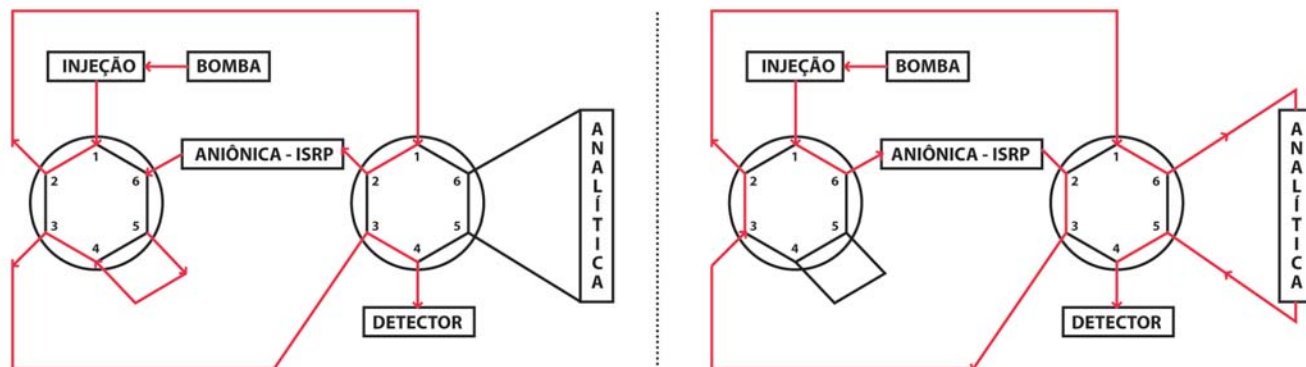


Figura 1. Representação do *column switching system* para transferências das ocratoxinas A e B para a coluna analítica.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Validação da Metodologia Analítica

Os resultados obtidos indicaram que o método proposto é eficiente para a detecção e quantificação de OTA e OTB em cervejas, pois apresentou uma recuperação que variou de 78,5 a 92,1% para os níveis de OTA na faixa de 0,25 a 4,00 μ g.L⁻¹ e de 76,5 a 93,1% para a OTB na faixa de 1,25 a 20,00 μ g.L⁻¹ com precisão estimada pelo coeficiente de variação (CV) entre 5,36 a 11,48% para OTA e 4,09 a 10,72% para a OTB nas faixas acima estabelecidas. A recuperação foi efetuada em quadruplicata para cada nível proposto (Tabela 1).

Os limites de detecção (LD) foram determinados como a menor massa das substâncias detectadas, nas condições do método proposto, com sinal no mínimo de três vezes o valor do ruído do cromatograma, sendo 0,15 e 0,35 μ g.L⁻¹ para OTA e OTB. Os limites de quantificação (LQ) foram estabelecidos como a menor concentração que pode ser determinada com precisão aceitável sob as condições do ensaio, sendo 0,25 e 0,60 μ g.L⁻¹ para OTA e OTB, respectivamente.

As curvas padrão construídas nas faixas de 0,05 a 0,80 μ g.L⁻¹ e entre 0,25 a 4,0 μ g.L⁻¹ para OTA e OTB apresentaram coeficiente de correlação de 0,9996 e 0,9987 respectivamente. Assim foi possível efetuar a extração e pré-concentração *on line* das ocratoxinas A e B presentes em amostras de cervejas.

Análise de Amostras Reais

As Tabelas 2 e 3 mostram os valores encontrados nos diferentes tipos de cerveja, cada amostra foi analisada em triplicata. Nas cervejas nacionais apenas uma (2,4%) apresentou OTA quantificável igual a 0,32 μ g.L⁻¹ e em outras duas amostras

(4,8%) valores entre LD e LQ. A OTA foi verificada em quantidade bastante elevada em uma amostra de cerveja do Canadá, que apresentou concentração de 0,80 μ g.L⁻¹. Os valores encontrados para OTA nas cervejas analisadas, tanto nacionais como importadas estão em acordo aos valores observados em outros artigos.

Quanto a OTB 11 amostras nacionais (26,2%) apresentaram valores entre LD e LQ e uma (2,4%) apresentou valor quantificável de 0,78 μ g.L⁻¹.

Scott e Kanhere¹⁵ analisaram 41 amostras de cervejas canadenses e 11 amostras importadas (República Tcheca, Dinamarca, Alemanha, Irlanda, Itália, Japão, Quênia, Holanda, Polônia, Reino Unido e Estados Unidos) e verificaram a presença de traços de OTA (< LD = 0,2ng.mL⁻¹) em 63,4% das amostras.

Legarda e Burdaspal¹⁶ analisaram 38 amostras de cervejas espanholas sendo 30 com álcool e 8 sem álcool, encontraram OTA em 96,75 e 100% das amostras, sendo a média de 0,026ng.mL⁻¹ e 0,018ng.mL⁻¹ respectivamente. Também analisaram 34 amostras de cervejas importadas, sendo que encontraram OTA em todas as amostras, com valores médios de 0,026ng.mL⁻¹ para cerveja com álcool e 0,025ng.mL⁻¹ para as cervejas sem álcool.

Nakajima et al.¹⁷ analisaram 94 amostras de cervejas importadas e 22 de origem japonesa, sendo que das importadas 91,5% apresentaram OTA com valor médio de 10,1 pg.mL⁻¹ e 95,5% das japonesas apresentaram valor médio 12,5pg.mL⁻¹.

Degelmann et al.¹⁸ analisaram 35 amostras de cervejas alemãs e encontraram traços de OTA em 60% destas, outras 26% apresentaram OTA entre 0,1 e 0,26 μ g.L⁻¹.

Filali et al.¹⁹ analisaram 5 amostras de cerveja da região de Marrocos, sendo que nenhuma delas apresentou OTA acima do limite de quantificação do método 0,01 μ g.L⁻¹.

Tabela 1. Recuperação de OTA e OTB em amostras de Cerveja Pilsen.

OTA na amostra controle ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	% de Recuperação (média)	Desvio Padrão	C.V. (%)	OTB na amostra controle ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	% de Recuperação (média)	Desvio Padrão	C.V. (%)
0,25	78,5	9,00	11,48	1,25	76,58	3,12	4,08
0,50	80,8	4,65	5,75	2,50	4,68	8,73	10,30
1,00	92,1	9,01	9,78	5,00	7,28	5,87	6,73
2,00	86,8	4,66	5,36	10,00	3,59	3,38	4,04
4,00	91,3	6,02	6,59	20,00	3,1	9,99	10,72

C.V.= coeficiente de variação.

Tabela 2. Determinação de OTA e OTB em amostras de cervejas nacionais.

Tipos de cervejas	Número de amostras	OTA ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Número de amostras	OTB ($\mu\text{g.L}^{-1}$)
Pilsen	30	<LD	20	<LD
	02	<LQ e >LD	11	<LQ e >LD
	01	0,32	01	0,78
Escura	05	<LD	05	<LD
Sem álcool	03	<LD	04	<LD
	01	<LQ e >LD	01	<LQ e >LD
Total	42	01	42	01

Tabela 3. Determinação de OTA e OTB em amostras de cervejas importadas.

Tipos de cervejas	Número de amostras	OTA ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Número de amostras	OTB ($\mu\text{g.L}^{-1}$)
Pilsen	05	<LD	07	<LD
	01	<LQ e >LD		
	01	0,80		
Escura	01	<LD	01	<LD
Sem álcool	01	<LD	01	<LD
Total			09	-

Soleas et al.²⁰ analisaram 107 amostras de cerveja de cinco regiões distintas: Canadá, Reino Unido, Europa, EUA e Oriente. Em apenas duas amostras foram encontradas OTA entre 0,05 e 0,1 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

Tangni et al.²¹ analisaram 62 amostras de cervejas belgas sendo que 82% das amostras apresentaram OTA entre 10 e 200 ng.L^{-1} , com valor médio de 33 ng.L^{-1} , variando de 10 a 185 ng.L^{-1} ; 15% apresentaram traços. Também analisaram 20 amostras importadas e 85% das amostras apresentaram OTA

entre 10 e 200 ng.L^{-1} , sendo o valor médio 32 ng.L^{-1} , variando de 12 a 87 ng.L^{-1} ; 15% apresentaram traços.

Odhav e Naicker²² analisaram 6 marcas comerciais de cervejas da África do Sul e não encontraram OTA. Dez amostras do total de 29 cervejas caseiras apresentaram OTA (34,5%), com níveis de 3 a 2340 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

Pesquisadores brasileiros avaliaram a ocorrência de OTA em cervejas brasileiras e importadas. Nas amostras brasileiras encontraram apenas traços (<LQ= 0,008 $\mu\text{g.L}^{-1}$) e

nas amostras importadas verificaram presença entre 0,25 e 0,83 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de OTA²³. Outros pesquisadores analisaram 123 amostras de cervejas na região de Campinas de 24 marcas diferentes, sendo que apenas cinco, todas do tipo *Pilsen*, apresentaram teores que variaram de 1 a 18ng.mL⁻¹ de ocratoxina A²⁴.

Em apenas um artigo observamos a pesquisa de OTB na Alemanha, onde 161 amostras de cerveja foram analisadas e não foi verificada sua presença, mas os autores não relataram em seu artigo qual o limite de detecção do método empregado²⁵.

CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho indicaram que o método desenvolvido empregando uma coluna cromatográfica IS-aniônica instalada em série com uma coluna analítica C₁₈, possibilita efetuar a injeção direta das amostras de cervejas, com a extração e separação *on line*, sem o tratamento prévio das amostras de cerveja.

O método proposto é eficiente para a detecção e quantificação de ocratoxinas A e B em cervejas, pois apresentou uma recuperação que variou de 78,5 a 92,1% para os níveis de OTA na faixa de 0,25 a 4,00 $\mu\text{g.L}^{-1}$; e de 76,5 a 93,1% para a OTB na faixa de 1,25 a 20,00 $\mu\text{g.L}^{-1}$ com precisão estimada pelo coeficiente de variação (CV) entre 5,36 a 11,48% para OTA e 4,09 a 10,72% para a OTB nas faixas acima estabelecidas. Limites de detecção na amostra de 0,15 e 0,35 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para OTA e OTB, respectivamente.

O levantamento da ocorrência de OTA e OTB em cervejas comercializadas em Bauru e região mostraram que 2,4 % das amostras de cervejas nacionais e 11,1 % das cervejas importadas estavam contaminadas com OTA acima do LQ, 0,32 e 0,80 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Quanto à OTB, foi encontrada em 2,4 % das amostras de cervejas nacionais no nível de 0,78 $\mu\text{g.L}^{-1}$. A OTB não foi detectada nas amostras importadas de cerveja.

AGRADECIMENTO

À FAPESP pela aprovação do Projeto, a qual possibilitou a compra dos equipamentos utilizados neste trabalho.

REFERÊNCIAS

1. Scussel VM. Micotoxinas em alimentos. Florianópolis: Insular; 1998. 144p.
2. IARC. Volume 56 - Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins. 21 ago 1997. Disponível em: <<http://monographs.iarc.fr/ENG/>

- Monographs/vol56/volume56.pdf>. Acesso em 15/05/2007.
3. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Summary of Evaluation Performed. 25 abr 2002. Disponível em: <<http://jecfa.ilsa.org/evaluation.cfm?chemical=OCHRATOXIN%20A&keyword=%20>>. Acesso em 21/05/2007.
4. Soares LMV, Amaya DBR. Survey of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone, and sterigmatocystin in some Brazilian foods by using multi-toxin thin-layer chromatographic method. *JAOAC Int* 1989; 72(1):22-6.
5. Van Egmond HP, Speijers GJA. Survey of data on the incidence and levels of ochratoxin A in food and animal feed worldwide. *J Nat Tox* 1994; 3(2):125-44.
6. Studer-Rohr I, Dietrich DR, Schlatter J, Schlatter C. The occurrence of ochratoxin A in coffee. *Food Chem Toxicol* 1995;33(5):341-55.
7. Furlong EB, Soares LAS, Vieira AP, Dadalt G. Aflatoxinas, ocratoxina a e zearalenona em alimentos da região sul do Rio Grande do Sul. *Rev Inst Adolfo Lutz*, 1999;58(2): 105-11.
8. Visconti A, Pascale M, Centoze G. Determination of ochratoxin A in wine by means of immunoaffinity column clean-up and high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* 1999;864(1):89-101.
9. Venturini Filho WG, Cereda MP. Cerveja. In: Aquarone, E, Borzani, W, Schmidell, W, Lima, UA. Alimentos e bebidas produzidos por fermentação. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. p. 91-144.
10. Sindcerv: Sindicato Nacional da Indústria da Cerveja. Mercado. Jan/jun 2006. Disponível em: <<http://www.sindicerv.com.br/pdf/Consumo%20Agregado%201985%20-%202006.pdf>>. Acesso em: 21/06/2007.
11. Chu FS, Chang CC, Ashoor SH, Prentice N. Stability of aflatoxin B₁ and ochratoxina A in brewing. *Appl Microbiol* 1975;29(3):313-16.
12. Alldrick AJ. The effects of processing on the occurrence of ochratoxin A in cereals. *Food Addit Contam* 1996;13 Suppl 1:S27-8.
13. Scott PM. Mycotoxins transmitted into beer from contaminated grains during brewing. *JAOAC Int* 1996; 79(4):875-82.
14. Menezes ML, Félix G. Analysis of organochlorine pesticides in plain milk using direct injection on a ISRP column, with column switching. *J Liq Chromatogr* 1996; 19:3221-8.
15. Scott PM, Kanhere SR. Determination of ochratoxin A in beer. *Food Addit Contam* 1995; 12(4):591-8.
16. Legarda TM, Burdaspal PA. Ocratoxina A em cervezas elaboradas em espana y em otros países europeos. *Alimentaria* 1998;115-22.

17. Nakajima M, Tsubouchi H, Miyabe M. A survey of ochratoxin A and aflatoxins in domestic and imported beers in Japan by immunoaffinity and liquid chromatography. *J Assoc Off Anal Chem* 1999; 82(4):897-902.
18. Degelmann P, Becker M, Herderich M, Humpf HH. Determination of ochratoxin A in beer by high-performance liquid chromatography. *Chromatographia* 1999; 49(9/10):543-6.
19. Filali A, Ouammi, L, Betheder AM, Baudrimont I, Soulaymani R, Benayada A, et al. Ochratoxin A in beverages from Morocco: a preliminary survey. *Food Addit Contam* 2001; 18(6):565-98.
20. Soleas GJ, Yan J, Goldberg DM. Assay of ochratoxin A in wine and beer by high-pressure liquid chromatography photodiode array and gas chromatography mass selective detection. *J Agric Food Chem* 2001; 49:2733-40.
21. Tangni EK, Ponchaut S, Maudoux M, Rozemberg R, Larondelle Y. Ochratoxin A in domestic and imported beers in Belgium: occurrence and exposure assessment. *Food Addit Contam* 2002; 19(12):1169-79.
22. Odhav B, Naicker V. Mycotoxins in South African traditionally brewed beers. *Food Addit Contam* 2002; 19(1):55-61.
23. Prado G, Oliveira MS, Carvalho, EP, Lima LCO, Veloso T, Souza LAF, et al. Ochratoxin A determination in beer by immunoaffinity column clean-up and high-performance liquid chromatography. *Ciênc Tecnol Aliment* 2003; 23:58-61.
24. Vieira AP, Valente Soares LM, editores. Ocorrência de ocratoxina A em cerveja nacional. In: XIX Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos Estratégia para o Desenvolvimento: 2004, Recife: CBCTA, 2004, CD-ROM.
25. Meyer RA, Neugebauer S. Bestimmung von ochratoxin A in bier mit automatischer probenreinigung an immunaffinitätsäulen. *Nahrung* 2000; 44(1):58-9.

Estudo da comunidade fitoplanctônica no reservatório do Carpina-PE, com ênfase em Cyanobacteria

Study of the phytoplankton community with emphasis on Cyanobacteria, in Carpina-PE reservoir

RIALA6/1134

Nísia K.C.V. ARAGÃO^{1*}, Cícero T.S. GOMES¹, Giulliani A.S.T. LIRA¹, Carolina M. ANDRADE^{1,2}

*Endereço para correspondência: ¹Laboratório Central de Saúde Pública (LACEN-PE), Rua Fernandes Vieira, s/n, Boa Vista, CEP 50050-210, Recife, PE/Brasil, e-mail: nisiakarine@yahoo.com.br

²Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, CEP 50670-901, Recife, PE/Brasil.

Recebido: 02/08/2007 – Aceito para publicação: 29/10/2007

RESUMO

Florações de Cyanobacteria são frequentemente encontradas em reservatórios utilizados para abastecimento público, em decorrência dos processos de eutrofização. No presente trabalho, foram realizadas oito coletas de água de julho a novembro de 2006, com o objetivo de estudar a dinâmica da comunidade fitoplanctônica com ênfase em Cyanobacteria, no reservatório do Carpina-PE. Para o levantamento florístico, foram coletadas amostras vivas e preservadas em formalina a 2%, utilizando-se rede de plâncton com abertura de malha de 25µm. Para as análises quantitativas, as amostras foram coletadas com frascos de boca larga, preservadas com formalina (2%), e quantificadas em câmaras de Utermöhl de 5mL. As análises fitoplanctônicas foram realizadas em microscópio invertido. Foram identificados 21 táxons distribuídos entre as seguintes divisões: Cyanobacteria (10spp.), Chlorophyta (6spp.), Chrysophyta (4spp.) e Euglenophyta (1spp.). Destes, 71,43% apresentaram-se como muito freqüentes, destacando-se as Cyanobacteria, com as maiores abundâncias. Quanto à densidade das Cyanobacteria, todas as amostras apresentaram valores acima de 100.000 cel.mL⁻¹. De acordo com a OMS, o ambiente encontra-se em nível de alerta 2, indicando um altíssimo risco à saúde pública.

Palavras-chave. Cyanobacteria, reservatório, consumo humano, eutrofização.

ABSTRACT

The blooms of Cyanobacteria are frequently found in reservoir used to supply public, because of eutrophication process. In this study, there were eight samples of water from July to November 2006, with the goal of studying the dynamic of the phytoplankton community with emphasis on Cyanobacteria in Carpina-PE reservoir. To floristic survey, they were collected living samples and samples preserved with in 2% formalin, using plankton net with mesh opening of 25µm. While, for the quantitative analysis, the samples were collected with bottles of wide mouth, preserved with formalin (2%), and examined in Utermöhl chambers of 5mL. The Analyses phytoplanktonic were performed on inverted microscopy. Were identified 21 taxa distributed from the following divisions: Cyanobacteria (10spp.), Chlorophyta (6spp.), Chrysophyta (4spp.) e Euglenophyta (1spp.). Amongst these 71.43% showed with a large frequency, where Cyanobacteria appeared the most conspicuous along study. As for the density, every samples presented values over 100.000 cel.mL⁻¹. According with OMS, the environment find out in alert level 2, indicating a high risk to human health.

Key words. Cyanobacteria, reservoir, human consumption, eutrophication.

INTRODUÇÃO

A ecologia e a qualidade das águas nos reservatórios estão, fundamentalmente, relacionadas com os sistemas integrados que atuam na bacia hidrográfica, incluindo as múltiplas atividades humanas e seus impactos¹. Acelerados processos de eutrofização, como decorrência dessas atividades, vêm causando enriquecimento artificial, ou seja, aumento das concentrações de nutrientes na água². Esse fenômeno é causado por processos de erosão e decomposição que promovem aumento na produtividade biológica, permitindo periódicas proliferações de algas³ que caracterizam as conhecidas florações algais⁴.

Dentre as algas que apresentam crescimento acelerado ocasionando florações em corpos d'água superficiais (rios, lagos e reservatórios artificiais) e que constituem maior importância para a saúde pública, destacam-se as cianobactérias⁵. Estes organismos possuem estratégias de crescimento sob condições ambientais favoráveis, tais como, temperaturas acima de 20°C, alta incidência de luz e de concentrações de nitrogênio e fósforo, que geralmente promovem demasiado crescimento populacional, causando desequilíbrio ecológico e alterando aspectos da água como cor, gosto e odor⁶. Além disso, tais algas são consideradas potencialmente tóxicas, o que as torna uma ameaça à saúde de homens e animais, sendo inclusive, já relatados inúmeros casos de óbito em diversas partes do mundo.

Dentro deste contexto, há fortes indícios de que a intoxicação de 200 pessoas, das quais 88 morreram depois do consumo de água proveniente do reservatório de Itaparica-BA, em 1988, tenha associação com cianotoxinas⁷. No entanto, o caso mais grave envolvendo populações humanas, ocorreu em Caruaru-PE, em 1996, quando 76 pacientes de uma clínica de hemodiálise vieram a óbito^{8,9} após o contato com microcistina L-R durante o tratamento dialítico.

Em decorrência deste último fato, o Brasil tornou-se o primeiro país a incorporar a questão das cianobactérias e cianotoxinas à sua legislação, através da portaria nº 1469, revogada pela nº 518/GM em 25 de março de 2004, que dispõe sobre a qualidade de água para consumo humano¹⁰. Tal portaria exige o monitoramento das cianobactérias nas tomadas d'água das captações, análise de suas toxinas e determina que a autoridade de saúde pública, no exercício das atividades de vigilância da qualidade da água, deve implementar um plano próprio de amostragem, consoante diretrizes específicas elaboradas no âmbito do Sistema Único de Saúde – SUS.

Sendo assim, o presente trabalho tem como objetivo, estudar a dinâmica das populações fitoplanctônicas com ênfase em Cyanobacteria no reservatório do Carpina-PE, o qual fundamenta-se no escopo da legislação vigente e visa contribuir, com informações sobre o conhecimento desses organismos, assim como, com setores relacionados à saúde pública, no sentido de alertar sobre os prováveis riscos ao bem estar de homens e animais.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de Estudo

O reservatório do Carpina (latitude 7°51' e 7°57' S e longitude 35°19' e 35°27' W), localiza-se a 65km do Recife-PE no município de Carpina. Faz parte da Bacia hidrográfica do Rio Capibaribe (Figura 1), considerada a maior do estado, com extensão de 7.557km² a qual atinge 42 municípios do agreste e da zona da mata do estado de Pernambuco. O reservatório apresenta capacidade de acumulação 270.000.000m³ de água, e abrange uma área 6.600Km². Durante o período estudado, o ambiente apresentou comportamento pluviométrico variando entre 213mm no mês de agosto a 48mm no mês de novembro¹¹.

Procedimento de Coleta

As coletas foram realizadas de julho a novembro de 2006 contemplando 08 amostragens em um único ponto do reservatório, com a maioria delas, concentradas durante o período seco (julho, agosto e setembro). Foram coletadas amostras para análise qualitativa e quantitativa da comunidade fitoplanctônica.

Para análise qualitativa foram coletadas duas amostras, uma fixada com formalina a 2% (250mL) e outra sem substância fixadora (1000mL), preservada à baixa temperatura, ambas adquiridas com rede de plâncton com abertura de malha de 25µm.

As amostras destinadas à análise quantitativa (1000mL) foram coletadas na superfície do reservatório, com o auxílio de um recipiente de boca larga e fixadas com formalina a 2%.

Análise Qualitativa

As análises qualitativas foram realizadas em microscópio invertido Zeiss Axiovert 25-C, com contraste de fase e de Varel, em objetiva de 100X plan-acromática à imersão e oculares de 10X, dotadas de retículos micrométricos e de Wippler. Foi utilizado nanquim para evidenciar bainha mucilaginosa.

Os sistemas de classificação adotados foram: Round^{12,13} para Chlorophyta, Chrysophyta e Euglenophyta, e, Anagnostidis & Komarék^{14,15} e Komarék & Anagnostidis^{16,17} para as Cyanobacteria.

Além dos estudos citados acima, no auxílio da identificação das Cyanobacteria foram utilizados os trabalhos de Anagnostidis & Komarék^{18,19,20} e chave dicotômica²¹ para determinação dos gêneros.

Análise Quantitativa

Para análise quantitativa as amostras foram homogeneizadas e acondicionadas em câmaras de sedimentação com volume de 5mL por 24 horas. Posteriormente, foram conduzidas à análise em microscópio invertido Zeiss Axiovert 25-C, em objetiva de 40X e quantificadas seguindo o método de Utermöhl²².

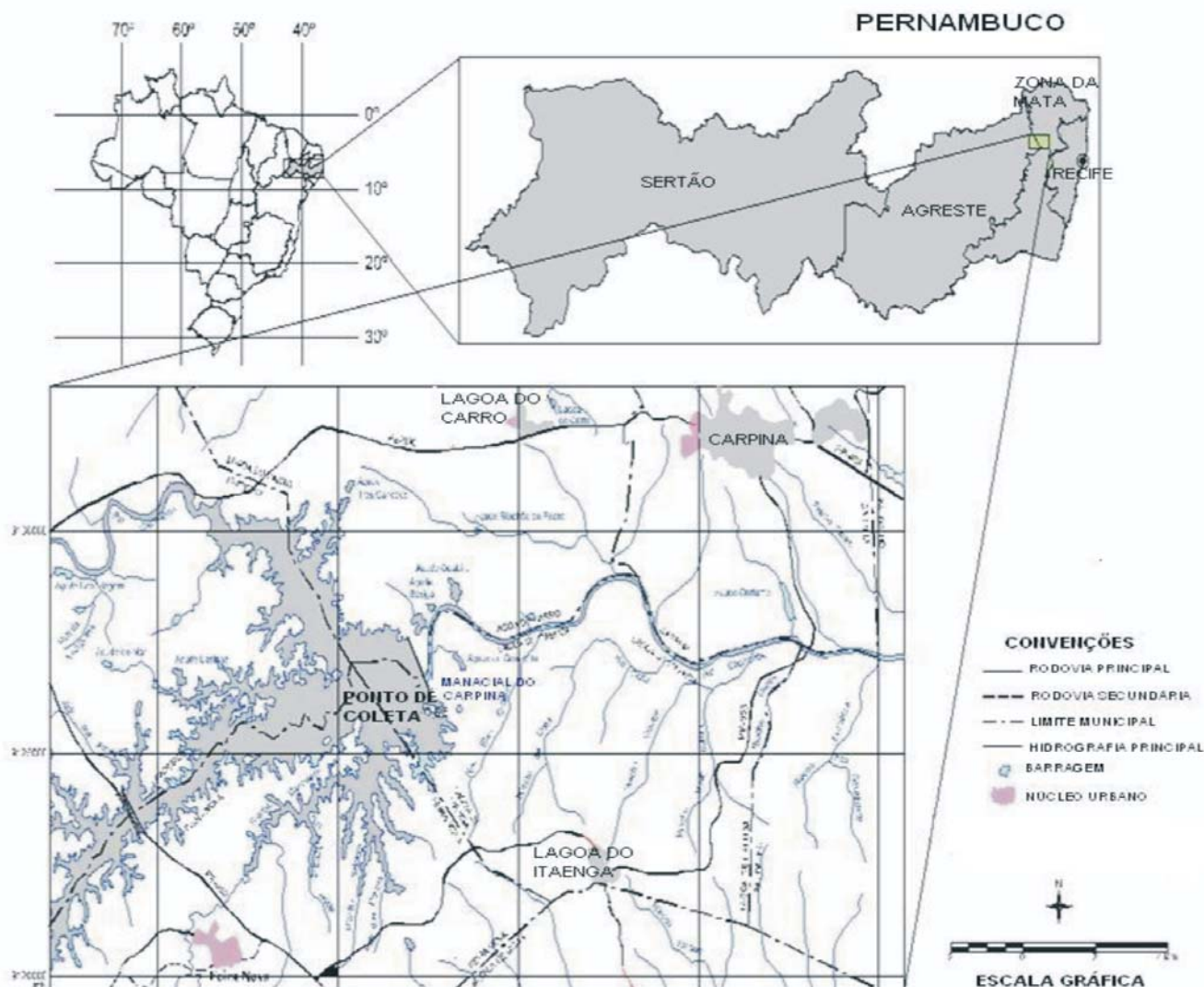


Figura 1. Localização Geográfica do reservatório do Carpina-PE.

O estudo quantitativo das Cyanobacteria foi baseado no guia da OMS²³ dando cumprimento ao que determina o Artigo 17, § 1º, da portaria nº 518/GM de 25 de março de 2004, do Ministério da Saúde. O cálculo da densidade foi expresso em cel.mL⁻¹, e efetuado por meio da fórmula descrita na American Public Health Association (APHA)²⁴.

Tratamento dos Dados

Foi determinada a frequência de ocorrência dos táxons, segundo Mateucci e Colma²⁵, que definem as seguintes faixas de classificação: muito freqüente (>70%),

freqüente ($\leq 70\% >40\%$), pouco freqüente ($\leq 40\% >10\%$) e rara ($\leq 10\%$). A abundância e dominância foram determinadas de acordo com Lobo e Leighton²⁶, sendo abundantes as espécies com densidades superiores à média da densidade da comunidade e dominantes, aquelas cujas densidades ultrapassam 50% do total da densidade total da comunidade.

O potencial de risco à saúde dos seres vivos, relacionados aos valores de densidade das Cyanobacteria no reservatório do Carpina, foi avaliado assumindo-se os níveis de alerta propostos no guia da OMS.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir das análises qualitativas das amostras, foram identificados 21 táxons distribuídos em 5 classes e 9 ordens, pertencentes às divisões: Cyanobacteria, Chlorophyta, Chrysochyta e Euglenophyta, de acordo com a sinopse abaixo:

CYANOBACTERIA

Chroococcales

Microcystis sp.

Nostocales

Anabaena circinalis Rabenhorst 1863

Aphanizomenon cf. gracile Morren ex Bornet & Flahault 1888

Cylindrospermopsis raciborskii (Woloszynska) Seenaya & Subba Raju

Raphidiopsis curvata F.E. Fritsch & M.F. Rich 1929

R. mediterranea Skuja 1937

Oscillatoriales

Geitlerinema amphibium (C. Agardh) Anagnostidis 1989

Oscillatoria princeps Vaucher ex Gomont 1892

Planktothrix aghardii Anagnostidis & Komárek 1988

Pseudanabaena sp.

CHLOROPHYTA

Chlorophyceae

Chlorococcales

Actinastrum hantzschii Lagerheim 1882

Chlorella vulgaris Beijerinck 1890

Golenkinia radiata Chodat 1953

Kirchneriella lunaris (Kirchner) K. Möbius 1894

Monoraphidium arcuatum (Korsikov) Hindák 1970

Monoraphidium komarkovae Nygaard 1979

CHRYSOPHYTA

Bacillariophyceae

Bacillariales

Nitzschia sp.

Naviculales

Navicula sp.

Coscinodiscales

Aulacoseira granulata (Ehrenberg) Simonsen 1979

EUGLENOPHYTA

Fragilariophyceae

Fragilariales

Asterionella sp.

Euglenophyceae

Euglenales

Trachelomonas volvocina Ehrenberg 1833

Com relação à riqueza de táxons, as Cyanobacteria apresentaram maior diversidade, sendo responsáveis por 48% dos táxons identificados, pertencentes às ordens Chroococcales,

Nostocales e Oscillatoriales. Dentre estas, a ordem Nostocales destacou-se com maior número de táxons (5 spp.). As Chlorophyceae contribuíram com 29% dos táxons, seguida pelas Chrysochytae com 19% e Euglenophyceae com 5%.

Os resultados citados acima corroboram com os dados apresentados no estudo, da distribuição percentual do fitoplâncton de sete bacias hidrográficas do estado de Pernambuco²⁷, que também apontam as Cyanobacteria como o grupo mais representativo. No entanto, diferem dos dados registrados por Gomes²⁸ no mesmo reservatório, onde nesta ocasião as Chlorophyceae prevaleceram em riqueza de espécies. Tais diferenças estão associadas ao fato, de que no trabalho de Gomes, o período chuvoso foi contemplado em sua totalidade, momento no qual o enriquecimento nutricional no extrato superior da coluna d'água é maior, facilitando as estratégias de assimilação destes nutrientes pelas Chlorophyceae, que passaram a dominar no ambiente.

A densidade fitoplânctônica apresentou variação de 363.491 cel.mL⁻¹, em outubro de 2006, a 1.886.684 cel.mL⁻¹ em novembro de 2006. Foram observadas variações na densidade durante todo o período estudado, com destaque entre os meses de julho a outubro, indicando bruscas alterações na quantificação da comunidade (Gráfico 1). Tal fato pode estar relacionado com os efeitos de pulso decorrentes da abertura das comportas, ocorridas periodicamente, por atividade antrópica.

Foi observado um crescente aumento na densidade fitoplânctônica no período de outubro a novembro, com maior contribuição das Cyanobacteria, que representaram densidade média de 99,61% do total da comunidade, seguida pelas Chlorophyceae (0,36%), Chrysochytae (0,02%) e Euglenophyceae (0,01%) (Gráfico 2). Dentre as Cyanobacteria, três táxons se destacaram com as mais altas densidades, *Raphidiopsis curvata* (1.342.448 cel.mL⁻¹), *Geitlerinema amphibium* (369.100 cel.mL⁻¹) e *Planktothrix aghardii* (221.832 cel.mL⁻¹) (Gráfico 3).

Entre as Chlorophyceae, as maiores densidades foram observadas para as espécies *Monoraphidium arcuatum* (10.363 cel.mL⁻¹), *Golenkinia radiata* (6.690 cel.mL⁻¹) e *Monoraphidium komarkovae* (4.581 cel.mL⁻¹) (Gráfico 4). Na primeira amostragem de agosto, não foi registrada a ocorrência de Chrysochytae, entretanto, em julho, este grupo apresentou sua maior densidade com 400 cel.mL⁻¹. Euglenophyceae foi representada por um único táxon, *Trachelomonas volvocina*, que apresentou sua maior densidade na primeira amostragem de agosto com 255 cel.mL⁻¹.

Dos 21 táxons identificados, 71,43% foram considerados muito freqüentes, enquanto, 9,52% foram freqüentes e 19,05% pouco freqüentes. Não foram registrados táxons esporádicos. Todas as Chlorophyceae identificadas foram consideradas muito freqüentes. Dentre as Chrysochytae, apenas um táxon foi muito freqüente. As Euglenophyceae foram muito freqüentes (Tabela 1).

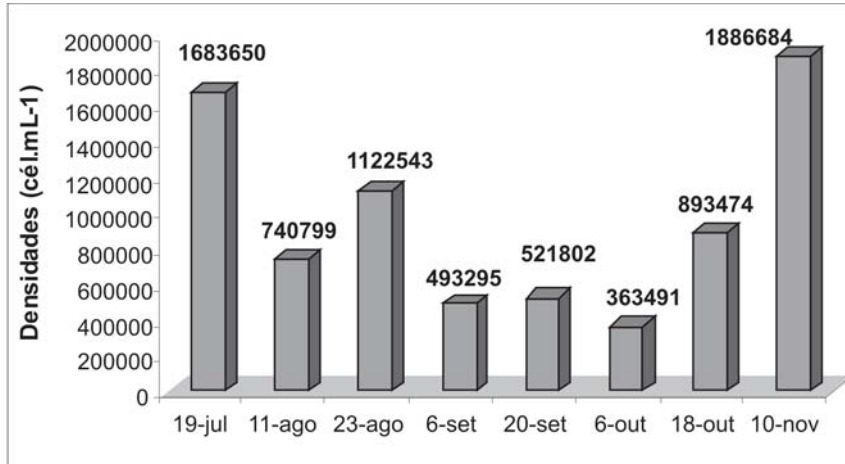


Gráfico 1. Densidades do fitoplâncton no reservatório do Carpina-PE, entre os meses de julho e novembro de 2006.

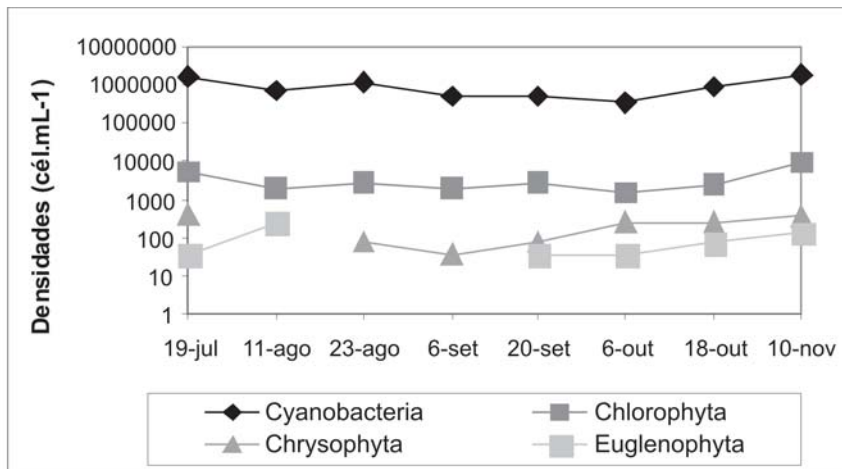


Gráfico 2. Densidades dos principais grupos fitoplânctônicos, no reservatório do Carpina-PE, entre os meses de julho e novembro de 2006.

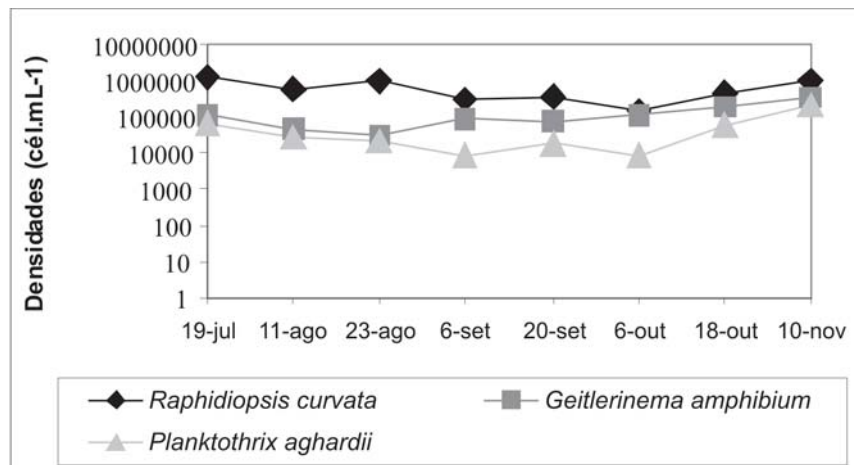


Gráfico 3. Táxons de Cyanobacteria com as maiores densidades no reservatório do Carpina-PE, entre os meses de julho e novembro de 2006.

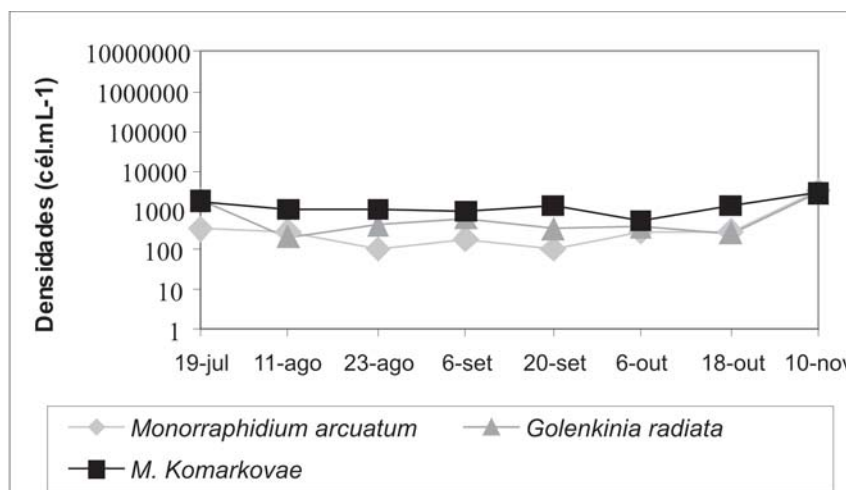


Gráfico 4. Táxons de Chlorophyceae com as maiores densidades no reservatório do Carpina-PE, entre os meses de julho e novembro de 2006.

Tabela 1. Frequência de ocorrência dos táxons encontrados no reservatório do Carpina-PE, entre os meses de julho e novembro de 2006.

Organismos/Data	19/7	11/8	23/8	6/9	20/9	6/10	18/10	10/11	Freqrência(%)
Cyanobacteria									
<i>Raphidiopsis curvata</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	100
<i>R. mediterranea</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	100
<i>Anabaena circinalis</i>	+	+	-	+	-	-	+	+	63
<i>Planktothrix aghardii</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	100
<i>Microcystis</i> sp.	+	+	+	+	+	+	+	+	100
<i>Oscillatoria princeps</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	25
<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	100
<i>Geitlerinema amphibium</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	100
<i>Aphanizomenon gracile</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	100
<i>Pseudanabaena</i> sp.	-	-	-	-	-	-	+	+	25
Chlorophyta									
<i>Monoraphidium arcuatum</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	100
<i>M. komarkovae</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	100
<i>Actinastrum hantzschii</i>	+	+	+	-	-	+	+	+	75
<i>Golenkinia radiata</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	100
<i>Chlorella vulgaris</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	100
<i>Kirchneriella lunaris</i>	+	+	+	-	+	+	+	+	88
Chrysophyta									
<i>Nitzschia</i> sp.	+	-	+	+	+	+	+	+	88
<i>Navicula</i> sp.	+	-	-	-	+	+	+	-	50
<i>Asterionella</i> sp.	-	-	-	-	-	-	+	+	25
<i>Aulacoseira granulata</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	25
Euglenophyta									
<i>Trachelomonas volvocina</i>	+	+	-	-	+	+	+	+	75

Legenda: + Presença; - Ausência

Cyanobacteria foi o único grupo que apresentou táxon dominante e abundante.

Durante o período estudado as espécies *Raphidiopsis curvata* (julho a novembro), *Raphidiopsis mediterranea* (julho, 11 de agosto e 6 de setembro), *Planktothrix aghardii* (18 de outubro e novembro), *Microcystis* sp. (setembro e 6 de outubro), *Cylindrospermopsis raciborskii* (novembro) e *Geitlerinema amphibium* (julho, 11 de agosto, setembro, outubro e novembro) foram abundantes, apresentando densidades maiores do que a média da densidade total da comunidade. Quanto a dominância,

com exceção da primeira amostragem de outubro, o táxon *R. curvata* foi dominante nas demais coletas (Tabela 2).

Constatou-se que o reservatório do Carpina apresentou, em todas as amostras, valores de densidade de Cyanobacteria (cel.mL^{-1}) acima de $100.000 \text{ cel.mL}^{-1}$ (Gráfico 5). A recomendação da OMS, quanto à classificação de ecossistemas aquáticos com valores acima do padrão apresentado acima, indica-o com nível de alerta tipo 2, no qual existe grande probabilidade da presença de cianotoxinas. Nesta situação, a presença de tais substâncias deve ser monitorada.

Tabela 2. Abundância e dominância dos táxons no reservatório do Carpina-PE, entre os meses de julho e novembro de 2006.

Organismos/Data	19/7	11/8	23/8	6/9	20/9	6/10	18/10	10/11
Cyanobacteria (%)								
<i>Raphidiopsis curvata</i>	1342448 *	580415 *	991913 *	314974 *	361966 *	147326	455950 *	1023664 *
<i>R. mediterranea</i>	99078	58137	40941	31934	9826	8188	22927	48311
<i>Anabaena circinalis</i>	1527	4000	0	1091	0	0	1200	13199
<i>Planktothrix aghardii</i>	71631	27728	20796	9243	18485	9243	60078	221825
<i>Microcystis</i> sp.	42901	22216	29379	38142	37087	79410	77192	4072
<i>Oscillatoria princeps</i>	0	0	0	0	0	0	38084	16926
<i>Cylindrospermopsis raciborskii</i>	3012	1004	4016	7027	2008	2008	24094	127495
<i>Geitlerinema amphibium</i>	107158	44224	30617	85046	81644	108859	193905	369100
<i>Aphanizomenon gracile</i>	10508	945	2109	3963	7926	6654	9744	23707
<i>Pseudanabaena</i> sp.	0	0	0	0	0	0	7599	29015
Chlorophyta (%)								
<i>Monoraphidium arcuatum</i>	1600	1091	1018	982	1273	509	1345	2545
<i>M. komarkovae</i>	327	291	109	182	109	291	291	2982
<i>Actinastrum hantzschii</i>	36	73	73	0	0	36	109	145
<i>Golenkinia radiata</i>	1927	218	436	618	327	364	255	2545
<i>Chlorella vulgaris</i>	364	109	364	73	364	218	218	473
<i>Kirchneriella lunaris</i>	691	109	691	0	691	109	145	182
Chrysophyta (%)								
<i>Nitzschia</i> sp.	364	0	73	36	36	73	36	255
<i>Navicula</i> sp.	36	0	0	0		182	36	0
<i>Asterionella</i> sp.	0	0	0	0	0	0	36	36
<i>Aulacoseira granulata</i>	0	0	0	0	0	0	145	73
Euglenophyta (%)								
<i>Trachelomonas volvocina</i>	36	255	0	0	36	36	73	145
Densidade total	1683664	740814	1122534	493310	521779	363506	893464	1886695
Média Total	80174	35277	53454	23491	26089	17310	42546	89843
50% Densidade Total	841822	370407	561267	246655	260889	181753	446732	943348

Legenda: Abundância; * Dominância

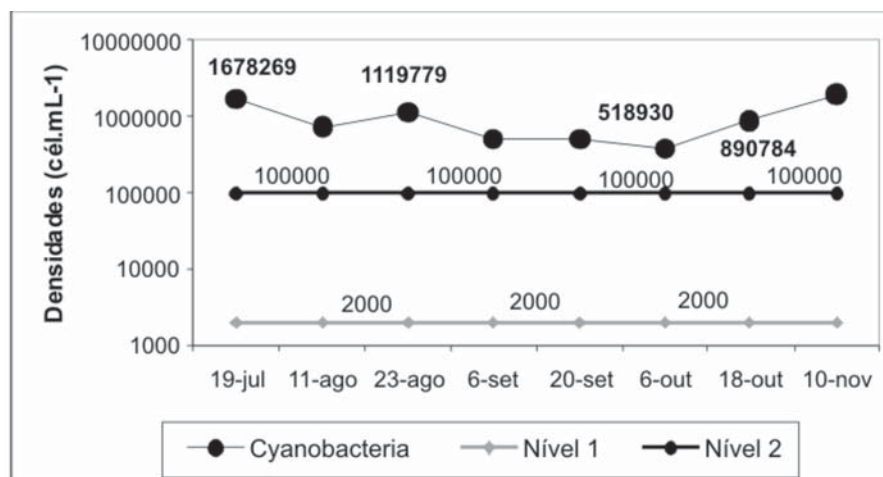


Gráfico 5. Densidades de Cyanobacteria relacionadas aos níveis de alerta para o monitoramento em águas de abastecimento público, entre os meses de julho e novembro de 2006 no reservatório do Carpina-PE.

De acordo com a portaria do MS (N^o 518/GM), quando forem observadas densidades de Cyanobacteria superiores a 20.000 cel.mL⁻¹, no ponto de captação de um manancial, as cianotoxinas devem ser monitoradas realizando-se bioensaios. Se a presença de cianotoxinas for comprovada, devem-se realizar ensaios para a detecção e quantificação destas substâncias em amostras de água coletadas após o tratamento e na entrada (hidrômetro) das clínicas de hemodiálise e indústrias de injetáveis. No caso do manual da FUNASA, que trata da remoção de cianobactérias em águas destinadas ao consumo humano, densidades acima de 100.000 cel.mL⁻¹, estabelecem o nível de alerta 3, que é caracterizado por forte evidência de floração tóxica bem definida no manancial, com risco iminente para a saúde pública.

CONCLUSÕES

Conclui-se que a comunidade fitoplanctônica do reservatório do Carpina, encontra-se caracterizada por intensa proliferação de Cyanobacteria, as quais apresentaram densidades acima de 100.000 cel.mL⁻¹, predominando em riqueza de espécies, abundância relativa e frequência de ocorrência. Tais fatos constituem indicativo de grande potencial tóxico com relação à presença de cianotoxinas, e conseqüentemente, da geração de futuros problemas para a saúde pública. Considerando o fato de que a água deste reservatório presta-se ao consumo das populações ribeirinhas, assim como, o pescado produzido nesse ecossistema, faz-se necessário a implementação de medidas de controle de

Cyanobacteria e monitoramento de cianotoxinas, no sentido de amenizar os possíveis danos que as florações desses organismos podem vir a ocasionar.

AGRADECIMENTOS

Ao Laboratório Central de Saúde Pública - LACEN-PE, pelo apoio e oportunidade em realizar este estudo, aos Prof^{os} Dr. Giulliani Lira e Msc. Cícero Tiago pela orientação e colaboração na realização deste trabalho, à companheira de trabalho e de pesquisas, Carolina Mendes, e às Vigilâncias Ambiental e Sanitária, pelo suporte durante as coletas no reservatório.

REFERÊNCIAS

1. Tundisi JG. Represas artificiais: perspectivas para o controle de manejo da qualidade da água para os usos múltiplos. In: Simpósio Brasileiro de Hidrologia e Recursos Hídricos; 5^o Anal. 1985;4:38-59.
2. Cianobactérias tóxicas na água para consumo humano na saúde pública e processos de remoção em água para consumo humano. Secretaria de Vigilância Ambiental do Ministério da Saúde/ Fundação Nacional de Saúde (FUNASA). Brasília, DF, Brasil 2003.
3. Zampieron SLM, Vieira JLA. Poluição da água. Material de apoio-Textos. [base de dados na internet]. Disponível em: http://educar.sc.usp.br/biologia/textos/m_a_txt5.html. Acesso em 20/05/2003.

4. Sant'Anna CL, Azevedo MTP. Uma ameaça à qualidade da água. Espalhadas pelo Brasil. Pesquisa Fapesp. 2000; 53:28-30.
5. Yoo RS, Carmichael WW, Hoehn RC, Hruday SE. Cyanobacterial (Blue-Green Algal) toxins: A Resource Guide. Denver: WWA Foundation and the American Water Works Association; 1995.
6. Mur LR, Skulberg OM, Utkilen H. Cyanobacteria in the environment. In: Chorus I & Bartram J. Toxic cyanobacteria in water. 1ªed. Londres: E & FN Spon; 1999. p.15-37.
7. Teixeira MGLC, Costa MCN, Carvalho VLP, Pereira MS, Hage E. Gastroenteritis Epidemic in the Area of the Itaparica, Bahia, Brazil. Bulletin of PAHO. 1993; 27(3):244-53.
8. Jochimsen EM, Carmichael WW, Cookson ST, Holmes CEM, Antunes BC, Melo DAF, et al. Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil. New Engl J Med. 1998;338:873-8.
9. Carmichael WW, Azevedo SMFO, Molica RJR, Jochimsen EM, Lau S, Rinehart KL, et al. Human fatalities from cyanobacteria: Chemical and biological evidence for cyanotoxins. Environmental Health Persp. 2001;109:663-8.
10. Normas de qualidade de água para consumo humano. Portaria nº518 do Ministério da Saúde/Secretária de Vigilância em Saúde (SVS). Brasília, DF, Brasil. 25/03/2004.
11. The Weather Channel. [base de dados na internet]. Disponível em: <http://br.weather.com/weather/climatology/BRxx1479>. Acesso em 18/11/2006.
12. Round FE. The Biology of the Algae. London: Edward Arnold (Publishers); 1965. Ltd. 269pp.
13. Round FE. The Taxonomy of the Chlorophyceae, 2. Brit phycol J. 1971;6(2):235-64.
14. Anagnostidis K, Komárek J. Modern approach to the classification system of Cyanobacteria. 3-Oscillatoriales. Arch Hydrobiol Suppl Algal Stud. 1988; Suppl. 80(1-4):327-472.
15. Anagnostidis K, Komárek J. Modern approach to the classification system of Cyanobacteria. 5-Stigonematales. Arch Hydrobiol Suppl Algal Stud. 1990;59:1-73.
16. Komárek J, Anagnostidis K. Modern approach to the classification system of Cyanophytes, 2: Chroococcales. Archiv für Hydrobiologie, Suppl. 73, Algological Studies. 1986;43:157-226.
17. Komárek J, Anagnostidis K. Cyanoprokayota 2 Teil: Oscillatoriales. Subwasserflora von Mitteleuropa. Bridel B, Gaster G, Krienitz L, Schargerl M. (Hrs.) (19/2). Elsevier. 2005. p.759.
18. Komárek J, Kling H. Variation in six planktonic cyanophyte genera in Lake Victoria (East Africa). Archiv für Hydrobiologie, Stuttgart. 1991; Suppl 88:21-46.
19. Komárek J, Anagnostidis K. Cyanoprokaryota, 1. Teil: Chroococcales. In: Ettl HG, Gartner H, Heynig & D. Mollenhauer Ettl (eds): Susswasserflora von Mitteleuropa; Gustav Fischer, Stuttgart. 1999; 19:1-545.
20. Anagnostidis K, Komárek J. Modern approach to the classification system of Cyanophytes. 3-Oscillatoriales. Arch Hydrobiol. 1988; Suppl. 80(1-4):327-472.
21. Sant'Anna CL, Azevedo MTP, Agujaro L. Manual ilustrado para identificação e contagem de cianobactérias planctônicas de águas continentais brasileiras. 1ª ed. Interciência, São Paulo, SP; 2006. 58pp.
22. Utermöhl H. Zur vervollkommung der quantitativen phytoplankton – Methodik. Mitt Int Limnol. 1958; 9: 1-38.
23. Chorus I, Bartram J. Toxic Cyanobacteria in water. A Guide to their public health consequences, monitoring and management. London: E&FN Spon.1999. 416pp.
24. American Public Health Association (APHA). Standard methods for the examination of water and wastewater. 16ª ed. Washington; 1985. p.1088-101.
25. Mateucci SD, Colma A. La metodología para el estudio da vegetación. Coleccion de Monografias Científicas. Série Biología. 1982;22:168.
26. Lobo E, Leighton G. Estructuras comunitárias de lãs fitocenosis planctônicas de los sistemas de desembocaduras de rios y esteros de la zona central de Chile. Rev biol mar oceanogr. 1986;22:1-29.
27. Bouvy M, Barros-França L, Carmouze JP. Compartimento microbiano no meio pelágico de sete açudes do estado de Pernambuco (Brasil). Acta Limnol bras. 1998;10:93-101.
28. Gomes CTS. Análise da variação quali-quantitativa do fitoplâncton no reservatório do Carpina-PE. [Dissertação de mestrado]. Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). No prelo 2008.

Determinação de sucralose em néctares de frutas “light” por CLAE-IR

Determination of sucralose in light nectars by HPLC-RI

RIALA6/1135

Iracema A. KIMURA^{1*}, Cristiane B.CANO², Maristela S. MARTINS¹, Letícia A.F. NAGATO²

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

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

Recebido: 25/06/2007 – Aceito para publicação: 19/09/2007

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo propor uma metodologia analítica de determinação de sucralose em amostras de néctares de frutas “light” utilizando extração em fase sólida (EFS) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector de índice de refração (IR). Quatorze amostras de néctares de frutas “light” de diferentes marcas e sabores (uva, pêssego, morango, manga, goiaba e maracujá) foram centrifugadas a 3000rpm e extraídas em cartuchos de EFS, C18 (500mg, 3mL). Os limites de detecção e quantificação foram respectivamente de 1,7 mg.100mL⁻¹ e de 5,9 mg.100mL⁻¹, e os valores de recuperação foram satisfatórios, em torno de 100%. A correção do efeito da matriz foi necessária apenas para os néctares de uva. A simplicidade, o pouco volume de solventes empregados e a facilidade de processar várias amostras de néctares ao mesmo tempo fazem com que este método possa ser utilizado na rotina dos laboratórios.

Palavras-chave. sucralose, extração em fase sólida, edulcorantes, CLAE, néctar de frutas “light”

ABSTRACT

This paper describes a methodology for performing the sucralose determination in light nectar samples, by using solid phase extraction (SPE) and HPLC with refractive index detection. Fourteen samples of grape, peach, strawberry, mango, guava and passion fruit light nectars from different manufacturers were centrifuged at 3000rpm and cleaned up on C18 SPE cartridges (500mg, 3mL). The detection and quantification limits were 1.7mg. 100mL⁻¹ and 5.9mg.100mL⁻¹, respectively, and the recoveries of sucralose were satisfactory, being around 100%. The matrix effect correction was needed for light grape nectars only. The simplicity of the presented method, the minimal solvent volume requirements, and the easiness in extracting many samples at the same time make this methodology suitable for laboratory routine analyses.

Key words. sucralose, solid phase extraction, sweetener, HPLC, light nectar

INTRODUÇÃO

A sucralose é um edulcorante artificial obtido a partir da sacarose em um processo que substitui três grupos hidroxila por três átomos de cloro e é utilizada em alimentos e bebidas de baixa caloria e adoçantes. Devido à sua grande estabilidade térmica e estabilidade no alimento durante o seu armazenamento é normalmente empregada isolada ou associada com outros edulcorantes^{1,2,3,4}.

Foi descoberta em 1976, através de um estudo colaborativo entre o Queen Elizabeth College da Universidade de Londres e uma companhia de açúcar da Inglaterra, a Tate & Lyle². O primeiro grupo científico a avaliar a segurança da sucralose e o seu uso em alimentos e bebidas foi o Comitê Conjunto FAO/OMS de Peritos em Aditivos Alimentares (JECFA) o qual, em 1990, estabeleceu como Ingestão Diária Aceitável (IDA) o valor de 0-15mg.kg⁻¹ de peso corpóreo^{2,5}. O Canadá foi o primeiro país a aprovar o uso da sucralose em 1991; em 1993 foi a vez da Austrália^{2,3}. Em 1998 os Estados Unidos, através da Food and Drug Administration (FDA), aprovou o seu emprego em 15 categorias de alimentos e bebidas e posteriormente (1999) estendeu o seu uso em outras categorias^{3,5}. Em março de 2002 a sucralose foi aprovada para uso em alimentos pela UK's Food Standards Agency da Inglaterra e em janeiro de 2004 a União Européia publicou a Directiva 2003/115/CE que alterou a Directiva de Edulcorantes (94/35/CE) para permitir o uso da sucralose em alimentos e bebidas, principalmente aqueles com reduzido teor calórico e sem adição de açúcar^{5,6,7,8}.

No Brasil o uso da sucralose em alimentos dietéticos e de baixa caloria está aprovado desde novembro de 1995⁹. A Resolução/RDC nº 3, de 2-01-01 da ANVISA/MS estabelece os limites máximos para algumas categorias de alimentos e bebidas, entre eles, bebidas com reduzido teor de açúcares e bebidas para dietas com restrição de açúcares¹⁰.

Estas bebidas com reduzido teor de açúcares e para dietas com restrição de açúcares são bastante consumidas no Brasil, havendo no comércio uma ampla variedade de bebidas formuladas com edulcorantes. Nos néctares de frutas “light” pode-se encontrar apenas a sucralose ou associada com outro edulcorante, o acesulfame-K.

Os padrões de identidade e qualidade de néctares de frutas são fixados pelo Ministério da Agricultura através do Decreto nº 2314/97 e Instrução Normativa nº 12, de 21-09-03, o qual não permite a associação de açúcares e edulcorantes hipocalóricos e não calóricos na fabricação de néctar^{11,12}.

Na análise da sucralose em alimentos e bebidas algumas técnicas analíticas têm sido aplicadas, tais como a eletroforese capilar (EC)^{13,14,15}, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector UV ou índice de refração (IR)^{16,17}, a cromatografia em camada delgada de alta eficiência (CCDAE)¹⁸ e a cromatografia de íons (CI) com detector amperométrico (PAD)^{19,20}.

O método oficial proposto pelo Food Chemicals Codex (FCC) e JECFA para a determinação da sucralose pura emprega a técnica da cromatografia líquida de alta eficiência com detector de índice de refração (CLAE-IR)^{21,22}. No Brasil, Kimura et al.²³ realizaram um estudo da determinação da sucralose empregando o método oficial em refrigerantes dietéticos e adoçantes de mesa. Para matrizes mais complexas, existem na literatura trabalhos que utilizam a técnica da extração em fase sólida (EFS) para a purificação e concentração deste analito em alimentos, antes da utilização de um método analítico^{15,17,20}.

Neste estudo viu-se a necessidade de se determinar o conteúdo de sucralose nos néctares de frutas “light”, visto que não existem métodos oficiais já estabelecidos para este tipo de produto.

Este trabalho teve como objetivo propor uma metodologia para separar o edulcorante sucralose das demais substâncias presentes em amostras de néctares de frutas “light” empregando-se um pré-tratamento da amostra com extração em fase sólida e posterior quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de índice de refração (CLAE-IR).

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras

Foram analisadas 14 amostras de néctares de frutas “light”, adquiridas no comércio da cidade de São Paulo, sabores: goiaba (2), manga (3), maracujá (2), morango (1), pêssego (3) e uva (3) de diferentes marcas e 6 amostras de néctares de frutas sem a adição de sucralose nos mesmos sabores de diferentes marcas.

Reagentes e padrão

O padrão de sucralose foi fornecido pelo fabricante “Johnson & Johnson” (pureza acima de 99%). Todos os solventes utilizados (metanol, acetonitrila e acetona) foram grau CLAE (min. 99% de pureza, marcas Merck e J. T. Baker) e a água foi purificada em equipamento “Milli-Q”.

Equipamentos utilizados

Cromatógrafo a líquido Shimadzu modelo LC10A, bomba (LC-10AD); forno (CTO 10 A); detector de índice de refração (RID-10 A), injetor Rheodyne com Loop de 20µL; desgaseificador DGU 12A; coluna C18 (Lichrospher 100, Merck), 125 mm de comprimento x 4mm de diâmetro, com partículas de 5µm, pré-coluna de mesma fase, 4 X 4mm. Aquisição de dados: software Class LC10, versão 1.63, Shimadzu Corporation (1996); centrífuga (CELM LS-3); suporte para cartucho de EFS (Manifold) e colunas prontas de EFS (500 mg, 3mL) de C18 da J. T. Baker.

Condições cromatográficas: temperatura do detector IR: 35,5 °C; temperatura do forno: 30°C; vazão de fluxo da fase

móvel: 0,6mL.min⁻¹²³. Fase móvel: água/acetonitrila (85:15 v/v), desgaseificada e filtrada com membrana filtrante de 0,45µm (Millipore, tipo HV-PVDF).

Preparo das soluções-padrão

Foram preparadas soluções de sucralose nas concentrações de 5, 10, 15 e 20mg.100mL⁻¹, diluídas na fase móvel e filtradas com membranas filtrantes Durapore HV de 0,45µm (Millipore), para a curva analítica. Em seguida, foram feitas duas extrações para cada solução-padrão e por dois analistas conforme o procedimento descrito abaixo para as amostras, sem a etapa de centrifugação.

Preparo das amostras

Foram centrifugadas 10mL das amostras a 3000rpm por 30 minutos para a decantação total da polpa. O sobrenadante (1mL) foi transferido para a coluna de EFS, previamente condicionada com 3mL de metanol, seguida de 3ml de acetonitrila. A seguir, para a eliminação das impurezas, efetuou-se a lavagem com 6mL de água e fez-se a eluição da sucralose com 2mL de acetona, a qual foi evaporada em corrente de N₂ e o extrato foi dissolvido em água até um volume final de 1mL. Foram feitas duas extrações em fase sólida para cada amostra (n=2), realizadas por dois analistas (R=2).

Estas amostras assim purificadas foram filtradas em unidades filtrantes Durapore HV de 0,45µm (Millipore) e analisadas por CLAE-IR. As injeções de cada extração foram realizadas em triplicata tanto para as amostras como para as soluções-padrão.

Recuperação

Foi feito o estudo de recuperação adicionando-se quantidade conhecida de sucralose em dois néctares, sendo um de manga e um de goiaba que já continham este edulcorante em sua formulação, o valor adicionado foi de 4,5mg.100mL⁻¹ a cada néctar. Foi também adicionado 8 mg.100mL⁻¹ de sucralose ao néctar de uva que não continha edulcorante. As amostras utilizadas no estudo de recuperação também foram centrifugadas, extraídas e purificadas nas colunas de EFS conforme já descrito, e efetuadas por dois analistas.

Para a quantificação da sucralose foi adotado o método de padronização externa, calculando-se a sua concentração através da curva analítica dos padrões de 5 a 20mg.100mL⁻¹.

Análise estatística

Na construção da curva analítica entre área dos picos cromatográficos e concentração das soluções padrão, aplicou-se a análise de regressão linear simples, onde foi realizada uma análise de variância (ANOVA) e construídos os intervalos de confiança e predição no nível de 95% de confiança. Para a análise estatística empregou-se o pacote estatístico Minitab for Windows, v. 13.31 (2000)^{24, 25}.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O método adotado para as condições cromatográficas foi o de Kimura et al.²³. Para as amostras de néctares de fruta “light” houve a necessidade de se realizar uma centrifugação prévia para que fosse retirada a parte insolúvel, seguida da passagem do sobrenadante no cartucho de EFS C18 que complementaria a remoção de outras impurezas.

Os trabalhos que mencionam o emprego de cartuchos de EFS C18 em outros tipos de matrizes de alimentos não incluem o néctar^{15,17,20}, sendo assim, na utilização dos cartuchos de EFS C18 foram otimizadas as condições de eluição com os solventes acetonitrila, água e acetona, e volumes de lavagens 3mL, 6mL e 2mL, respectivamente.

Para a construção da curva analítica foram realizadas as mesmas condições de preparo de amostra, ou seja, as soluções-padrão foram passadas em cartuchos de EFS, porém sem a etapa da centrifugação. A curva analítica estabelecida foi linear na faixa de trabalho escolhida, de 0 a 20mg.100mL⁻¹. Isto pode ser observado pelo alto valor do coeficiente de determinação R²= 0,993 e os intervalos de confiança e predição, no nível de 95% de confiança, com limite de detecção (LOD) de 1,7mg.100mL⁻¹ e limite de quantificação (LQ) de 5,9mg.100mL⁻¹, indicando homogeneidade de variância em toda a faixa estudada (Tabela 1 e Figura 1), sugerindo que o método por EFS foi eficaz.

Para a verificação da existência de possíveis substâncias interferentes no mesmo t_R da sucralose (o tempo de retenção médio foi de 6,8min) foram analisadas 6 amostras de néctares com os mesmos sabores que não continham sucralose na sua formulação (branco). Os cromatogramas destas amostras não apresentaram picos interferentes neste tempo de retenção mostrando que não houve efeito de matriz, com exceção do néctar de uva que teve um composto eluído no mesmo t_R da sucralose, sugerindo que devido à sua composição, o método proposto de extração não permitiu eliminar este componente (Figura 2).

Tabela 1. Análise estatística empregada na regressão linear no nível de 95% de confiança e equação da reta.

Edulcorante	F _{reg} *	p	R ²	Equação da reta	LOD (mg.100mL ⁻¹)	LQ (mg.100mL ⁻¹)
Sucralose	2882,5	0,000	0,993	y= 22761,0 x	1,7	5,9

*- Valor do F de regressão F_(1;18;0,05) = 4,41

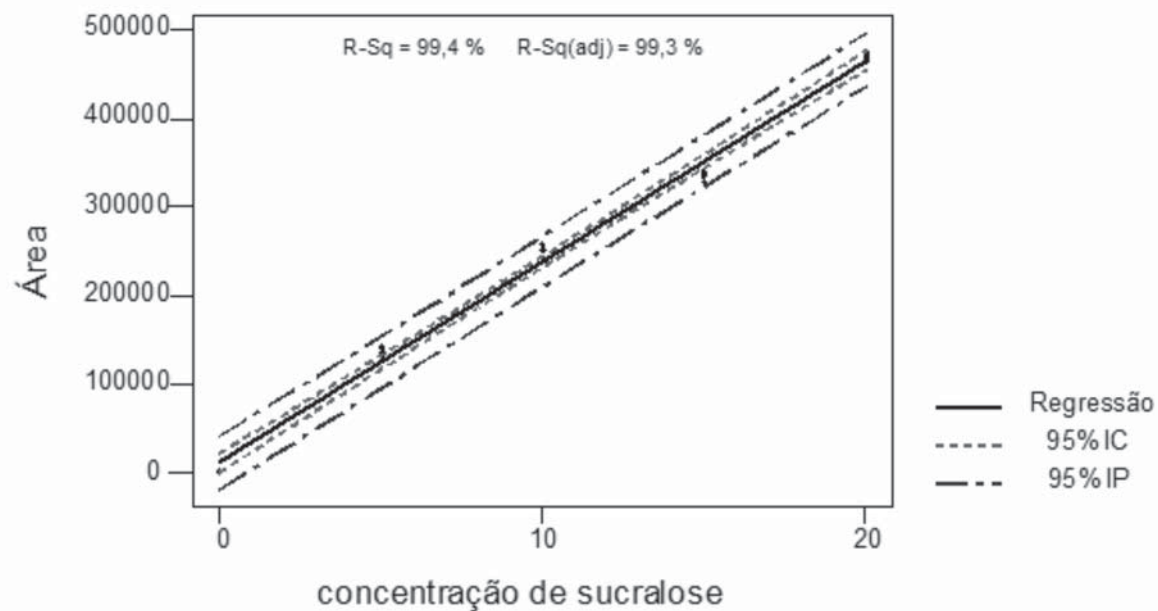


Figura 1. Curva analítica da sucralose ($\text{mg} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$) obtida por CLAE-IR. Cada ponto é a média de três medidas. IC - intervalo de confiança e IP – intervalo de predição a 95% de confiança.

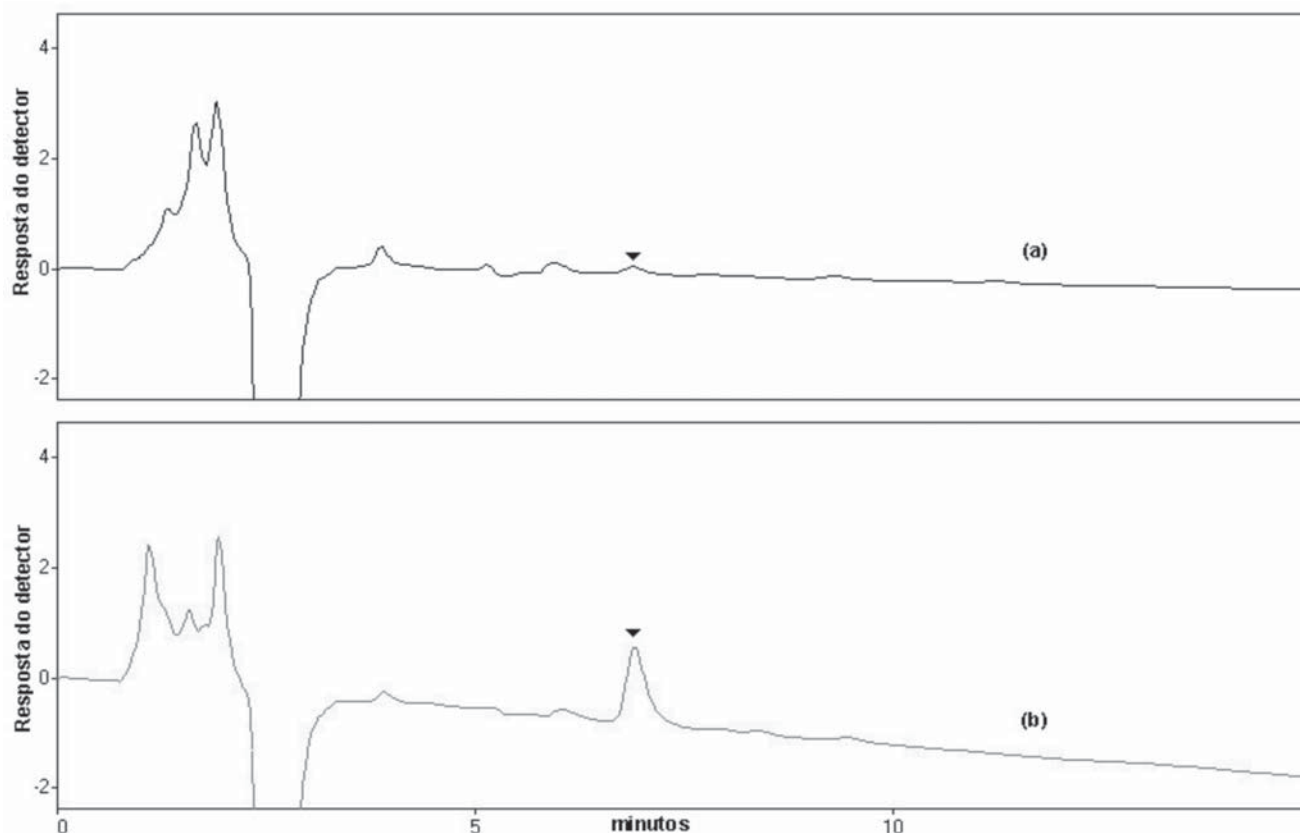


Figura 2. Cromatogramas obtidos por CLAE-IR do néctar de uva, após centrifugação e extração em cartuchos de EFS: (a) sem adição de sucralose (o símbolo ▼ indica o composto que tem o mesmo t_R da sucralose), (b) com adição de sucralose (o mesmo símbolo indica a sucralose).

Para verificar a eficiência do método proposto para a determinação de sucralose em néctar “light” foi realizado o estudo da recuperação deste edulcorante, sendo escolhidas duas matrizes contendo sucralose (manga e goiaba) e uma de uva que não continha sucralose (Tabela 2).

Tabela 2. Dados de recuperação (%) de sucralose

Néctar “light”	Recuperação (%)*
Manga	105 ± 2
Goiaba	105 ± 2
Uva	103 ± 2

*Média ± Desvio Padrão (nxR=4), n=n° de replicas e R=n° de analistas

Observando-se a Tabela 2 verifica-se que os valores de recuperação variaram de 103 a 105 % e apresentaram baixo desvio padrão, indicando que tanto o preparo da amostra como as condições cromatográficas adotadas para este trabalho foram eficientes e tiveram boa reprodutibilidade, e que não foram afetadas por erros proporcionais ou constantes significativos em relação à curva analítica obtida. Para o néctar de uva que apresentou um composto no mesmo t_r da sucralose foi efetuada uma correção nos cálculos, subtraindo-se a área obtida do

branco. Este procedimento deve ser feito para todas as marcas de néctar de uva.

A seguir efetuou-se a análise das amostras dos néctares de frutas “light”. Na Figura 3 podemos observar os cromatogramas para cada sabor.

Verificam-se nos cromatogramas das diversas matrizes de néctares de frutas “light” (Figura 3) que, através da prévia centrifugação da parte polposa do néctar seguida da EFS houve uma melhora no perfil cromatográfico, ou seja, os picos dos compostos interferentes que apareceram na frente do solvente diminuíram indicando que as etapas empregadas foram satisfatórias na limpeza das amostras dos diversos néctares.

Na Tabela 3 estão apresentados os resultados encontrados do edulcorante sucralose em 14 amostras de néctares “light” discriminados por sabor de diversas marcas adquiridas no comércio.

Apesar de existirem marcas com formulações diversas os resultados de sucralose obtidos estão coerentes com os declarados nos respectivos rótulos, indicando que a faixa de concentração estudada está de acordo com a variação encontrada nos néctares de frutas “light” comercializados.

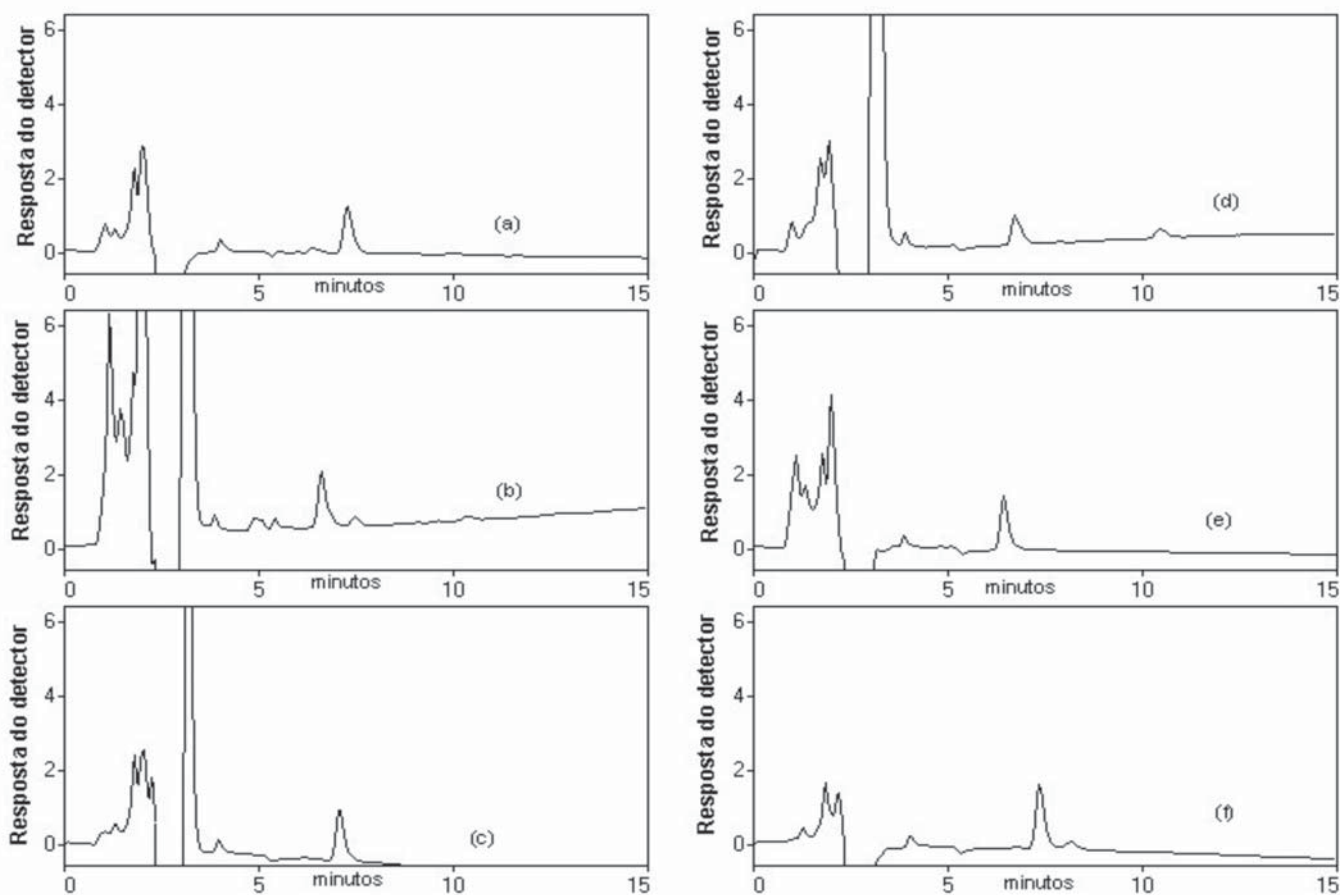


Figura 3. Cromatogramas obtidos por CLAE-IR das diversas matrizes de néctar “light”, após centrifugação e extração em cartuchos de EFS, t_r médio da sucralose, 6,84min: (a) uva, (b) pêssego, (c) morango, (d) manga, (e) goiaba, (f) maracujá.

Tabela 3. Teores médios de sucralose (mg.100mL⁻¹) encontrados nas amostras de néctares “light”.

Néctar “light”	Sucralose*	Teor declarado
Goiaba marca 1	10,3 ± 0,1	9
Goiaba marca 2	9,9 ± 0,4	8,03
Manga marca 1	9,5 ± 0,4	9
Manga marca 2	5,8 ± 0,1	5,6
Manga marca 4	13,3 ± 0,1	13
Maracujá marca 2	14,8 ± 0,1	16,6
Maracujá marca 4	12,8 ± 0,2	14
Morango marca 3	10,7 ± 0,9	12
Pêssego marca 1	11,2 ± 0,2	9
Pêssego marca 2	5,7 ± 0,2	6
Pêssego marca 4	9,9 ± 0,4	10
Uva marca 1	9,2 ± 0,2	9
Uva marca 2	5,8 ± 0,1	5,7
Uva marca 4	12,5 ± 0,8	12

* Média ± Desvio Padrão (nR=4) , n=nº de replicas e R=nº de analistas

CONCLUSÕES

Como as amostras de néctares “light” de diversas frutas possuem matrizes diferenciadas e complexas verificou-se a necessidade do emprego de duas etapas no preparo das amostras (centrifugação e extração em fase sólida) para a análise de sucralose. No caso das amostras de néctar “light” sabor uva foi necessário efetuar uma correção da quantidade de sucralose em relação ao branco, devido à presença de um composto eluído no mesmo tempo de retenção. Para amostras de sabores diferentes aos estudados neste trabalho recomenda-se um estudo prévio da matriz.

Através dos valores obtidos na curva analítica dos padrões de sucralose, observou-se que o modelo gerado foi linear em toda a faixa de trabalho estudada quando se empregou a extração em fase sólida.

A extração em fase sólida utilizada neste trabalho mostrou ser uma técnica relativamente simples empregando pequenos volumes de solventes e pequenas quantidades de amostra e foi seletiva para este edulcorante.

Os valores de recuperação foram satisfatórios, em torno de 100%, indicando que este método é adequado para a análise de sucralose em néctares de frutas “light”.

O método proposto mostrou-se eficiente, sensível e rápido, uma vez que permite a extração de várias amostras simultaneamente, podendo ser aplicada na rotina dos laboratórios.

REFERÊNCIAS

1. Miller GA. *Alternative Sweeteners*, New York: Marcel Dekker, Inc.;1991. p.173-95.
2. Wallis KJ. Sucralose: features and benefits. *Food Australia* 1993;45(12):578-80.
3. Frank G. Sucralose: an overview. Disponível em: <http://www.kon.org/urc/frank.html>. Acesso em jan 2006.
4. Sälzer K, Manczyk C. Reformulando as regras: novas opções em sistemas edulcorantes. *Food Ingredients*. 2003;24:50-2.
5. International Food Information Council Foundation. Everything you need to know about sucralose. Disponível em: <http://ific.org/publications/brochures/sucralosebroch.cfm>. Acesso em jan 2006.
6. Binns NM. Sucralose - all sweetness and light. *Nutrition Bulletin* 2003; 28(1):53–58. Disponível em: <http://www.blackwell-synergy.com/doi/abs/10.1046/j.1467-3010.2003.00307.x?journalCode=nbu&volume=28&issue=1>. Acesso em jul 2005.
7. European Parliament and Council Directive 94/35/EC of 30 June 1994 on sweeteners for use in foodstuffs. *OJ L* 237, 10.9.1994;3–12. Disponível em: <http://europa.eu.int/scadplus/leg/en/lvb/l21069.htm>. Acesso em jan 2006.
8. Scientific Committee on Food. Opinion of the Scientific Committee on Food on Sucralose. SCF/CS/ADDS/EDUL/190 Final. Disponível em: http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out68_en.pdf. Acesso em jan 2006.
9. Brasil. Portaria nº 318 de 24 de nov de 1995, da DTEN do Ministério da Saúde. [Aprova o uso do aditivo sucralose, com a função de edulcorante em alimentos e bebidas dietéticas]. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 28 nov. 1995. Seção 1, no 227, 19406.
10. Brasil. Resolução RDC no 3 de 2 de jan. de 2001 da ANVISA do Ministério da Saúde [Aprova o uso de aditivos edulcorantes, estabelecendo seus limites máximos para os alimentos]. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 5 jan. 2001. Seção 1, no 4, p.39-40.
11. Brasil. Decreto nº 2314, de 04/09/1997. Regulamenta a Lei nº 8918, de 14/07/1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 5 set. 1997. Seção 1, p.19549-19560.
12. Brasil. Instrução Normativa nº 12, de 04/09/2003. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento [Aprova o Regulamento Técnico para fixação dos padrões de identidade e qualidade gerais para suco tropical e os padrões dos néctares]. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 9 set. 2003. Seção 1, p. 2-5.
13. Zhao RR., Johnson BP. Capillary electrochromatography: analysis of sucralose and related carbohydrate

- compounds. *J Liq Chromatogr Relat Technol.* 2000; 23(12): 1851-7.
14. Stroka J, Dossi N, Anklam E. Determination of the artificial sweetener sucralose by capillary electrophoresis. *Food Addit Contam.*2003;20(6):524-7.
 15. McCourt J, Stroka J, Anklam E. Experimental design-based development and single laboratory validation of a capillary zone electrophoresis method for the determination of the artificial sweetener sucralose in food matrices. *Anal Bioanal Chem.* 2005; 382: 1269-78.
 16. Lawrence JF, Charbonneau CF. Determination of seven artificial sweeteners in diet food preparations by reverse-phase liquid chromatography with absorbance detection. *J Assoc Off Anal Chem.*1988;71(5):934-7.
 17. Quinlan ME, Jenner MR. Analysis and stability of the sweetener sucralose in beverages. *J Food Sci.*1990; 55(1):244-6.
 18. Spangenberg B, Stroka J, Arranz I, Anklam E. A simple and reliable HPTLC method for the quantification of the intense sweetener sucralose. *J Liq Chromatogr Relat Technol.* 2003; 26(16):2729-39.
 19. Hanko VP, Rohrer JS. Determination of sucralose in Splenda and a sugar-free beverage using high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *J Agric Food Chem.* 2004; 52: 4375-9.
 20. Kishi H, Kawana K. Determination of sucralose in foods by anion-exchange chromatography and reverse-phase chromatography. *Shokuhin-Eiseigata-Zasshi.*2001; 42(2):133-8.
 21. Committee on Food Chemicals Codex – Food Chemicals Codex. 4^a ed. Washington D. C.: National Academic Press; 1996. p. 398-400.
 22. JECFA-Joint Fao/Who Expert Committee on Food Additives - Compendium of Food Additive Specifications. Rome, 1992. p. 1535-6.
 23. Kimura IA, Cano CB, Nagato LAF., Martins MS. Análise de sucralose por cromatografia líquida de alta eficiência em refrigerante dietético e adoçante de mesa. *Rev Inst Adolfo Lutz.* 2005;64(2):200-4.
 24. MINITAB for windows,[Minitab- Inc, USA.] Versão. 13.31 .2000. CD-rom.
 25. Barros Neto B, Scarminio IS, Bruns RE. Planejamento e Otimização de Experimentos. Campinas: Unicamp; 2002.401 p.

Níveis de colesterol em ovos de galinha caipira, de granja e de codorna submetidos a diferentes condições de estocagem

Cholesterol levels in country chicken eggs, in those of farm raised chickens, and in quail eggs stored under different conditions

RIALA6/1136

Heryka M. M. RAMALHO¹, Ana Paula M. da COSTA², Nathália K. M. SOARES², Keith H. D. SILVA², Videanny V. A. SANTOS¹, Roberto DIMENSTEIN^{1*}

*Endereço para correspondência: ¹Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Av. Senador Salgado Filho, nº3000, CEP 59072-970, Lagoa Nova, Natal, RN/Brasil, Fone: 55(0**84) 3215-3416 ramal 212. Fax 55(0**84)32119208; e-mail: robertod@ufrnet.br

²Curso de Nutrição, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, CEP 59076 970, Natal, RN/Brasil.
Recebido: 26/09/2007 – Aceito para publicação: 28/12/2007

RESUMO

A falta de informação sobre o colesterol nos alimentos tem levado à redução do consumo de produtos de origem animal, com conseqüentes desvantagens nutricionais. Esse trabalho teve o propósito de determinar a concentração de colesterol em ovos de galinha caipira, de granja e de codorna armazenados sob diferentes condições de temperatura. Trinta ovos frescos foram divididos em cinco grupos de seis. Em um grupo o colesterol foi analisado imediatamente; dois grupos foram mantidos sob temperatura ambiente por 10 e 20 dias e dois outros grupos sob refrigeração pelo mesmo período. A dosagem do colesterol foi realizada por método enzimático. Os ovos frescos apresentaram concentração de colesterol de 956mg/100g, 813mg/100g e 921mg/100g, para ovos de galinha caipira, de granja e codorna, respectivamente. A temperatura e o tempo de armazenamento elevaram os níveis de colesterol em todos os tipos de ovos. Nos ovos estocados a temperatura ambiente o aumento foi significativo após 10 dias, enquanto que sob refrigeração, somente após 20 dias. Concluímos que houve aumento na concentração de colesterol dos ovos estudados, e que esse aumento foi observado em menor tempo, quando os ovos foram estocados em temperatura ambiente.

Palavras-chave. colesterol, ovos, galinha, codorna, método enzimático.

ABSTRACT

The lack of information of cholesterol in food items and the implications of its consumption has resulted in a reduction in the use of animal food products. The purpose of this study was to determine the cholesterol concentrations in country chicken eggs, farm grown chicken eggs, and quail eggs that have been stored under different temperature conditions. Thirty fresh eggs were divided in five groups of six. The cholesterol content of one group was immediately analyzed; two groups were maintained at room temperature for 10 and 20 days; and other two groups were stored under refrigeration for the same period. The cholesterol dosage was performed by enzymatic method. The fresh eggs presented cholesterol concentrations of 956mg/100g, 813mg/100g and 921mg/100g, for the country chicken eggs, farm grown eggs, and quail eggs, respectively. In all types of eggs an increase of cholesterol concentration was observed during storage at room temperature and with refrigeration. In eggs stored at room temperature the increase was significant after 10 days, while under refrigeration, only after 20 days. We concluded that there was increase in the concentration of cholesterol eggs, and this increase was observed in less time, when the eggs were stored at room temperature.

Key words. cholesterol, eggs, chicken, quail, enzymatic method.

INTRODUÇÃO

O colesterol, o mais importante esteroide encontrado no tecido animal, é uma molécula anfipática composta de um núcleo esteróide e uma cadeia ramificada de hidrocarboneto¹. Desempenha importantes funções no organismo humano, sendo um componente essencial de membranas, precursor da síntese de hormônios esteróides, tais como: corticosteróides, hormônios sexuais, vitamina D, e de ácido biliar. Além disso, o colesterol faz parte das lipoproteínas, ajudando a transportar as gorduras pelo organismo^{2,3,4,5}.

Este nutriente pode ser obtido através da dieta ou na forma endógena, sintetizado principalmente pelo fígado, e em quase todos os tecidos humanos, incluindo o intestino e as glândulas que produzem os hormônios esteróides. É um produto típico do metabolismo animal, estando presente na gema de ovo, carne, fígado e cérebro^{4,6,7}. De acordo com Milinsk et al.⁸, o conteúdo lipídico dos ovos é afetado por fatores genéticos, idade, programas de alimentação e também pelos níveis e tipos de lipídeos dietéticos. Entretanto, Hargis⁹, concluiu que as manipulações dietéticas, genéticas e farmacológicas podem reduzir os níveis de colesterol nos ovos, e essa prática tem sido marginalmente bem sucedida.

Uma taxa elevada de colesterol no sangue é um dos fatores de risco para doenças cardiovasculares, a principal causa de morte no Brasil e em muitos outros países². A hiperlipidemia, particularmente hipercolesterolemia, é comumente aceita como principal fator de risco para a aterosclerose e doenças coronarianas, que estiveram em níveis epidêmicos por muito tempo. O papel crescente da dieta na progressão e prevenção dessas doenças conduziu à convergência da atenção de consumidores e governo na qualidade dos alimentos para a saúde¹⁰.

A falta de informação referente às concentrações de colesterol nos alimentos e as verdadeiras implicações relativas à sua ingestão tem levado à redução do consumo de produtos de origem animal, com conseqüentes desvantagens nutricionais¹¹.

Segundo Turatti et al.¹², o ovo pode ser considerado como um alimento nutricionalmente completo e é uma das melhores opções para solucionar os problemas de nutrição na América Latina, sendo inclusive uma excelente fonte de vitamina A¹³. De forma geral, os ovos têm pouquíssima influência nos altos níveis de colesterol sanguíneo ou nas enfermidades cardiovasculares. Estudo realizado em 22 países industrializados e apresentado em relatórios publicados no Lipid Research Clinics mostrou que a incidência de doenças cardiovasculares é mais baixa no Japão, onde o consumo de ovo é maior¹².

Tendo em vista a escassez de pesquisas sobre o efeito e as condições de estocagem na estabilidade deste nutriente em ovos, esse trabalho teve o propósito de determinar a concentração de colesterol nos ovos de galinha caipira, de granja, e estabelecer uma comparação com o colesterol de ovos

de codorna encontrados em supermercados de Natal-RN, além de verificar a variação deste nutriente durante o armazenamento sob diferentes condições de temperatura.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

Para a investigação foram adquiridos, ao acaso, uma bandeja com 30 ovos frescos de codorna e uma bandeja com 36 ovos para ambas as aves, galinha caipira e de granja, os quais foram selecionados aleatoriamente para as análises. Os ovos de codorna apresentavam peso médio de 11g e os ovos de galinha 60g, sendo o peso médio das gemas de 3g e 15g, respectivamente. Os ovos foram adquiridos em supermercados de Natal-RN.

Os níveis de colesterol foram determinados nos ovos, aos 0, 10 e 20 dias de estocagem, correspondentes ao prazo máximo para consumo determinado nas embalagens dos produtos.

Trinta ovos adquiridos de cada espécie de ave estudada foram divididos em cinco grupos de 6 ovos. Em um grupo foi analisado o conteúdo de colesterol imediatamente; um segundo e terceiro grupos foram mantidos sob temperatura ambiente por 10 e 20 dias, respectivamente; e dois outros grupos foram armazenados sob refrigeração (5 a 10°C) pelo mesmo período.

Preparo das amostras

De uma mesma cartela de ovos, tanto para os ovos de galinha quanto para os de codorna, meia dúzia de ovos foram separados, pesados e em seguida cozidos por cinco minutos após ebulição, as gemas foram separadas, misturadas e homogeneizadas, tomando-se seis alíquotas de 0,25g para análises, para cada período do estudo.

Método

Saponificação direta e extração do colesterol das amostras

O método utilizado para a extração e a dosagem de colesterol na gema dos ovos foi baseado na técnica descrita por Bragagnolo & Rodriguez-Amaya¹⁴.

Foram pesados 0,25g de gema em tubo de polipropileno com tampa rosqueável de 50mL. Foi realizada uma saponificação alcalina com 10mL de hidróxido de potássio (KOH 2%) em etanol absoluto. Posteriormente, os tubos foram colocados em banho-maria a 50°C em agitação por 2 horas. Em seguida, foram adicionados 5mL de água destilada e deixou-se resfriar. A extração da matéria insaponificável presente na amostra ocorreu em três extrações sucessivas, para tal foram adicionados 10mL de hexano (grau p.a.), agitando o tubo em vortex por um minuto. Após separação, toda a fase hexânica foi transferida para um novo tubo com tampa rosqueável de 50mL. Na primeira extração foram retirados 9mL do

sobrenadante, nas extrações subseqüentes foram retirados 10mL do sobrenadante.

Dosagem do colesterol por método enzimático

Para esta dosagem foi utilizado kit específico para análise de colesterol (LABORLAB S.A). Uma alíquota de 0,5mL do extrato hexânico foi colocada em um tubo de vidro de 5mL, a qual foi evaporada sob atmosfera de nitrogênio, em banho-maria a 37°C. Em seguida, 0,5mL de isopropanol grau cromatográfico foi adicionado e agitado em vortex até completa solubilização. Foram adicionados 3mL do reativo enzimático preparado da seguinte forma: 0,5mL do reativo de cor nº 1 (4 aminofenazona 0,025mol/L), 0,5mL do reativo de cor nº 2 (fenol 0,055 mol/L), 19mL de água destilada e 0,2mL do reativo enzimático (lipase e⁺ 300U/mL, COD e⁺ 3U/mL, POD e⁺ 20U/mL) à amostra. Os tubos foram mantidos em banho-maria 37°C ± 2°C, para tratamento térmico, por 10 minutos. Após repouso de 1,5 hora, a absorbância foi lida em espectrofotômetro, contra o branco, igualmente preparado, a 499 nm. Para a obtenção da curva, foram realizadas análises em alíquotas de 10, 20 e 40µL do padrão de colesterol na concentração de 200mg/dL. A curva analítica foi obtida por regressão linear e apresentou boa linearidade (r = 0,9988). A reação é linear até 500mg/dL. Para resultados com valores superiores a solução colorida final foi diluída 1:2 ou 1:4 com o Reativo de trabalho e multiplicado o resultado pelo fator da diluição utilizada. A cor final da reação é estável por 120 minutos.

Análise estatística

Para verificar as diferenças entre as médias do colesterol para as gemas dos diferentes tipos de ovos e dos ovos de uma mesma espécie, armazenados à temperatura ambiente e sob refrigeração, foi utilizado o teste t de Student em amostras não pareadas. As diferenças foram consideradas significativas quando p < 0,05

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 podem ser observados os valores de colesterol para as gemas dos ovos de galinha caipira, de granja, e de codorna em diferentes condições de armazenamento, no tempo zero e com 10 dias de estocagem à temperatura ambiente, e no tempo zero, com 10 e 20 dias de estocagem sob refrigeração.

A análise do colesterol em ovos com 20 dias de armazenamento à temperatura ambiente foi inviável, visto que, neste período, os ovos perderam suas características organolépticas através do processo de deterioração, tornando-os impróprios para o consumo. Este fato gera um alerta para os consumidores, quanto ao tempo de aquisição e a melhor forma de estocagem dos ovos.

Ao analisar o teor de colesterol nas diferentes espécies de aves (Tabela 1), verificou-se uma variação significativa (p < 0,05) entre galinha caipira, de granja e codorna nas amostras com 10 e 20 dias de refrigeração respectivamente. Não houve diferença significativa entre as médias de colesterol dos ovos de galinha caipira e de codorna no tempo zero tanto para estocagem à temperatura ambiente, como sob refrigeração nem com 10 dias de estocagem à temperatura ambiente (p > 0,05).

No que se refere às condições de estocagem, foi observado um aumento gradual nas concentrações do colesterol com o tempo de armazenamento nos três grupos estudados, sendo que os ovos armazenados à temperatura ambiente apresentaram um aumento significativo (p < 0,05) com 10 dias de estocagem, enquanto que os armazenados sob refrigeração apresentaram aumento significativo (p < 0,05) apenas após 20 dias de refrigeração, exceto os ovos de galinha caipira, cujo aumento na concentração de colesterol foi significativo (p < 0,05) com 10 dias de armazenamento (Tabela 1).

Segundo Alleoni & Antunes¹⁵ e Ordóñez¹⁶, modificações na qualidade interna nos ovos, ocorrem devido à perda de água e CO₂ através da casca dos ovos assim como, processos de liquefação do albume, movimentação de líquidos entre os compartimentos,

Tabela 1. Concentrações médias (mg/100g de gema) de colesterol em ovos de galinha caipira, de granja e de codorna.

Ovos	Período de Estocagem (dias)					
	Estocagem Ambiente (dias)			Estocagem Refrigerada (dias)		
	0 M ± DP	10 M ± DP	20 M ± DP	0 M ± DP	10 M ± DP	20 M ± DP
Caipira	956 ± 34 ^{a,A}	1052 ± 60 ^{b,A}	n.d.	956 ± 34 ^{a,A}	1004 ± 38 ^{b,A}	1036 ± 15 ^{b,A}
Granja	813 ± 36 ^{a,B}	851 ± 18 ^{b,B}	n.d.	813 ± 36 ^{a,B}	841 ± 21 ^{a,B}	906 ± 50 ^{c,B}
Codorna	921 ± 24 ^{a,A}	1020 ± 26 ^{b,A}	n.d.	921 ± 24 ^{a,A}	943 ± 27 ^{a,C}	1132 ± 57 ^{c,C}

M ± DP: médias e estimativas do desvio-padrão das determinações para n = 6.

^{a,b,c}: médias seguidas de letras minúsculas diferentes, na mesma linha, diferem entre si ao nível de significância de 5%.

^{A,B,C}: médias seguidas de letras maiúsculas diferentes, na mesma coluna, diferem entre si ao nível de significância de 5%.

n.d.: não determinado, devido à deterioração dos ovos estocados à temperatura ambiente durante esse período.

distensão e flacidez da membrana vitelina da gema. O aumento dos níveis de colesterol nos ovos, com o passar do tempo, pode ter se dado pela perda de água através da casca, fazendo com que sua concentração no interior dos ovos fosse elevada.

Os ovos de galinha de granja (Tabela 1) apresentaram a menor concentração de colesterol, 813mg/100g de gema, enquanto que o valor de colesterol nos ovos de galinha caipira foi de 956mg/100g de gema, o que equivale a um aumento de 17% em relação aos de granja. Os ovos de codorna apresentaram valores intermediários de colesterol, 921mg/100g de gema, o que corresponde a 13% do valor encontrado nos ovos de granja.

Em relação às concentrações médias de colesterol nos ovos de codorna, o valor de 921mg/100g de gema encontrado neste trabalho, está abaixo do valor encontrado por Bragagnolo & Rodriguez-Amaya¹⁴, de 1200mg/100g, e pelo reportado por Maurice et al.¹⁷, que encontraram 2380mg/100g.

Os níveis de colesterol nas gemas dos ovos de granja (813mg/100g) encontrados neste estudo foram inferiores aos encontrados por outros autores^{14,17}, como Bragagnolo & Rodriguez-Amaya¹⁴, Mazalli et al.¹⁸, Mazalli et al.¹⁹ e Mourthé & Martins²⁰, que também analisaram o nível de colesterol nas gemas de ovos de galinhas comercializados no Brasil e encontraram concentrações de 1200, 1310, 1360 e 1650mg colesterol/100g gema respectivamente.

Ao comparar os resultados obtidos com os apresentados em tabelas de composição de alimentos, observou-se que a média de colesterol encontrada neste estudo (813mg/100g) para as gemas de ovos de galinha de granja foi inferior à da tabela americana USDA²¹ (1234 mg/100g), Taco²² (1272 mg/100g) e Philippi²³ (1281mg/100g).

Valores de concentração de colesterol em ovos de galinha caipira são bastante escassos, razão pela qual se torna difícil a realização de uma análise comparativa.

Apesar dos valores absolutos indicarem uma maior concentração de colesterol no ovo de galinha caipira, essa diferença não foi significativa em relação ao ovo de codorna. Entretanto, o ovo da galinha de granja apresentou os menores valores de colesterol quando comparado aos outros ovos. A temperatura e o tempo de armazenamento afetaram os níveis de colesterol em todos os tipos de ovos, sendo evidente o aumento do colesterol nos ovos de 10 dias armazenados à temperatura ambiente quando comparados aos de 10 dias refrigerados. Nos ovos estocados sob refrigeração o aumento só foi significativo após 20 dias, exceto para os ovos de caipira, cujo aumento já era significativo com 10 dias de refrigeração.

CONCLUSÃO

Concluimos que houve aumento na concentração de colesterol dos ovos estudados, e que esse aumento foi observado em menor tempo, quando os ovos foram estocados em temperatura ambiente.

REFERÊNCIAS

1. Lichtenstein AH, Jones PJH. Lipids: absorption and transport. In: Bowman BA, Russel RM. Present Knowledge in Nutrition. 8nd ed. Washington: ILSI Press; 2001. p.92-103.
2. Bragagnolo N, Rodriguez-Amaya DB. Determination of cholesterol in meat: comparasion of colorimetric and hplc methods. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2001; 60(1):53-7.
3. Franco G. Tabela de composição química dos alimentos. 9nd ed. São Paulo: Atheneu; 1998.
4. Glew RH. Metabolismo de lipídeos II: vias do metabolismo de lipídeos especiais. In: Devlin TM. Manual de bioquímica com correlações clínicas. São Paulo: Ed Edgard Blücher; 1998. p.328-55.
5. Ewin J. O lado sadio das gorduras: ácidos graxos essenciais para uma vida e uma aparência saudáveis. Rio de Janeiro: Campus, 1997. p.17-44.
6. Jones PJH, Papamandjaris AA. Lipids: Cellular Metabolism. In: Bowman BA, Russel RM. Present Knowledge in Nutrition. 8nd ed. Washington: ILSI Press; 2001. p.104-14.
7. Souza-Soares LA, Siewerdt F. Aves e ovos. Pelotas: Editora da Universidade UFPEL; 2005.
8. Milinsk MC, Murakami AE, Gomes STM, Matsushita M, Souza NE. Fatty acid profile of egg yolk lipids from hens fed diets rich in n-3 fatty acids. *Food Chem*. 2003; 83:287-92.
9. Hargis PS. Modifying egg yolk cholesterol in the domestic fowl – a review. *Worlds Poultry Scien J*. 1988; 44: 17.
10. Hodzic A, Hamamdzic M, Gagic A, Mihaljevic M, Krnic J, Vegara M et al. Egg yolk lipid modifications by fat supplemented diets of laying hens. *Acta Veterin*. 2005; 55(1):41-51.
11. Saldanha T, Mazalli MR, Bragagnolo, N. Avaliação comparativa entre dois métodos para determinação do colesterol em carnes e leite. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2004; 24(1):109-13.
12. Turatti JM, Gomes RAR, Athié I. Lipídeos: aspectos funcionais e novas tendências. Campinas: ITAL; 2002.
13. Ramalho HMM, Santos VVA, Medeiros VPQ, Silva KHD, Dimenstein R. Effect of thermal processing on retinol levels of free-range and caged hen eggs. *Inter J Food Scien Nutr*. 2006; 57:244-8.
14. Bragagnolo N, Rodriguez-Amaya DB. Comparision of the cholesterol content of brazilian chicken and quail eggs. *J Food Comp Anal*. 2003; 16:147-53.
15. Alleoni ACC, Antunes AJ. Perfil de textura e umidade espremível de géis do albume de ovos recobertos com soro de leite. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2005; 25(1):153-7.
16. Ordóñez JA. Tecnologia de alimentos. Alimentos de origem animal. Porto Alegre: Artmed; 2005. p.269-79.

17. Maurice DV, Lightsey SF, Hsen KT, Gaylord TG, Reddy RV. Cholesterol in eggs from different species of poultry determined by capillary GLC. *Food Chem.* 1994; 50(4):367-72.
18. Mazalli MR, Faria DE, Salvador D, Ito DT. A comparison of the feeding value of different sources of fat for laying hens: 2. lipid, cholesterol, and vitamina E profiles of egg yolk. *J Appl Poult Res.* 2004;13:280-90.
19. Mazalli RM, Saldanha T, Bragagnolo N. Determinação de colesterol em ovos: comparação entre um método enzimático e um método por cromatografia líquida de alta eficiência. *Rev Inst Adolfo Lutz.* 2003;62(1):49-54.
20. Mourthe K, Martins RT. Profile of cholesterol in regular commercial eggs and omega-3 polyunsaturated fatty acids enriched eggs. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2002; 54(4):429-31.
21. USDA. National Nutrient Database for Standard Reference, Release 19 (2007). Disponível em: <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/cgi-bin/list_nut_edit.pl> Acesso em 08 fev 2007.
22. TACO-Tabela Brasileira de Composição de Alimentos/NEPA – UNICAMP-Versão II. Campinas: NEPA-UNICAMP; 2006.
23. Philippi ST. Tabela de composição de alimentos: suporte para decisão nutricional. 2nd ed. São Paulo: Coronário; 2002.

Nutritional value of crustaceans from Lagoone-Estuary Complex Mundaú/ Manguaba-Alagoas

Valor nutritivo de crustáceos do Complexo Estuarino-Lagunar Mundaú/
Manguaba-Alagoas

RIALA6/1137

Giselda M. LIRA^{1*}, Elizabeth A.F.S. TORRES², Rosana A.M. SOARES², Simone MENDONÇA², Mirella F COSTA³, Kelly WB SILVA³, Sarah J.G.B. SIMON³, Katherine M.A. VERAS³

*Endereço para correspondência: ¹Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Alagoas, BR 101, Km 14, Maceió, AL/Brasil, CEP 57072-900. Fone: (082) 3214-1158, fax: (082) 3214-1160. E-mail: gmlira@superig.com.br

² Departamento de Nutrição, Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP/Brasil.

³ Bolsistas de Iniciação Científica – PIBIC/CNPq/UFAL e FAPEAL, Curso de Nutrição, Universidade Federal de Alagoas.

Recebido: 04/07/2007 – Aceito para publicação: 09/11/2007.

ABSTRACT

In order to evaluate the nutritional value of Pilar soft crab (*Callinectes bocourt A.*) and uçá crab (*Ucides cordatus L.*), 20 samples of both crustaceans were collected from lagoone-estuary complex Mundaú/Manguaba, located in the state of Alagoas, Brazil. Results from this analysis showed a high levels of moisture (soft crab – 79.82%; crab 78.85%), proteins (soft crab – 17.71%; crab – 17.99%) and ash (soft crab – 2.18%; crab – 2.06%), and reduced values of lipids (soft crab – 2.78%; crab – 2.57%). Caloric values reached to 96.0 kcal in soft crab and 95.0 kcal in crab. Cholesterol levels were very low, being 34.65 mg/100g in Pilar soft crab and 35.37 mg/100g in crab-uçá. As for fatty acids contents, the Pilar soft crab presented 37.9% of saturated, 23.2% of monounsaturated and 29.9% of polyunsaturated; while uçá-crab presented 30.0% of saturated, 31.4% of monounsaturated and 34.9% of polyunsaturated. In view of these results, both species should be considered a healthy food, and their consumption should be stimulated.

Key words. crustaceans, proximate composition, caloric value, cholesterol, fatty acid.

RESUMO

Com o objetivo de avaliar o valor nutritivo de siri-do-Pilar e caranguejo-uçá foram analisadas 20 amostras de cada crustáceo, adquiridas no complexo estuarino-lagunar Mundaú/Manguaba, localizado no estado de Alagoas, Brasil. Foram detectados elevados teores de umidade (siri – 79,82% e caranguejo 78,85%), proteínas (siri – 17,71% e caranguejo – 17,99%) e cinzas (siri – 2,18% e caranguejo – 2,06%), porém reduzidos valores de lipídios (siri – 2,78% e caranguejo – 2,57%). O valor calórico correspondeu a 96,0 kcal no siri e 95,0 kcal no caranguejo. Os teores de colesterol foram muito baixos, sendo 34,65 mg/100g em siri-do-Pilar e 35,37 mg/100g em caranguejo-uçá. Quanto ao teor de ácidos graxos, para o siri-do-Pilar foram verificados os seguintes valores: 37,9% de saturados, 23,2% de monoinsaturados e 29,9% de poliinsaturados; em caranguejo-uçá foram detectados 30,0% de saturados, 31,4% de monoinsaturados e 34,9% de poliinsaturados. Em vista dos resultados obtidos, as duas espécies de crustáceos podem ser consideradas como alimentos benéficos a saúde, cujo consumo deve ser estimulado.

Palavras-chave. crustáceos, composição centesimal, valor calórico, colesterol, ácidos graxos.

INTRODUCTION

Information on the composition of foods consumed in Brazil is essential for the design of a database adjusted to national reality. The lagoone-estuary complex Mundaú/Manguaba, located in the state of Alagoas, is the habitat of a large variety of fish and crustaceans. Amongst the crustaceans, grujaú soft crab or Pilar soft crab (*Callinectes bocourt* A. Milne-Edwards, 1879) and the uçá-crab (*Ucides cordatus* L. Linnaeus, 1376) are a major feeding source, highly appreciated by both local population and tourists¹.

Pilar soft crab is a species found in shallow water and in mangroves substratum. Inhabits shallow waters of estuaries and mouths of river, supporting little saline and even polluted waters; lodging itself deep in the sand, mud, shells or rocks, from between-tides up to 20 meters of depth. Presents black and brown carapace and legs and chelipeds of light brown color¹.

Uçá-crab is a species found in burrows with over 1 meter of deep in the mangrove substratum. These crabs feed on seaweed and debris produced in the mangrove. Presents yellow and grey carapace and dark brown legs and chelipeds¹.

Uçá crabs are important in the region, both as fishing resources and as a source of income for the thousand of fishermen in the Brazilian coast living around mangroves, and their nutritional quality, includes these crustaceans as an important protein source for human consumption².

According to reviews by Skonberg and Perkins³ although the nutritional composition of several commercially harvested species of crab has been partially characterized, shellfish vary widely in their nutrient content. Researchers have also reported differences in concentrations of moisture, fat, ash, protein and various volatile compounds in meats provenient from different body parts of the blue crab (*Callinectes sapidus*) and in the south east Asian crab (*Charybdis feriatus*).

Connor and Ling⁴ described crustaceans as good sources of polyunsaturated fatty acids, especially serious omega 3 (ω -3), presenting low levels of fatty saturated acids.

Linoleic and ω -linolenic fatty acids, representatives of the ω -6 and ω -3 series, are absolutely essential in human diet. Moreover, polyunsaturated fatty acids contribute for the prevention of coronary and rheumatic illnesses, diabetes and cancer⁵. Docosahexaenoic (DHA), a fatty acid of the omega 3 series, is the greater constituent of the phospholipidic portion of the receiving cells, present in the retina, the organ that possesses the highest amount of DHA, which is also indispensable for adequate brain functions⁶.

Since there is no information on the main chemical constituent of crustaceans in the lagoone-estuary complex Mundaú/Manguaba (Alagoas), this study aims to evaluate the proximate composition, caloric values, cholesterol and cholesterol oxides and fatty acids profile of Pilar soft crab and uçá-crab of the lagoone-estuary complex Mundaú/Manguaba.

MATERIALS AND METHODS

Sample collection and preparation

Twenty samples of grujaú soft crab or Pilar soft crab (*Callinectes bocourt* A.) and twenty samples of uçá-crab (*Ucides cordatus* L.) collected in the lagoone-estuary complex Mundaú/Manguaba in Alagoas were analyzed. The samples of soft crab were acquired in lots, containing about 200g, and the uçá-crabs were acquired living, since edible parts are not sold in the amount needed to compose a lot. Both were collected during the period September 2005 to April 2006.

Soon after the acquisition, the samples of soft crab were conditioned in sterilized plastic bags and kept under refrigeration, while the crabs remained alive. Samples of the crustaceans were led to the Laboratory of Bromatology of the Nutrition College of the Federal University of Alagoas, where the analyses were performed.

Crabs were washed in a container with water and placed in boiling water during 5 to 10 minutes. After cooling, legs were scraped and laundered once more. Meat of both big and small legs and cephalothoraxes was collected.

Analytical determinations

After homogenization, the following determination was performed in three replicates.

Proximate composition

Moisture: determined gravimetrically in greenhouse 105°C (AOAC)⁷.

Ash: obtained by incineration of a known amount of the sample, in muffle 550°C (AOAC)⁷.

Proteins: determined by the Kjeldahl method, to convert results into nitrogen for crude protein were used factor 6,25 (AOAC)⁷.

Total lipids: obtained by cold extraction employed the method of Folch et al.⁸, with aliquots taken for gravimetrical determination.

Carbohydrates: quantified by difference.

Total Caloric Value: calculated by the corresponding caloric coefficients for proteins, carbohydrates and lipids, respectively, 4,4 and 9 kcal/g (Brasil)⁹.

Cholesterol and cholesterol oxides (7 β -OH, 7 α -OH, 7-K and 25-OH) free: extracted by the method of Csallany and Ayaz¹⁰, adapted from Folch et al.⁸, that consisting of adding chloroform: methanol (2:1), washing samples with distilled water, combining laundering waters and extracting with chloroform: methanol (2:1), to combine the not watery phases and to filtered with Na₂SO₄, dried under a nitrogen flow, samples were then resuspended in 3mL of mobile phase (hexane: isopropanol- 97:3) and injected in liquid high efficiency chromatograph.

The stage of injection in liquid chromatograph was carried through in the Laboratory of Bromatology of the Department of Nutrition - Public Health College, USP, São Paulo.

Identification and quantification of cholesterol and oxides composites was performed with UV/visible detector with sweepings of the Shimadzu company (model 10A VP), selecting wave lengths of 206 maximum nm absorption for cholesterol and oxides 25-OH, 7 α -OH and 7 β -OH and 233 nm for oxide 7-K. Standards of cholesterol oxides were obtained from the Steroids company (Wilton, U.S.A.). Isocratic race of 25 minutes was carried through, employing the composed mobile phase for a hexane mixture and isopropanol in ratio 97:3 to a flow of 1mL/min. The mobile phase was filtered in a 0,45 μ m membrane and degassed. For composite separation was chose the column of intermediate phase Luna CN 5 μ of the Phenomenex brand, with 25cm of length. They were injected 20 μ L of sample and five different concentrations of standard cholesterol (of 0,15 the 1,89mg/mL) and of each oxide (4,6 the 230 μ g/mL) analyzed. Cholesterol and cholesterol oxides were monitored at 206nm, while 7-ketocholesterol was monitored at 233nm.

Detection and quantification limits were determined as described by Leite¹¹, using standard solutions (Table 1). Repeatability values were obtained with multiple injections (n=3) of the more diluted point of standard curve. Recovery experiments were performed by Vicente and Torres¹², obtaining the values presented in Table 1.

Profile of fatty acids

Lipoid extracts obtained by the method of Folch were esterified according to Hartman and Lago¹³, regarding acid determination of the composition in fatty acids for chromatography in the gaseous phase and sent to the Laboratory of Bromatology of the Department of Nutrition of the Public Health College at USP, São Paulo, where they were injected in a gas chromatograph. For the identification of the fatty acids, methylic ester standards of fatty acids were employed (37 FAME Mix 47885, Supelco), comparing the retention time of methylic esters of the samples and of the standards. Quantification of fatty acids was made through area normalization, expressing results in the percentage of each acid over the total of fatty acids.

Operational parameters of the equipment are told as follow. Gas Chromatograph Chrompack CP 9002 (Middelburg, Holland), equipped with hair column CiolaWax of 20m, 0.32mm diameter and thickness of 0.25 μ m film. The oven was operated at an initial temperature of 60^oC for two minutes, and the

temperature slope was of 4^oC/min until reaching 141^oC, 3.5^oC until 176^oC, 2^oC/min until reaching 186^oC, and 3.5^oC/min until reaching the final temperature of 240^oC. Injector temperature was of 270^oC and detector temperature was of 300^oC. The dragging gas used was the hydrogen, with flow of 1.9mL/min, reason of division 1:30. A volume of 1 μ L of sample was injected.

Statistical analyses

The Analysis of Variance (ANOVA) was used with the aid of the statistical program Epi-info, version 2002, to a level of significance of 0.05. Whenever variances were not homogeneous, tested for the Qui-square of Bartlett's, the Kruskal-Wallis test was used in the same level of significance, through the same program.

RESULTS AND DISCUSSION

Proximate composition

The results of the centesimal composition of the studied crustaceans are in Table 2.

It can be verified that the crustaceans present amounts of moisture varying from 79.82 g/100g to 78.85g/100g, lower than the ones found by Pedrosa and Cozzolino¹⁴, in raw shrimp (88.34 g/100g) and raw crab (84.42g/100g), in the city of Natal/RN. However, moisture values of the samples are in accordance with the ones found in two studies. Skonberg and Perkins³ studying the composition of nutrients of raw *Carcinus maenus* crab, from the Gulf of Maine (U.S.A.), had verified that moisture content of raw crab leg meat corresponded to 79.0 g/100g. Lourenço et al.¹⁵ analyzing uçá-crab meat (*Ucides cordatus* L.) collected in the cities of the state of Pará (São Caetano de Odivelas and Belém), had detected amounts of moisture corresponding to 79.35g/100g and 77.35g/100g, respectively.

The ash amounts of Pilar soft crab was of 2.18g/100g and of 2.06g/100g in uçá-crab. Skonberg and Perkins³ had found 2.2g/100g of ash in raw crab leg meat (*Carcinus maenus*), a value similar to the ones found in the present study. Lourenço et al.¹⁵ relate percentages of ash superior to those detected in this research for samples of uçá-crab (*Ucides cordatus* L.), 2.69g/100g and 3.60g/100g, in the two analyzed cities. Pedrosa and Cozzolino¹⁴ detected amounts of 1.05g/100g in raw shrimp;

Table 1. Detection and quantification limits (n = 7) for cholesterol (mg) and cholesterol oxides (μ g), recovery % (n = 6) of extraction and quantification methods and repeatability values %.

Component	Detection Limit	Quantification Limit	Recovery (%)	Repeatability (%)
Cholesterol	8.52.10 ⁻⁴	2.84.10 ⁻³	92.8 \pm 2.0	2.76
7-K	0.01	0.02	94.4 \pm 1.7	1.69
25-OH	0.12	0.41	91.2 \pm 1.8	1.27
7 α -OH	0.10	0.33	91.3 \pm 2.2	2.39
7 β -OH	0.03	0.09	91.9 \pm 2.5	0.71

0.71g/100g in raw crab and 1.57g/100g for raw lobster, all inferior to the values found in the present study.

The protein percentages found by Radrosa and Cozzolino¹⁴ in raw crab and shrimp (13.3g/100g and 10.62g/100g, respectively) were lower than the 17.71g/100g and 17.99g/100g detected in this research. Lira et al.¹⁶ had found similar protein amounts for the raw clams sururu (*Mytella falcata*), 17.26g/100g and maçunim (*Anomalocardia brasiliiana*), 17.46g/100g in the city of Maceió-AL. Results present an advantage of these crustaceans for the consumer, since they are a protein source of high biological value.

Skonberg and Perkins³ relate protein content of 16.8g/100g in raw crab leg meat (*Carcinus maenus*), inferior to the one in the current research. Lourenço et al.¹⁵ relate percentages of 14.34g/100g and 17.12g/100g of proteins in samples of uçá-crab (*Ucides cordatus* L.) collected in the cities of São Caetano de Odivelas and Belém-Pará, inferior amounts to the ones detected in this research, mainly regarding the samples obtained in São Caetano de Odivelas. According to the authors, these results can be explained due to the difference between fat amounts.

Lipids percentages presented by Pilar soft crab (2.78g/100g) and of uçá-crab (2.57g/100g) were superior to the ones of raw crab, shrimp and lobster, 0.49g/100g, 0.36g/100g and 0.66g/100g, respectively¹⁴. Bragagnolo and Rodriguez-Amaya¹⁷ had also found lower results than the ones of the crustaceans of this study in various species of shrimp (*Penaeus brasiliensis*, *Penaeus schimitti*, *Macrobrachium rosenbergii*, *Xiphopenaeus kroyeri*), general average of 1.0g/100g. Skonberg and Perkins³ had found 0.5 g/100g of fat in raw crab leg meat (*Carcinus maenus*) and 1.2g/100g when cooked in vapor per 12 minutes. In both situations, values were inferior to the ones of this study. However, results obtained are inferior to the percentages of lipids of raw clams sururu (3.84g/100g), maçunim (2.68g/100g) and unha-de-velho (*Tagelus plebeus*) (2.84g/100g), of the research of Lira et al.¹⁶.

Lourenço et al.¹⁵ reports percentages of 2.59g/100g and 0.59g/100g of gross fat in samples of uçá-crab; the difference between fat amounts, according to authors, must come from the period when collection of the raw material was made, since samples from São Caetano de Odivelas were collected at the beginning of September of 2002, a time where crabs present

considerable fat amounts. The results of the present study are similar to the ones detected in the samples proceeding from São Caetano de Odivelas.

It is worth to mention that Pilar soft crab and uçá-crab can be considered as foods of low fat amount, contributing to human health by reducing the risk of cardiovascular problems.

Regarding caloric value, results varied between 95.0kcal and 96.0kcal. In raw sururu clams, maçunim and unha de velho, values were higher: 107.72kcal, 103.52kcal and 100.52kcal, respectively¹⁶. When comparing the caloric values with those presented by Pedrosa and Cozzolino¹⁴, inferior values to the ones found in this study are observed: raw shrimp (45.72kcal), raw crab (61.93kcal) and raw lobster (91.98kcal). Also Lourenço et al.¹⁵ had found inferior caloric values to the ones present in this study 81.92kcal and 78.65kcal in samples of uçá-crab.

Free cholesterol

The crustaceans had presented low cholesterol amounts, which represents an important dietary factor for the health of human beings regarding prevention of atherosclerosis coronary illness.

Average cholesterol amounts corresponded to 34.65mg/100g in Pilar soft crab and 35.37mg/100g in uçá-crab. These values are lower than those reported by Skonberg and Perkins³ for raw crab leg (*Carcinus maenus*) 57.4mg/100g and crab leg of the same species cooked in vapor for 12min (64.8mg/100g) and are also inferior to the cholesterol values cited in these authors' revision. The cholesterol levels obtained by Bragagnolo and Rodriguez-Amaya¹⁷ varied from 114mg/100g in large pink shrimp (*Penaeus brasiliensis*) to 139mg/100g in small prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) with a mean of 127mg/100g.

Cholesterol amounts detected in the crustaceans are quite lower than the limit recommended by The National Cholesterol Education Program¹⁸ and IV Brazilian Lines of Direction on Dyslipidemias¹⁹ recommending a daily cholesterol intake of 300mg /day at the most.

Cholesterol oxides had not been detected. The heat is the major responsible for its generation, mainly in extensively processed food. In this study, the crabs were not exposed to abusive conditions during the preparation of the samples.

Table 2. Proximate and caloric composition of crustaceans of the lagoone-estuary complex Mundaú/Manguaba-AL.

Proximate Composition (g/100g)*	Soft crab	Crab
Moisture	79.82 ^a (±2.44)	78.85 ^a (±1.07)
Proteins	17.71 ^a (±3.01)	17.99 ^a (±1.66)
Lipids	2.78 ^a (±0.71)	2.57 ^a (±0.38)
Ash	2.18 ^a (±0.46)	2.06 ^a (±0.53)
Calories (kcal)	96	95

*Average of 20 samples analyzed in three replicates, with deviation standard between parentheses. Same letters in the line for mean values do not show statistical significant differences (p < 0.05).

Moura et al.²⁰ evaluated the effects of boiling and deep-frying on the cholesterol oxidation in pink-shrimp samples (*Penaeus brasiliensis* and *Penaeus paulensis*) and found concentrations 7-Keto that varied from 0.185 to 0.366µg/g, with an average value of 0.230µg/g. These authors concluded that the reduction of free cholesterol and 7-Keto concentrations in processed pink-shrimp was related to elution of these compounds by the cooking medium, i.e., water in boiling and oil in frying.

Sampaio et al.²¹ analyzed cholesterol oxides in salty dry shrimp and found 7α-OH, 7β-OH (predominant), 7-Keto and 25-OH in amounts that varied from 4.52 µg/g to 77.30µg/g. The shrimp passes through several processing stages: immersion in brine, drainage, drying under the direct incidence of the sun-light, addition of salt and boiling. In this process, occurs an abusive condition that may collaborate to formation of cholesterol oxidation products and shrimps are rich in polyunsaturated fatty acids and cholesterol, therefore possessing great potential for the cholesterol oxides formation.

Profile of fatty acids

In Pilar soft crab, twelve (12) fatty acids were detected (Table 3), the predominant being: palmitic acid (C16:0) 24.3%; oleic acid (C18:1 ω9) 13.9%; eicosapentaenoic (EPA - C20:5 ω3) 10.9%; stearic acid (C18:0) 9.4%. Also were found polyunsaturated acid: linoleic (C18:2 ω6) 6.9%; palmitoleic (C16:1 ω7) 6.0%; α-Linolenic (C18:3 ω3) 5.2% and docosahexaenoic (DHA - C22:6 ω3) 2.8%.

In the fatty acids profile of the uçá-crab (Table 2), eight were identified, being the main ones: α oleic (C18:1 ω9) 26.1%; palmitic (C16:0) 21.0%; linoleic (C18:2 ω6) 14.8%; stearic

(C18:0) 9.0%; eicosapentenoic (EPA - C20:5 ω3) 8.6% and α-linolenic (C18:3 ω3) 5.4%.

Results reveal a positive aspect in the profile of the fatty acids of these crustaceans, since they present essential fatty acids.

Amongst the saturated fatty acids, the predominance of the palmitic and stearic have been observed in the two species of crustaceans, which had presented similar values statistically (p < 0,05).

Palmitic acid is presented as dietary risk factor in the development of atherosclerotic coronary illness⁶. The elevated percentile of palmitic acid found in Pilar soft crab and in the uçá-crab, had also been found by Lira et al.¹⁶, in raw clams: sururu (27.06%), maçunim (22.45%), unha-de-velho (26.75%) and in lesser ratio for Bragagnolo and Rodriguez-Amaya²² in the pink shrimp (14.9%).

The saturated fatty acid stearic (C18:0) possesses hypocholesterolemic effect, it quickly becomes the oleic acid in the organism after its ingestion, not affecting the plasmatic cholesterol²³. Bragagnolo and Rodriguez-Amaya²² had found for the pink shrimp 8.6% of estearic, inferior value as the ones of Pilar soft crab and uçá-crab.

In the uçá-crab they had detected the double of monounsaturated oleic fatty acid and fatty acid linoleic polyunsaturated ω-6, when compared with the results of Pilar soft crab.

According to the revision of Lira et al.²⁴, monounsaturated oleic acid (C18:1), of the omega 9 family, has been pointed as hypolipidemic, diminishing lipoproteins of low density (LDL), presenting hypocholesterolemic and protective effect against the development of atherosclerotic coronary illness. It has a direct correlation between the incidence and gravity of atheromatotic injuries and plasmatic concentrations of LDL.

Table 3. Fatty acids profile (%) of crustaceans of the lagoone-estuary complex Mundaú/Manguaba-AL.

Fatty Acids	Pilar soft crab*	Uçá-crab*
Myristic (C14:0)	2.6 (±1.28)	—
Palmitic (C16:0)	24.3 ^a (±2.45)	21.0 ^a (±3.69)
Palmitoleic (C16:1) (ω 7)	6.0 ^a (±1.45)	5.3 ^a (±2.48)
Heptadecanoic (C17:0)	1.6 (±1.05)	—
Stearic (C18:0)	9.4 ^a (±0.72)	9.0 ^a (±1.02)
Oleic (C18:1) (ω 9)	13.9 ^a (±3.04)	26.1 ^b (±3.68)
Elaidic (C18:1)(ω9)	3.3 (±0.86)	—
Linoleic (C18:2) (ω6)	6.9 ^a (±2.44)	14.8 ^b (±3.15)
α linolenic (C18:3)(ω3)	5.2 ^a (±4.12)	5.3 ^a (±1.36)
Eicosatrienoic (C20:3) (ω3)	4.6 ^a (±1.87)	6.2 ^a (±1.11)
Eicosapentenoic (C20:5) (ω3)	10.9 ^a (±2.60)	8.6 ^a (±2.30)
Docosahexenoic (C22:6) (ω3)	2.3 (±2.38)	—
Not identified	8.9	3.7

*Average of 14 samples analyzed in two replicates, with standard deviation between parentheses.

Same letters in the line for mean values do not show statistical significant differences (p < 0.05).

— Not detected.

Bragagnolo and Rodriguez-Amaya²² had found 7.9% of acid oleic for the pink shrimp, inferior value to the ones of Pilar soft crab and uçá-crab, evidencing the advantages of these crustaceans.

Lira et al.¹⁶ had found inferior amounts of linoleic acid in raw sururu (4.47%), raw unha-de-velho (4.64%) and raw maçunim (3.63%). Bragagnolo and Rodriguez-Amaya²² report inferior values in pink shrimp (1.5%). These results demonstrate a positive plus by the nutritional point of view of the analyzed crustaceans, mainly of the crab-uçá.

Similar concentrations were detected in the two studied species (5.3 and 5.2%), polyunsaturated fatty acid \approx linolenic ($\omega 3$). Lira et al.¹⁶ had found 2.22% of this fatty acid for raw sururu, 1.13% for raw maçunim and 1.27% for unha-de-velho.

Polyunsaturated fatty acid EPA ($\omega 3$) was detected in more elevated percentage in soft crab, differing statistically from crab ($p < 0,05$), however, being inferior to the amounts of pink shrimp (18.7%), in the study of Bragagnolo and Rodriguez-Amaya²². Lira et al.¹⁶ detected percentages of EPA of 8.67% in raw sururu, 6.76% in maçunim, and 6.12% raw unha-de-velho.

The biological effect of essential fatty acids depends on the acid reason between the families $\omega 6/\omega 3$ present in the phospholipids that constitute the membranes. The Japan Society of Lipid Nutrition recommends a maximum of 4:1 for the reason $\omega 6/\omega 3$ for healthful adults and of 2:1 in the prevention of chronic illnesses in aged people²⁵. In the present work, the ratio of polyunsaturated fatty acids $\omega 6/\omega 3$ found was of 0.3:1 for Pilar soft crab and 0.74:1 for the uçá-crab.

Total percentages of fatty acids of the analyzed crustaceans evidence a positive nutritional factor of the uçá-crab in relation to Pilar soft crab (Table 4): saturated (30.0%), monounsaturated (31.4%) and polyunsaturateds (34.9%). Bragagnolo and Rodriguez-Amaya²² tell saturated

values of 30.2%; 22.6% of monounsaturated and 45.0% of polyunsaturated for pink shrimp.

CONCLUSIONS

The samples of Pilar soft crab and uçá-crab presented high levels of moisture, proteins and ash and reduced values lipidic and caloric.

The crustaceans presented low cholesterol basis, substantially below the recommended limit of 300mg/dia.

The main fatty acids found in the samples of Pilar soft crab were: Palmitic (C16:0), Oleic (C18:1 $\omega 9$), EPA (C20:5 $\omega 3$) and Stearic (C18:0); soft crab can also be considered an source of polyunsaturated fatty acids linoleic (C18:2 ω -6) α -linolenic (C18:3 $\omega 3$) and DHA (C22:6 $\omega 3$). In the samples of uçá-crab the main fatty acids found had been: oleic (C18:1 $\omega 9$); Palmitic (C16:0); Linoleic (C18:2 $\omega 6$); Stearic (C18:0) and EPA (C20:5 $\omega 3$). The uçá-crab, also can be considered an alimentary source of polyunsaturated fatty acid α -linolenic (C18:3 $\omega 3$).

The profile of fatty acids of uçá-crab is slightly more favorable. However, the two species can be seen as healthy foods and their consumption may be stimulated.

Results obtained are very important both from economical and nutritional points of view and will contribute for higher consumption of these crustaceans.

ACKNOWLEDGEMENTS

To the Foundation of Research Support of the State of Alagoas (FAPEAL) for the financial aid and the Scientific Initiation scholarships granted to the pupils; to the PIBIC/CNPq/UFAL for the Scientific Initiation scholarships granted to the pupils.

Table 4. Composition of fatty acids present in crustaceans of the lagoon-estuary complex Mundaú/Manguaba-AL.

Fatty Acids	Pilar soft crab*	Uçá-Crab*
Σ Saturated (%)	37.9	30.0
Σ Monounsaturated (%)	23.2	31.4
Σ Polyunsaturated (%)	29.9	34.9
Reason $\omega 6/\omega 3$	0.3:1	0.74:1
$\Sigma \omega 3$	23.0	20.1
$\Sigma \omega 6$	6.9	14.8

*Average of 14 samples analyzed in two replicates.

REFERENCES

1. Calado TCS, Sousa EC. Crustáceos do Complexo Estuarino-Lagunar Mundaú/Manguaba - Alagoas. 1^o ed. Maceió: FAPEAL; 2002.
2. Rodrigues AMT. A exploração do caranguejo *Ucides cordatus* (Decapoda: Ocypodidae) e o processo de gestão participativa para a normatização da atividade na região sudeste-sul do Brasil. *Bol Inst Pesca*. 2000; 26(1): 63-78.
3. Skonberg DI, Perkins BL. Nutrient composition of green crab (*Carcinus maenas*) leg meat and claw meat. *Food Chem*. 2002; 77, 401-4.
4. Connor WE, Ling DS. The effect of shellfish in the diet upon the plasma lipid levels in humans. *Metabolism*. 1982; 31:1046- 51.
5. Roos NM, Siebelink E, Botts ML, Van Tol A, Schouten EG, Katan MB. Trans monounsaturated fatty acid and saturated fatty acids have similar effects on postprandial flow-mediated vasodilatoin. *Eur J Clin Nutr*. 2002; 56(7):674-9.
6. Curi R, Pompéia C, Miyasaka K, Procópio J. Entendendo as gorduras – os ácidos graxos. 1^a ed. São Paulo, Ed. Manole Ltda; 2002.
7. AOAC - Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis, 17th ed. Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, MD, USA. 2000.
8. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem*. 1957; 226:497-507.
9. Brasil. Leis, Decretos, etc. Portaria n^o 33/98 da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília - DF 30 mar. 1998. Seção I, n.º 60- E, p. 5-6. Adota os valores constantes das tabelas do anexo desta portaria como níveis de IDR (Ingestão Diária Recomendada) para as vitaminas, minerais e proteínas.
10. Csallany AS, Ayaz KL. Quantitative determination of organic solvent soluble lipofrescin pigments in tissues. *Lipids*. 1976; 11(11):412-17.
11. Leite F. Sensibilidade, seletividade e limites de detecção e quantificação. In: Leite F. Validação em análises químicas. 3^a ed. Campinas: Editora Átomo, 1998. p.67-9.
12. Vicente SJV, Torres EAFS. Formation of four cholesterol oxidation products and loss of free lipids, cholesterol and water in beef hamburgers as a function of thermal processing. *Food Control*. 2007;(18)63-68.
13. Hartman L, Lago BCA. Rapid preparation of fatty methyl esters from lipids. *Lab Pract*. 1973;22:475-77.
14. Pedrosa LFC, Cozzolino SMF. Composição centesimal e de minerais de mariscos crus e cozidos da cidade de Natal/RN. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2001;21(2):154-7.
15. Lourenço LFH, Oliveira ML, Pinto CMC, Pereira DXP. Análises físico-químicas e microbiológicas de carne de caranguejo-uçá *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763), comercializada nos municípios de São Caetano de Odivelas e Belém, PA. *Hig Aliment*. 2006; 20(142):90-5.
16. Lira GM, Mancini Filho J, Sant'ana LS, Torres RP, Oliveira AC, Omena CMB. et al. Perfil de ácidos graxos, composição centesimal e valor calórico de moluscos crus e cozidos com leite de coco da cidade de Maceió-AL. *Rev Bras Ciênc Farm*. 2004;40(4):529-37.
17. Bragagnolo N, Rodriguez-Amaya DB. Total lipid, cholesterol, and fatty acids of farmed freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) and wild marine shrimp (*Penaeus brasiliensis*, *Penaeus schmitti*, *Xiphopenaeus kroyeri*). *J Comp Anal*. 2001;14:359-369.
18. National Cholesterol Education Program. Third Report of the National Cholesterol Education Program Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation*. 2002; 106: 3143-3421.
19. IV Diretriz Brasileira Sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose do Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. *Arq Bras Cardiol*. 2007;88(Supl 1).
20. Moura AFP, Tenuta-Filho A. Efeito do processamento sobre os níveis de colesterol e 7-cetocolesterol em camarão-rosa. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2002;22(2):117-21.
21. Sampaio GR, Bastos DHM, Soares RAM, Queiroz YS, Torres EAFS. Fatty acids and cholesterol oxidation in salted dried shrimp. *Food Chem*. 2006 95(2):344-51.
22. Bragagnolo N, Rodriguez-Amaya D. Otimização da determinação de colesterol por CLAE e teores de colesterol, lipídeos totais e ácidos graxos em camarão rosa (*Penaeus brasiliensis*). *Ciênc Tecnol Aliment*. 1997;17(3):275-80.
23. Bonanome AMD, Grundy SM. Effect of dietary stearic acid on plasma cholesterol and lipoprotein levels. *New England J Medicine*. 1988;318(19):1244-47.
24. Lira GM, Mancini Filho J, Torres RP, Oliveira AC, Vasconcelos AMA, Omena CMB. et al. Composição centesimal, valor calórico, teor de colesterol e perfil de ácidos graxos da carne de búfalo (*Bubalis bubalis*) da cidade de São Luiz do Quitunde-AL. *Rev Inst. Adolfo Lutz*. 2005;64(1):31-8.
25. Uauy R, Mena P, Valenzuela A. Essential fatty acids as determinants of lipids requeriments in infants, children and adults. *European J Clin Nutrition*. 1999;53(1):66-7.

Otimização e validação de método farmacopeico para verificar possíveis desvios de qualidade de matérias primas e cápsulas manipuladas contendo hormônios tireoidianos

Optimization and validation of the pharmacopeial method for verifying the potential quality deviations of drug raw materials and compounded oral capsules of thyroid hormones

RIALA6/1138

Blanca E.O. MARKMAN^{1*}, Maria Regina W. KOSCHTSCHAK¹, Mariângela T. AURICCHIO²

*Endereço para correspondência: ¹Instituto Adolfo Lutz, Seção de Antibióticos. Av. Dr. Arnaldo 355, CEP 01246-902. São Paulo, SP/Brasil. Fone: 3068-2928. E-mail: bmarkman@ial.sp.gov.br.

²Instituto Adolfo Lutz - Diretoria do Serviço de Medicamentos. Av. Dr. Arnaldo 355, CEP 01246-902. São Paulo, SP/Brasil. Recebido: 06/02/2007 – Aceito para publicação: 26/09/2007

RESUMO

Os hormônios tireoidianos levotiroxina (T4) e liotironina (T3), utilizados no hipotireoidismo, controlam a velocidade das funções químicas corpóreas. Os objetivos deste estudo foram otimizar e validar a técnica de CLAE-UV a partir da descrita na farmacopéia americana 28a. ed., para determinar T3 e T4 com um fator de resolução igual ou maior que 5 entre o maior componente e seu contaminante, e aplicá-la com eficiência na verificação da qualidade de formulações farmacêuticas manipuladas. A otimização do método foi alcançada com a fase móvel de 52:50 (água acidificada com ácido fosfórico: acetonitrila), temperatura 27°C e fluxo de 1,6 mL. min⁻¹, empregando-se a coluna de 250 x 4,6mm constituída de grupos nitrila ligados quimicamente a partículas de sílica porosa de 3 a 10µm e detecção em 238nm. O número de pratos teóricos acima de 8500 e a resolução de 5,12, indicam excelente eficiência do sistema cromatográfico otimizado. Foram detectados graves desvios de qualidade nas cápsulas manipuladas de T3 e ou T4, pois foram encontrados valores de super-dosagem que levaram os pacientes a internação hospitalar e mesmo a óbito por intoxicação causada por esses hormônios. Os resultados obtidos expõem as limitações técnicas dos processos de manipulação, assim como a ausência do controle de qualidade do produto acabado, o uso desses medicamentos constitui um risco sanitário.

Palavras-chave. levotiroxina, liotironina, CLAE, cápsulas manipuladas, validação.

ABSTRACT

Levothyroxine (T4) and Liothyronine (T3) have been used for hypothyroidism treatment, and these drugs control the speed of corporeal chemical functions. The present study aimed to optimize and validate the methodology described in United States Pharmacopeia 28 for T3 and T4 determination by means of HPLC-UV, in order to make it suitable for concomitant evaluation for assessing the quality of in compounded medicines. Optimization was achieved by using acidified water (phosphoric acid : acetonitrile) 52:50, in temperature at 27° C and flow of 1.6 mL min⁻¹, and 250 x 4.6mm column constituted by nitriles group bounded to 3 to 10µm porous silica particles, and detection at 238nm. The number of theoretical plates was 8500 and the obtained resolution factor was 5.12, which showed the efficiency of chromatography conditions. When this methodology was applied for testing the content uniformity in T3 and T4 compounded capsules, quality deviations were detected. The super dosage of active drug substances was one of the found deviations. Inadequate and high doses of active drugs as hormones are harmful to the patients, leading to be hospitalized, and even to death owing to drug intoxication mainly with narrow therapeutics windows drugs. The data observed in the present study demonstrate the occurrence of technical limitations in compounding pharmacy, and also a lack of appropriate quality control.

INTRODUÇÃO

Os medicamentos manipulados em farmácias surgiram como opção de terapia personalizada, porém o uso difundido deste tipo de medicamento traz dificuldades do ponto de vista da metodologia de análise, já que os compêndios oficiais, tanto o nacional como os internacionais, não contemplam monografias voltadas para medicamentos desta natureza.

As limitações técnicas para o controle do processo de manipulação e do controle físico-químico do produto acabado, na farmácia de manipulação, podem levar a desvios de qualidade significativos e com conseqüências importantes.

Os hormônios tireoidianos, bem como os hormônios de uma maneira geral, integram a categoria de medicamentos de baixa dosagem de princípio ativo. A levotiroxina e liotironina (Figura 1) secretados pela glândula tireóide, controlam a velocidade das funções químicas corpóreas, atuando no metabolismo de duas maneiras, pelo aumento de síntese protéica e do consumo de oxigênio pelas células^{1,2}. Desordens da tireóide são comuns, resultando em hipertireoidismo com produção excessiva de hormônios decorrente de várias doenças entre elas a doença de Graves, ou hipotireoidismo com pequena produção de hormônios^{1,2,3,4}.

O protocolo terapêutico do hipotireoidismo estabelece a reposição hormonal preferencialmente na forma sintética de levotiroxina sódica (T4). Quando são necessários resultados rápidos é empregada a liotironina sódica (T3). A mistura de T3 e T4 também é indicada^{1,2,3,4}.

A análise de medicamentos manipulados requer ajustes e adaptações das condições analíticas preconizadas nas monografias farmacopeicas porque, em geral, trata-se de formulações farmacêuticas em apresentações não contempladas nestes compêndios. Estas adequações podem ser mais ou menos significativas em relação ao método descrito alterando alguns parâmetros cromatográficos e, conseqüentemente, o método deverá ser validado.

A literatura reporta várias técnicas para a identificação e quantificação de levotiroxina e liotironina em formulações

farmacêuticas, matérias primas, e fluidos biológicos. A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) empregando diferentes detectores, ultravioleta^{5,6,7,8,9,10}; eletroquímico¹¹, espectrometria de massa^{11,12}, por análise diferencial pulso polarográfica¹³, imunoensaio com fluorescência polarizada (FPIA)¹⁴, radioimunoensaio¹⁵ e por quimioluminescência^{16,17}.

O método escolhido para a avaliação dos hormônios tireoidianos está descrito na Farmacopéia Americana 28ª Ed (USP-28)⁹ utilizando CLAE-UV, o qual estabelece que o fator de resolução entre T3 e T4 do sistema cromatográfico não deve ser menor que cinco e para que este requisito fosse atendido foram necessários ajustes da composição da fase móvel, fluxo e temperatura.

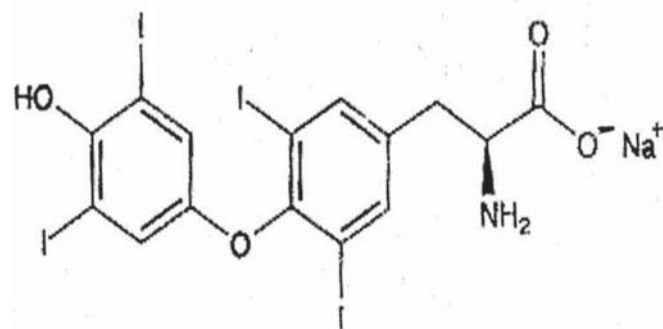
Considerando-se a importância da reposição hormonal com T3 ou T4 e a gravidade das queixas de desvios de qualidade de medicamentos manipulados a base destes hormônios, apresentados pelo Sistema de Vigilância Sanitária como responsáveis por intoxicações, internações até óbitos, foram objetivos deste trabalho otimizar e validar a metodologia por CLAE-UV da USP-28⁹ para estes fármacos, com o intuito de melhorar o fator de resolução entre o maior componente e seu contaminante e aplicá-la com eficiência para matérias-primas e formas farmacêuticas manipuladas.

A validação do método foi de acordo com as recomendações da USP 28¹⁸, ICH¹⁹, RDC N° 10 de 2001 da ANVISA/MS²⁰ e INMETRO²¹.

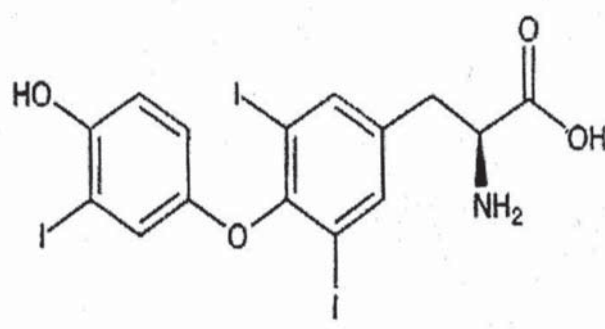
MATERIAL E MÉTODOS

Padrões, Reagentes e Amostras

Substâncias químicas de referência: liotironina e levotiroxina de procedência da Farmacopéia Americana (USP). Reagentes: acetonitrila grau HPLC da Merck®, ácido fosfórico p.a. Merck®, unidade filtrante HV em PV com membrana DU Rapore 0,45µm de poro, 13mm não estéril, Milipore®. Amostras: cápsulas duras de T3 e T4, cápsulas com formulação para emagrecimento, sache, matérias primas concentradas



Levotiroxina



Liotironina

Figura 1. Estruturas químicas de Levotiroxina sódica (T4) e Liotironina (T3).

ediluídas de T3 e T4, placebo constituído de granulado com revestimento e corante azul procedente da Baldacci.

Equipamento

O equipamento HPLC Shimadzu Liquid Chromatography série LC-10A/VP, (Tokyo, Japan) foi testado e certificado pela Sinc do Brasil Instrumentação Científica Ltda, segundo os protocolos de verificação de desempenho da Shimadzu Scientific Instruments, protocolos de verificação das especificações de fábrica que a Shimadzu Corporation (Japão) proporciona, especificações e procedimentos emitidos pela N.I.S.T. O HPLC compreende uma bomba LC-10AD-VP, um detector UV-Vis SPD-10 AV-VP em 238nm, um forno CTO-10 AC-VP a temperatura de 27°C, um injetor Rheodyne (modelo 7725 I) com injeção manual e alça de 20µL, uma coluna empacotada com sílica quimicamente ligada a grupos nitrila - L10 (partículas de 5µm e 250X4,6 mm Lichrospher da Merck®) de acordo com a USP-28⁹. Os cromatogramas foram processados pelo sistema controle SCL-10 A-VP. A fase móvel constituída de água acidificada com ácido fosfórico, (0,5mL para 1000mL): acetonitrila (52:50), era preparada e filtrada diariamente em membrana de 0,45µm de MF celulose

regenerada da Sartorius (Goettingem-Germany). O diluente utilizado era a fase móvel. A vazão era de 1,6mL.min⁻¹.

Preparo das Soluções

As soluções dos padrões, excipientes para comprimidos revestidos com corante utilizados como brancos para a determinação do ruído e teste de recuperação, na validação para T3 e T4, foram pesados e diluídos adequadamente com o diluente. Os conteúdos individuais das cápsulas foram diluídos adequadamente, filtrados em membrana de 22µm e 20µL dessas soluções foram injetadas no sistema cromatográfico.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Teste de Adequabilidade do Sistema

Esse teste foi utilizado para verificar que a resolução e repetibilidade do sistema cromatográfico otimizado são adequadas para as análises a serem realizadas. A Tabela 1 expressa os resultados da aplicação ao item recuperação do método otimizado do teste de adequabilidade, apresentando os parâmetros cromatográficos obtidos.

Tabela 1. Resultados do teste de adequabilidade de sistema cromatográfico, segundo USP 28 aplicado ao item recuperação do método otimizado, nas condições cromatográficas: fase móvel constituída de água acidificada com ácido fosfórico, (0,5mL para 1000mL): acetonitrila (52:50), coluna constituída de grupos nitrila ligados quimicamente a partículas de 3 a 10µm de sílica porosa, e 250 x 4,6mm, detecção em 238nm, fluxo de 1,6mL.min⁻¹ e temperatura de 27°C.

Parâmetros cromatográficos	Levotiroxina	Liotironina
Assimetria		
Média	1,17	1,18
Baixo	1,13	1,14
Alto	1,22	1,23
Desvio padrão relativo	2,70%	2,67%
Fator de capacidade		
Média	10,99	8,66
Baixo	10,98	8,64
Alto	11,02	8,68
Desvio padrão relativo	0,13%	0,16%
Número de pratos teóricos		
Média	9140,64	8895,74
Baixo	9008,51	8704,34
Alto	9264,08	9083,61
Desvio padrão relativo	0,92%	1,14%
Tempo de retenção		
Média	11,03	8,88
Baixo	11,05	8,69
Alto	11,08	8,91
Desvio padrão relativo	0,12%	0,14%
Resolução		
Média	5,12	
Baixo	5,09	
Alto	5,16	
Desvio padrão relativo	0,39%	

Validação

Limites de detecção e quantificação

Os ruídos das linhas de base foram determinados com os excipientes e os limites de detecção (LOD) foram estabelecidos na razão de 3:1 de sinal para ruído, sendo aceito um desvio padrão relativo de < 15%. Os valores individuais determinados foram: 20 e 30ng.mL⁻¹, para liotironina e levotiroxina, respectivamente.

Os limites de quantificação (LOQ) foram determinados pelo critério de 3 x LOD com aceitação de um desvio padrão relativo de < 2%. Os valores determinados foram: 60 e 80ng.mL⁻¹, para liotironina e levotiroxina, respectivamente.

Exatidão

De acordo com a recomendação do ICH²⁰ a exatidão foi determinada pela medida de três níveis de concentrações em triplicatas independentes, de cada hormônio adicionado ao excipiente em concentrações entre: 4,034 e 3,80µg.mL⁻¹, (nível I, 50 %); 8,048 e 7,612µg.mL⁻¹ (nível II, 100%); 12,072 e 11,419µg.mL⁻¹ (nível III, 150 %) para levotiroxina e liotironina respectivamente. Os valores encontrados para a recuperação nos três níveis foram: 98,52 a 102,71% e 99,32 % a 101,12, com desvios padrões relativos de

1,63%-2,10%-0,64% e 1,51%- 0,89%-1,63% para levotiroxina e liotironina respectivamente.

Precisão

De acordo com as recomendações do FDA as precisões foram determinadas por análises de replicatas (N=9) de amostras adicionadas ao placebo nas concentrações: 8,04 e 7,61µg.mL⁻¹ para levotiroxina e liotironina. Os desvios padrões relativos (%RSD) obtidos foram de: 2 % e 0,89 %, respectivamente.

Linearidade

As linearidades do método proposto foram determinadas com a utilização de 5 concentrações diferentes para T3 e T4. As faixas de 4 a 20µg.mL⁻¹ foram estabelecidos através do procedimento analítico, para T3 e T4. A plotagem da representação gráfica das áreas dos picos versus concentração originaram curvas de calibração lineares, com coeficientes de correlação de 0,9996 e 0,9995, inclinação das retas de 2,12353e⁰⁰⁵ e 2,04222e⁻⁰⁰⁵ e intersecção das retas de 0,142626 e 0,126505 para levotiroxina e liotironina, respectivamente.

O método otimizado e validado foi aplicado às amostras constituídas de cápsulas, sachê, e matérias primas de hormônios tireoidianos provenientes de farmácias de manipulação.

Tabela 2. Resultados da determinação do teor e do ensaio limite do contaminante, de cápsulas, sachê e matérias primas de T3 e ou T4 provenientes de farmácias de manipulação, obtidos com a metodologia otimizada e validada, nas seguintes condições cromatográficas: fase móvel constituída de água acidificada com ácido fosfórico (0,5mL para 1000mL): acetonitrila (52:50), coluna de 250x4,6mm constituída de grupos nitrila ligados quimicamente a partículas de 3 a 10µm de sílica porosa, detecção em 238nm, fluxo de 1,6mL.min⁻¹, e temperatura de 27°C.

VISAS Procedência	Apresentação/Teor declarado em µg ou diluição	Teor encontrado em µg/cp e % em relação ao teor declarado	Ensaio limite de T3 e ou T4 em %
Franca/SP	Cp T4-100	T4- 897 (897%)	T3-0,38%
Campinas/SP	Cp T4-50	T3- 411 (822%)	T4-2,08%
Franca/SP	Cp T4-100	T4- 8.230 (8.230%)	T3-0,30%
São Paulo/SP	Cp T3-25	T3- 1.046 (4.184 %)	T4-0,38%
Campo G/MT	Cp T3-20 +T4-20	T3- 18,81 (94%) T4- 2.276 (11.382%)	-
Cuiabá/MT	Cp T3-50	T3- 38,72 (77,44%)	T4-0,31%
São Carlos/SP	Cp T3-75	T3- 567,92 (757%)	T4-0,29%
Guarulhos/SP	Cp T4-200	T4- 84,98 (42,49%)	T3-0,36%
SB Campo/SP	Cp T4-100	T4- 81 (81%)	-
São Paulo/SP	Sachê ND	T4- 4.242	-
São Carlos/SP	MP T3-1:100	T3- 0,45:100 (45%)	T4-0,2%
Franca/SP	MP T4- ND	T4-10:100	T4-0,1%
Franca/SP	MP T4-1:100	T4-1,1:100 (109%)	T3-0,34%
Bauru/SP	MP T3-1:100	T3-0,14:100 14,7%	T4-0,40%
São Paulo/SP	MP ND	T4-97%	T3-0,31%

VISAS= Vigilâncias sanitárias municipais; cp= cápsula; MP= matéria prima; ND= não declarado; µg=microgramas; 1:100 =diluição 1 parte para 100 partes; µg/cap=microgramas por conteúdo de cápsula; valor de referência do ensaio limite de T3= até 2% em relação ao valor encontrado de T4; valor de referência do ensaio limite de T4= até 4% em relação ao valor encontrado de T3.

Tabela 3. Resultados da determinação de uniformidade de conteúdo das cápsulas de T3 e ou T4 provenientes de farmácias de manipulação, obtidos com a metodologia otimizada e validada, nas seguintes condições cromatográficas: fase móvel constituída de água acidificada com ácido fosfórico, (0,5mL para 1000mL): acetonitrila (52:50), coluna de 250x4,6mm constituída de grupos nitrila ligados quimicamente a partículas de 3 a 10µm de diâmetro de sílica porosa, detecção em 238nm, fluxo de 1,6mL.min⁻¹, e temperatura de 27°C.

VISAS Procedência	Apresentação/ Teor declarado em µg	Uniformidade de Conteúdo e desvio padrão relativo (DPR%)
Franca/SP	Cp T4-100	Entre 86 e 8.389% com DPR% 197%
Campinas/SP	Cp T4-50	Entre 673 e 973% com DPR% 12,07%
Franca/SP	Cp T4-100	Entre 7.320 e 8.995% com DPR% 8,59%
São Paulo/SP	Cp T3-25	Entre 3.920 e 4.736% com DPR% 6,71%
Campo G/MT	Cp T3-20 + T4-20	Entre 90 e 105% com DPR% 17,32%
Cuiabá/MT	Cp T3-50	Entre 67 e 96% com DPR% 14%
São Carlos/SP	Cp T3-75	Entre 733 e 1425% com DPR% 20,28%
Guarulhos/SP	Cp T4-200	Entre 35 e 73% com DPR% 26%
SB Campo/SP	Cp T4-100	-

Visas= Vigilâncias sanitárias municipais; Cp= cápsula; - = não determinado; Valor de referência da uniformidade de conteúdo: cada uma das dez unidades testadas deve conter entre 85 a 115% do teor declarado, com desvio padrão relativo (DPR%) $d \leq 6\%$.

Os compêndios oficiais estabelecem limites para a presença de T3 em formulações de T4 e limites para a presença de T4 em formulações de T3, que são considerados contaminantes, respectivamente.

Foram realizados vários experimentos como alterações da composição da fase móvel de 60:40 (água acidificada com ácido fosfórico: acetonitrila), do fluxo de 1,5ml.min⁻¹ e temperatura 25°C para otimizar os parâmetros experimentais com o intuito de conseguir uma separação cromatográfica adequada

entre o maior componente e seu contaminante. A otimização do método farmacopeico foi alcançada com o aumento da proporção de acetonitrila na fase móvel de 40 para 50 tornando-a menos polar, com a elevação da temperatura para 27°C e aumento do fluxo para 1,6ml.min⁻¹, estas alterações provocarão aumento do tempo de retenção relativo de T3 e T4 em relação ao método original da USP-28, porém permitiram uma resolução de 5,12 (Figura 2) entre o maior componente e seu contaminante, conforme exigência do método oficial da USP-28.

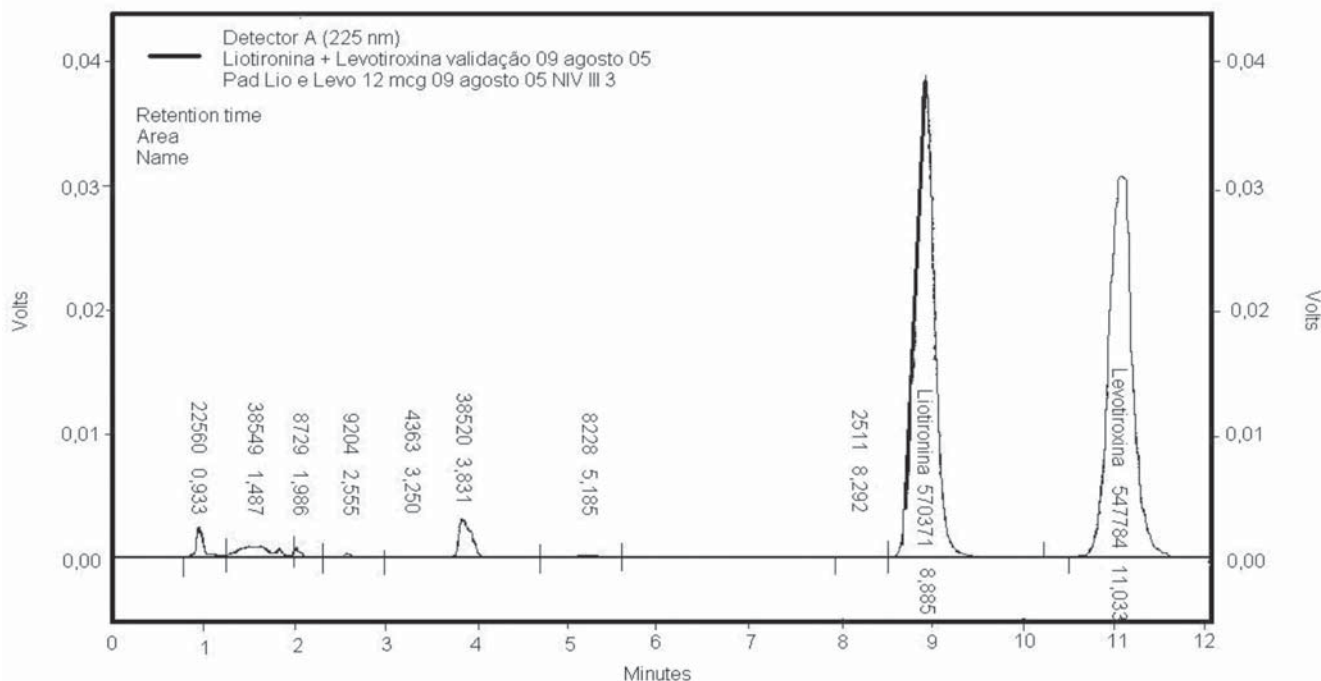


Figura 2. Cromatograma apresentando a separação de Liotironina(T3) e Levotiroxina (T4) no sistema cromatográfico otimizado com fase móvel constituída de: água acidificada com ácido fosfórico (0,5mL para 1000mL): acetonitrila (52:50), coluna de 250x4,6mm com grupamentos nitrila ligados quimicamente a partículas de 3 a 10µm de sílica porosa, detecção em 238 nm, fluxo de 1,6 mL.min⁻¹, e temperatura de 27°C.

Entre as características de avaliação de desempenho do sistema cromatográfico otimizado é a verificação da eficiência do sistema através do teste de adequabilidade. A essência do teste está no conceito de que o equipamento, as amostras e as operações analíticas constituem um sistema único, quando submetido a um teste funcional geral. Os parâmetros cromatográficos apresentados na Tabela 1 como o número de pratos teóricos acima de 8500 e a resolução de 5,12 indicam uma excelente eficiência do sistema cromatográfico otimizado, expressada através dos fatores de retenção ou capacidade (k) e dos fatores de assimetria.

Os resultados obtidos da validação do método otimizado para a determinação simultânea de T3 e T4 atendem aos requisitos estabelecidos para as aplicações propostas, tanto em formulações farmacêuticas como em matérias primas, uma vez que abrangeram as concentrações dos ensaios limites dos contaminantes.

Das 5 amostras constituídas de matérias primas 4 apresentaram desvios de qualidade. Duas matérias-primas apresentaram teor abaixo do teor declarado, 2 não declaravam o teor. As formas farmacêuticas cápsula (9) e sachê (1) apresentaram valores com desvios que confirmaram as queixas relatadas. Quatro amostras de cápsulas apresentaram valores abaixo do teor declarado justificando a queixa de ineficácia terapêutica. Em cinco amostras constituídas de cápsulas e 01 de sachê, foram encontrados valores de superdosagem destes hormônios, confirmando as queixas de intoxicação, internação em UTIs e até óbitos dos usuários destas formulações farmacêuticas.

Os valores encontrados para os contaminantes, determinados como ensaios limites, embora estejam dentro do especificado na USP-28 de até 2% para liotironina em relação ao valor encontrado para T4, e até 4% para levotiroxina em relação ao valor encontrado de T3, são extremamente altos levando-se em conta as superdosagens dos hormônios encontradas nas cápsulas. A quantidade de cápsulas enviadas de cada amostra permitiu, somente, a realização dos ensaios de determinação do teor, ensaio limite do contaminante e uniformidade de conteúdo. Este último ensaio segundo a Farmacopéia Brasileira²² determina o teor individual do hormônio em cada uma das 10 cápsulas analisadas, e permite avaliar como é distribuído o princípio ativo em cada cápsula, sendo que os valores encontrados refletiram uma variação significativa expressa através dos desvios padrões relativos encontrados de até 197%, ultrapassando o valor de referência de 6% para T3 e T4, além da superdosagem.

Os desvios de qualidade verificados nas cápsulas manipuladas com T3 e ou T4, são graves pois foram encontrados valores de superdosagem que levaram os pacientes à internação e até ao óbito por intoxicação causada por estes hormônios, as farmácias que manipulam fármacos com baixo índice terapêutico e alta potência devem ter uma fiscalização rigorosa por parte das autoridades reguladoras, que agora poderão contar com os subsídios da RDC n° 214²³ de 12/12/2006, que a partir

de 03/07 substituirá as RDC n° 33²⁴ e n° 354²⁵ da ANVISA/MS, que estabelece critérios rígidos para a manipulação de fármacos de baixo índice terapêutico, aperfeiçoando as ações de controle sanitário na área de medicamentos na busca de proteção da saúde da população.

Os resultados obtidos expõem as limitações técnicas nos processos de manipulação, assim como a ausência do controle de qualidade no produto acabado, por questões financeiras que somados provocam riscos sanitários no uso destes medicamentos.

REFERÊNCIAS

1. Farwell PA, Braverman LE. Thyroid and Antithyroid Drugs In: The Goodman e Gilman's. Pharmacological Basis of Therapeutics, 9th ed. New York: Pergamon Press; 1996, p. 1391-7
2. Martindale. The complete drug reference. 34.ed. London: The Royal Pharmaceutical Society of Great Britain. 2005, 1594-6; p. 1600-4.
3. The Merck Manual of Medical Information-Home Edition: Merck Research Laboratories, Division of Merck & Co.,Inc. Whitehouse Station, N.J. 1997, p. 704-11.
4. Bricarello S. Hormônios da Tireóide e Drogas Antitireoidianas. In: Zanini AC, Oga S. Farmacologia Aplicada. 5.ed. São Paulo: Ed Atheneu; 1994, p. 616-21.
5. Garnick RL, Burt GF, Long DA, Bastian JW, Alfred JP. High-performance liquid chromatographic assay for sodium levothyroxine in tablet formulations: Content uniformity applications. J Pharm Sci. 1984;73:75-7.
6. Richheimer SL, Amer TM. Stability-indicating assay, dissolution and content uniformity of sodium levothyroxine in tablets. J Pharm Sci. 1983;72:1349-51.
7. Brower JF, Toler DY, Reepmeyer JC. Determination of sodium levothyroxine in bulk, tablet, and injection formulations by high-performance liquid. J Pharm Sci. 1984; 73: 1315-17.
8. British Pharmacopéia, Her Majesty's Stationery Office (HMSO), London, 2004, p 1166-8.
9. United States Pharmacopéia 28 ed. Rockville: United States Pharmacopéal conventions. 2005;1137-39; p. 1126-9.
10. Lovell G, Corran PH. Determination of L-thyroxine in reference serum preparations as the o-phthalaldehyde-N-acetylcysteine derivative by reversed-phase liquid chromatography with electrochemical detection. J Chromatogr Biomed Appl. 1990;525:287-96.
11. Kazemifard AG, Moore DE, Aghazadeh A. Identification and quantification of sodium-thyroxine and its degradation products by LC using electrochemical and MS detection. J Pharm Biomed Anal 2001; 25:697-711.

12. Siekmann L. Measurement of thyroxin in human serum by isotope dilution mass spectrometry. *Definitive methods in clinical chemistry*. V. *Biolog Mass Spect*. 1987;14:683-8.
13. Holak W, Shostak D. Differential pulse polarographic analysis of thyroid hormone: determination of iodine, thyroxine, and liothyronine. *J Pharm Sci*. 1979; 68:338-42.
14. Armbruster MD, Harris R, Scarbrough R, Tamez C. Total triiodothyronine by fluorescence polarization immunoassay (FPIA). *J Clin Lab Anal*. 1988; 2: 3-6.
15. Kobuke L, Specker JL, Berm HA. Thyroxine content of eggs and larvae of coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *J Exp Zool*. 1987;242:89-94.
16. Bigos ST, MacLean J, Butler B. Comparison of serum free thyroxine measurements by chemiluminescence and equilibrium dialysis. *J Biolum Chemilum*. 1989; 4:627-34.
17. Waseem A, Yaqoob M, Nabi A. Determination of thyroxine in pharmaceuticals using flow injection with luminol chemiluminescence inhibition detection. *Lumin*. 2006;21:174-8.
18. US Pharmacopeia 28. Validation of compendia methods. United States Pharmacopeal Convention, Rockville, MD, 2005, 2748-51 p.
19. ICH Q2B: Text on validation of analytical procedures methodology (International Conference on Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Drugs for Human Use, Geneva, Switzerland, March 1979). Published in *Federal Register*, 62(96), 19 May 1997,27463-7 p.
20. Brasil, RDC N° 10 Anexo V de 2 de Janeiro de 2001, Resolução da Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Aprova o Regulamento Técnico para Medicamentos Genéricos e estabelece Guia para validação de Métodos Analíticos. Disponível em: <http://legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?word=19777>&word. Acesso em 20/09/2007.
21. Inmetro (Instituto Nacional de Metrologia. Normalização e Qualidade Industrial). Orientações sobre Validação de Métodos e Ensaios Químicos. DOQ-CGCRE-008, Revisão: 00, 2002, 31 p.
22. Farmacopéia Brasileira 4ª Ed. Uniformidade de Doses Unitárias. Parte II, Primeiro fascículo, Atheneu Editora São Paulo Ltda, 1996.
23. Brasil, RDC n° 214 de 12 de Dezembro de 2006, Resolução da Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Dispõe sobre as Boas Práticas de Manipulação de Medicamentos para Uso Humano em farmácias. Disponível em <http://legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=25128&mode=Print>. Acesso em 23/2/2007.
24. Brasil, RDC n° 33 de 19 de abril de 2000, Resolução da Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Aprova Regulamento Técnico de Boas Práticas de Manipulação em Farmácias. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo*, Brasília, DF, 24 de abril 2000. Seção 1, n° 78-E, p. 27.
25. Brasil, RDC n° 354 de 18 e Dezembro de 2003, Resolução da Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Estabelece a manipulação de produtos farmacêuticos em todas as formas farmacêuticas de uso interno, que contenham substâncias de baixo índice terapêutico definidas no Anexo I. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/Legis/resol/2003/rdc/t354?rdc.htm> Acesso em 29/12/03.

Avaliação microbiológica de doce de leite pastoso

Microbiology quality evaluation of pasty *doce de leite*

RIALA6/1139

Cláudio D. TIMM*, Rita de Cássia S. CONCEIÇÃO, Francisco José O. COELHO, Talita B. ROOS, Talita S. TEJADA, Pedro S. QUEVEDO, Andréa HENTGES, Nathalia D.A. BRASIL

*Endereço para correspondência: * Inspeção de Leite e Derivados, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, CEP 96010-900, Pelotas, RS/Brasil. E-mail: inspleit@ufpel.tche.br.

Recebido: 13/06/2007 – Aceito para publicação: 28/09/2007

RESUMO

A manipulação inadequada e a exposição ao meio ambiente aumentam o risco de contaminação do doce de leite oferecido ao consumidor. O objetivo do trabalho foi avaliar a qualidade microbiológica do doce de leite fracionado para venda a varejo. Foram realizadas pesquisa de *Salmonella* e contagens de *Staphylococcus* coagulase positiva, de coliformes termotolerantes e de bolores e leveduras em 28 amostras de doce de leite. Uma amostra apresentou *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorotipo Typhimurium em 25 g do produto. Essa cepa foi resistente aos antimicrobianos cloranfenicol e sulfametoxazol/trimetoprim, apresentou resistência parcial à tetraciclina e foi sensível aos demais. Todas as amostras analisadas apresentaram contagens de *Staphylococcus* coagulase positiva < 10 UFC/g. As contagens de coliformes termotolerantes apresentaram resultados < 3 NMP/g, com exceção de duas amostras coletadas de dois supermercados, que apresentaram 0,4 e 2,1 NMP/g. Apenas uma amostra apresentou contagem de bolores e leveduras com valores aceitáveis pelas normas brasileiras. Todas as demais apresentaram contagens acima de $1,0 \times 10^2$ UFC/g. O doce de leite pastoso fracionado nos estabelecimentos comerciais pode ser fonte de microrganismos patogênicos para humanos, o que justifica a adoção de rigoroso controle na inspeção e fiscalização do comércio deste alimento.

Palavras-chave. doce de leite, *Salmonella* Typhimurium, microbiologia.

ABSTRACT

The inadequate foods handling and the exposition of them to environment increase the hazard of contamination of the *doce de leite* offered to consumers. The aim of the present study was to evaluate the microbiology quality of pasty *doce de leite* sliced into pieces to be sold by retail. *Salmonella* detection, and coagulase-positive *Staphylococci*, thermotolerant coliforms, mould and yeast counting were performed in 28 samples of *doce de leite*. *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype Typhimurium was detected in 25g of one sample. This strain was resistant to chloramphenicol and sulphamethoxazole-trimethoprim, and partially resistant to tetracycline, but susceptible to the other antimicrobial agents. All of the samples showed coagulase-positive *Staphylococci* counting < 10 CFU/g. Results from thermotolerant coliforms counting were < 3 MPN/g, except two samples collected from two supermarkets which showed 0.4 and 2.1 MPN/g, respectively. One unique sample showed mould and yeast counting with values accepted by Brazilian legislation; the other samples showed counts over 1.0×10^2 CFU/g. As the pasty *doce de leite* have been sliced into pieces in the markets this procedure should be the source of pathogenic microorganisms to humans, which justify the establishment of an stringent control on the inspection and the surveillance of this kind of food.

Key words. doce de leite, *Salmonella* Typhimurium, microbiology.

INTRODUÇÃO

Doce de leite é o produto obtido por concentração e adição do calor ao leite, com ou sem adição de sólidos de origem láctea e/ou creme adicionado de sacarose¹. O doce de leite é típico do sul da América Latina, de amplo consumo, porém tem sido pouco utilizado como objeto de estudo².

Embora o doce de leite não seja um produto favorável ao crescimento de microorganismos por apresentar alta concentração de carboidratos e, conseqüentemente, baixa atividade de água, a possibilidade de veicular bactérias patogênicas não está excluída. A presença de microorganismos, como *Salmonella*, *Staphylococcus*, coliformes, bolores e leveduras, em doce de leite tem sido motivo de preocupação por parte dos órgãos responsáveis pela inspeção de alimentos e saúde pública, os quais têm estabelecido limites de tolerância para a ocorrência destes microorganismos no produto. Cuidados higiênico-sanitários no processamento e manuseio do doce de leite estão entre as principais medidas preventivas para evitar sua contaminação.

No comércio, é prática comum o fracionamento do doce de leite para venda a varejo. Manipulação inadequada e exposição ao meio ambiente aumentam o risco de contaminação do produto oferecido ao consumidor, o que torna importante sua avaliação microbiológica.

O objetivo do trabalho foi avaliar a qualidade microbiológica do doce de leite pastoso fracionado para venda a varejo em supermercados da cidade de Pelotas, Rio Grande do Sul (RS), Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas 28 amostras de doce de leite, comercializadas a varejo, obtidas em seis supermercados da cidade de Pelotas, RS. As amostras, embaladas nos mesmos potes em que estavam colocados à venda, foram encaminhadas

ao Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal (LIPOA) da Universidade Federal de Pelotas e imediatamente analisadas. Foram realizadas pesquisa de *Salmonella* e contagens de *Staphylococcus* coagulase positiva, de coliformes termotolerantes e de bolores e leveduras. Os ensaios foram executados de acordo com FDA (1992)³.

Os isolados de *Salmonella* obtidos foram enviados ao Departamento de Bacteriologia do Laboratório de Enterobactérias da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz, Manguinhos, Rio de Janeiro, Brasil) para sorotipagem. Foram também testados quanto à sensibilidade a antimicrobianos pelo Método de Difusão em Disco, usando ágar Mueller-Hinton (Acumedia, USA) e incubação a 37°C por 18-24 h, de acordo com o National Committee Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Os antimicrobianos utilizados foram ampicilina (10µg), cloranfenicol (30µg), norfloxacina (10µg), tetraciclina (30µg), ácido nalidixico (30µg), ceftriaxona (30µg), ciprofloxacina (5µg) e sulfametoxazol/trimetoprim (25µg) (Sensidisc, DME, São Paulo).

RESULTADOS

Uma amostra (3,6%) de doce de leite apresentou *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorotipo Typhimurium em 25 g do produto. Essa cepa foi resistente aos antimicrobianos cloranfenicol e sulfametoxazol/trimetoprim, apresentou resistência parcial à tetraciclina e foi sensível aos demais antimicrobianos testados. Não foi isolada *Salmonella* das demais amostras.

Todas as amostras analisadas (100%) apresentaram contagens de *Staphylococcus* coagulase positiva < 10 UFC/g.

As contagens de coliformes termotolerantes apresentaram resultados < 3 NMP/g, com exceção de duas amostras (7,1%) de dois supermercados, que apresentaram 0,4 e 2,1 NMP/g.

As contagens de bolores e leveduras das amostras obtidas nos seis supermercados variaram de $1,4 \times 10^1$ a $6,0 \times 10^4$ UFC/g. As médias das contagens estão demonstradas na Figura 1.

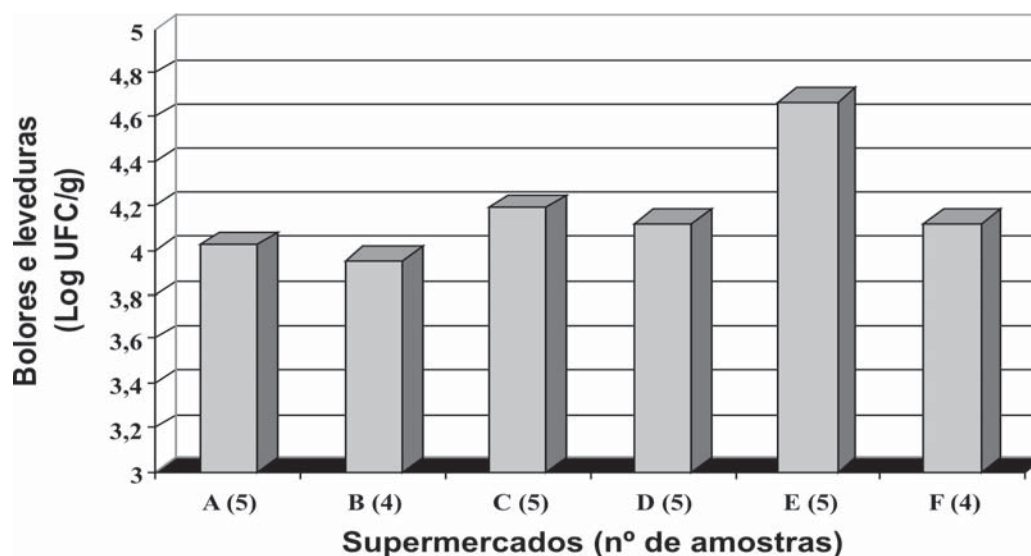


Figura 1. Médias de contagens de bolores e leveduras de amostras de doce de leite coletadas em seis supermercados da cidade de Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil.

DISCUSSÃO

O doce de leite é um derivado lácteo produzido e consumido em larga escala em países como Brasil, Uruguai e Argentina. No Brasil, embora o produto seja inspecionado na indústria pelos órgãos oficiais, o comércio varejista, especialmente supermercados, costuma proceder a abertura de embalagens de doce de leite para venda em porções menores, de acordo com a quantidade solicitada pelo comprador. Essa prática aumenta o risco de contaminação do produto e de transmissão de microrganismos indesejáveis para o consumidor.

Bactérias do gênero *Salmonella* são uma das principais causas de enfermidades veiculadas por alimentos⁴. A legislação brasileira determina no Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, que o doce de leite deve apresentar ausência de *Salmonella* em 25 g⁵. A presença de *Salmonella* em uma (3,6%) das 28 amostras de doce de leite analisadas é significativo do potencial perigo representado pelo consumo do produto vendido a varejo. Cepas de *Salmonella* Typhimurium resistentes a antimicrobianos têm sido isoladas de outros alimentos^{6,7,8,9}. Entretanto, este é o primeiro registro de isolamento de *Salmonella* a partir de amostras de doce de leite.

Todas (100%) as contagens de *Staphylococcus* coagulase positiva e de coliformes termotolerantes apresentaram resultados abaixo dos limites máximos estabelecidos na legislação brasileira para esses parâmetros, que são 10² UFC/g e 50 NMP/g, respectivamente^{1,5}. São raros os registros de estudos de avaliação microbiológica de doces de leite no comércio varejista. Sousa et al.¹⁰ analisaram doce de leite de búfala produzido na Ilha de Marajó, Brasil, e não isolaram *Salmonella* nem *Staphylococcus* de 18 amostras estudadas.

Bolores e leveduras fornecem informações sobre as condições gerais de higiene no processamento, armazenamento e transporte dos alimentos, sendo importantes indicadores da deterioração dos alimentos¹¹. Apenas uma amostra (3,6%) apresentou contagem de bolores e leveduras com valores aceitáveis pelas normas brasileiras, determinadas no Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade do Doce de Leite, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento¹. Todas as demais (96,4%) apresentaram contagens acima de 1,0 x 10² UFC/g. Em estudo realizado com doce de leite elaborado artesanalmente, SOUSA et al.¹⁰ também encontraram elevada ocorrência de bolores e leveduras. A elaboração artesanal de doce de leite, assim como o fracionamento para venda em pequenas porções, implica em maior manipulação e exposição do produto a potenciais fontes de contaminação, o que pode estar relacionado com as contagens de bolores e leveduras observadas.

CONCLUSÃO

O doce de leite pastoso fracionado nos estabelecimentos comerciais pode ser fonte de microrganismos patogênicos para

humanos, o que justifica a adoção de rigoroso controle na inspeção e fiscalização do comércio deste alimento.

REFERÊNCIAS

1. Brasil. Portaria nº354, de 04/09/97, do Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de doce de leite. Diário Oficial da União, Brasília, 08 set. 1997. Seção I, p. 19685.
2. Pavlovic S, Santos RC, Silva ME, Gloria MBA. Effect of processing on the nutritive value of *Doce de Leite*, a typical Latin-American confectionary product. Arq Biol Tecnol. 1992; 35 (4): 691-8.
3. FDA. Bacteriological analytical manual, 7th ed. Association of Official Analytical Chemists International, Arlington, VA. 1992.
4. D'Aoust J, Maurer J, Baley JS. *Salmonella* Species. In: DOYLE, G.L.; ABRAHAM, A.G.; ANTONI, G.L. Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers. 2nd ed. Washington: ASM; 2001. p. 141-78.
5. Brasil. Resolução RDC nº 12, de 02/01/2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Regulamento técnico sobre padrões Microbiológicos para Alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, 10 jan. 2001. Seção I, p. 45-53.
6. Gorman R, Adley CC. Characterization of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium isolates from humans, foods, and animal sources in the Republic of Ireland. J Clin Microbiol. 2004; 42 (5): 2314-6.
7. Cui S, Ge B, Zheng J, Meng J. Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* spp. and *Salmonella* serovars in organic chickens from Maryland retail stores. Appl Environm Microbiol. 2005; 71 (7): 4108-11.
8. Miko A, Pries K, Schroeter A, Helmuth R. Molecular mechanisms of resistance in multidrug-resistant serovars of *Salmonella enterica* isolated from foods in Germany. J Antimicrob Chemother. 2005; 56: 1025-33.
9. Antunes P, Machado J, Peixe L. Characterization of antimicrobial resistance and class 1 and 2 integrons in *Salmonella enterica* isolates from different sources in Portugal. J Antimicrob Chemother. 2006; 58: 297-304.
10. Sousa CL, Neves ECA, Carneiro CAA, Farias JB, Peixoto MRS. Avaliação microbiológica e físico-química de doce de leite e requeijão produzidos com leite de búfala na Ilha de Marajó – PA. B CEPPA. 2002; 20 (2): 191-202.
11. Brasil. Instrução Normativa nº62, de 26/08/2003, da Secretaria de Defesa Agropecuária do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. Diário Oficial da União, Brasília, 18 set. 2003. Seção I, p. 14-51.

Correlação entre métodos cromogênicos e o método convencional na enumeração de coliformes e *Escherichia coli* em carne bovina moída.

Correlation between rapid and standard methods for counting coliforms and *Escherichia coli* in bovine raw minced meat

RIALA6/1140

Sabrina N. CASAROTTI¹, Aline T. PAULA², Daise A. ROSSI^{3*}

*Endereço para correspondência: ³Faculdade de Medicina Veterinária - FAMEV/LABIO - Universidade Federal de Uberlândia. Av. Ceará, s/n - Bl 2D, sala 43 -, Umuarama, 38405-303 Uberlândia, MG/Brasil
e-mail: daiser@umuarama.ufu.br

¹Universidade Estadual Paulista, Campus de São José do Rio Preto, SP/Brasil.

²Ciências Biológicas - Universidade Federal de Uberlândia, MG/Brasil.

Recebido: 31/07/2007 – Aceito para publicação: 02/01/2008

RESUMO

Os métodos rápidos de análise microbiológica de alimentos apresentam vantagens sobre os ensaios convencionais no que se refere à simplificação do trabalho no laboratório e à redução de tempo na obtenção de resultados. O objetivo deste estudo foi de comparar os testes rápidos Petrifilm® EC e Compact dry® EC e CF com a técnica de análise convencional realizada em placas na enumeração de coliformes totais e coliformes termotolerantes em amostras de carne moída bovina e avaliar as metodologias alternativas para quantificação de *Escherichia coli* nas temperaturas de 35°C e 45°C. A análise de regressão linear dos dados mostrou alta correlação entre as contagens de coliformes totais e coliformes termotolerantes ($R^2 > 0,9$). A correlação entre as contagens de *Escherichia coli* em Petrifilm® e Compact dry® foi também positiva e significativa ($R^2 > 0,9$). Todavia, quando foi feita a comparação entre os resultados da enumeração de *E. coli* a temperaturas de 35°C e 45°C, houve decréscimo no coeficiente de correlação em ambos os sistemas ($R^2 < 0,9$). Considerando-se que os métodos rápidos e a metodologia convencional para contagem de coliformes mostraram-se equivalentes, os resultados sugerem a aplicabilidade dos sistemas Petrifilm® e Compact dry® como técnicas alternativas ao método convencional de plaqueamento.

Palavras-chave. coliformes, Petrifilm®, Compact dry®, método tradicional.

ABSTRACT

Rapid techniques for microbiological analysis of foods show advantages when compared with the conventional methods, as the former are easy-to-performer and no time-consuming assays in getting the results. The aim of this study was to compare the performance of the rapid techniques Petrifilm® EC and Compact dry® EC and CF with the standard method for counting the coliform group in bovine raw minced meat samples. The performances of rapid tests were compared for quantifying *Escherichia coli* at 35°C and 45°C. Simple regression analysis of data showed a strong correlation between Petrifilm® and Compact dry® for determining the number of coliforms, as well as for quantifying *E. coli*. However, when the results of *E. coli* counting at 35°C and 45°C by means of the same technique were compared, the correlation factors were lower. This analysis suggests that rapid techniques are suitable to be employed as alternative techniques for microorganisms counting in raw minced meat.

Key words. coliforms, Petrifilm®, Compact dry®, standard method.

INTRODUÇÃO

A carne e seus produtos derivados apresentam uma alta suscetibilidade às contaminações microbianas, que podem resultar na redução de suas propriedades nutritivas e alterações organolépticas (cor, odor, sabor e textura). Além disso, dependendo da natureza da contaminação, o consumo desse alimento pode resultar em risco à saúde¹.

Os coliformes são os bioindicadores mais utilizados para verificar as condições higiênico-sanitárias de alimentos². Sua presença é considerada uma evidência de práticas de higiene inadequadas para obter os padrões requeridos para o processamento de alimentos³. Os coliformes dividem-se em dois grupos, os coliformes totais e os coliformes fecais ou termotolerantes⁴.

A pesquisa de *Escherichia coli*, espécie pertencente ao grupo dos coliformes termotolerantes, fornece com maior segurança, informações sobre as condições higiênicas dos alimentos e melhor indicação de eventual presença de enteropatógenos. Isso porque a *E. coli* existe exclusivamente no trato gastrointestinal de homens e animais, sendo, portanto, utilizado como microrganismo indicador de contaminação fecal⁵.

Os métodos de plaqueamento em ágar para enumeração de bactérias têm sido tradicionalmente utilizados na avaliação microbiológica da qualidade de alimentos, no entanto, técnicas alternativas têm sido desenvolvidas, buscando-se rapidez e simplicidade, sem comprometimento da sensibilidade e exatidão⁶. Entre as novas tecnologias desenvolvidas para enumeração de microrganismos como alternativas aos métodos convencionais de plaqueamento estão os sistemas Petrifilm[®] e Compact dry[®], que apresentam simplicidade na manipulação e maior rapidez na enumeração⁴.

O Petrifilm[®] consiste em um sistema pronto para uso contendo meio de cultura desidratado e enzimas cromogênicas em um cartão coberto com filme plástico⁷. O sistema Compact dry[®] contém meio de cultura com inibidores de enzimas cromogênicas incorporadas, que são capazes de detectar atividades dos microrganismos pesquisados⁴. Ambos contêm agentes solidificantes em água fria.

Para que sejam inseridos como rotina e não representem prejuízos na qualidade dos resultados produzidos, os novos métodos devem ser submetidos e aprovados por órgãos internacionais de certificação como a A.O.A.C. (Association Official Analytical Chemists)⁸.

Para o uso no Brasil em análises de produtos de origem animal, os métodos necessitam ainda, da aprovação do Ministério da Agricultura. A Instrução Normativa n° 62 de 26 de agosto de 2003 regulamenta sobre as técnicas de análise que devem ser utilizadas nas indústrias que produzem alimentos de origem animal⁹.

Validações internacionais e nacionais de métodos de análise podem e devem ser repetidas para verificar se há interferência de variações regionais da microbiota ou da matriz alimentícia nos resultados obtidos. Testes internos por comparação com os métodos tradicionais de análise devem ser realizados, já que muitas vezes, características intrínsecas dos alimentos podem interferir nos resultados.

O presente estudo teve como objetivos avaliar e comparar os teste rápidos Petrifilm[®] EC e Compact dry[®] EC e CF com a técnica de análise convencional realizada em placas na enumeração de coliformes totais e coliformes termotolerantes em amostras de carne moída bovina e avaliar as metodologias alternativas para quantificação de *Escherichia coli* nas temperaturas de 35°C e 45°C.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta das amostras

As análises comparativas foram realizadas em 20 amostras de carne moída adquiridas aleatoriamente em açougues da cidade de Uberlândia, durante o mês de outubro de 2006. Após a coleta, as amostras foram acondicionadas em caixa de isopor contendo gelo e transportadas imediatamente para o Laboratório de Biotecnologia Animal da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia (LABIO/FAMEV/UFU), onde foram analisadas.

Preparo das amostras

No laboratório, as amostras receberam um número de identificação e a embalagem foi higienizada externamente com álcool etílico 70% e levadas para fluxo laminar onde foram abertas assepticamente. Pesou-se 25g da amostra em um frasco contendo 225mL da água peptonada 0,1% estéril (AP), e esta foi considerada a diluição 10⁻¹. O conteúdo do frasco foi homogeneizado manualmente e ficou em repouso por 5 minutos e, a partir desta, preparou-se diluições decimais seriadas em 9mL de AP.

Contagem de coliformes totais e termotolerantes pelo método tradicional

Foi utilizada a contagem em placas no agar VRBA com posterior confirmação, que é a metodologia recomendada pelo Ministério da Agricultura na Instrução 62 para amostras em que o limite máximo tolerado é 100 UFC.g⁻¹ ou mL⁻¹ ⁹.

Contagem de coliformes totais e termotolerantes em Petrifilm[®]

Aliquotas de 1,0mL de cada uma das diluições (10⁻² e 10⁻³) foram transferidas ao centro de placas Petrifilm[®] EC (3M Company, St. Paul, MN, EUA). Em seguida, utilizou-se o difusor sobre o filme superior, pressionando com cuidado de forma a distribuir o inóculo uniformemente pela área circular. Uma placa foi incubada a 35°C por 48 horas, para detecção de coliformes totais e a outra, a 45°C por 48 horas, para enumeração de coliformes termotolerantes.

Após o período de incubação a presença de coliformes foi determinada pela produção de colônias vermelhas associadas à bolhas de gás. A presença de *Escherichia coli* foi confirmada pela produção de um precipitado azul em torno da colônia associada à bolha de gás. O resultado foi expresso

como UFC.g⁻¹ de *E. coli*. As colônias vermelhas e azuis com bolhas foram somadas e multiplicou-se o resultado pela recíproca da diluição utilizada. O resultado foi expresso como UFC.g⁻¹ de coliformes totais, para as placas incubadas a 35°C, ou como UFC.g⁻¹ de coliformes termotolerantes, para as placas incubadas a 45°C.

Contagem de coliformes totais e termotolerantes em Compact dry® EC e CF

As placas de Compact dry® EC (Nissui Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo, Japan) para contagem de coliformes e *E. coli* e de Compact dry® CF (Nissui Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo, Japan) para contagem somente de coliformes foram inoculadas em duplicata com 1mL das diluições selecionadas (10⁻² e 10⁻³). Uma série de placas de EC e de CF foi incubada a 35°C por 24 horas e a outra (EC e CF) a 45°C por 24 horas.

Foram contadas nas placas de EC, incubadas a 35°C, as colônias azuis, e após a multiplicação pela recíproca da diluição utilizada, o resultado foi expresso como UFC.g⁻¹ de *E. coli*. Nesta mesma placa, as colônias vermelhas ou cor-de-rosa foram contadas e somadas às colônias azuis e após multiplicação pela recíproca da diluição utilizada, o resultado foi expresso como UFC.g⁻¹ de coliformes totais. A contagem nas placas incubadas a 45°C foi feita da mesma forma, porém, a soma das colônias vermelhas e azuis foi expressa como UFC.g⁻¹ de coliformes termotolerantes.

Nas placas CF incubadas a 35°C e 45°C foram contadas as colônias azuis ou verdes. O total de colônias foi multiplicado pela recíproca da diluição utilizada e o resultado foi expresso como UFC.g⁻¹ de coliformes totais ou termotolerantes, respectivamente.

Análise dos resultados

Os diferentes resultados das contagens foram tabulados e transformados em logaritmo de base 10 (log₁₀). Utilizou-se análise de regressão linear e cálculo do coeficiente de correlação (R²) para a comparação dos resultados obtidos nos diferentes métodos.

Na análise estatística foram utilizados os critérios tradicionais de equivalência entre dois métodos que são:

coeficiente angular próximo de 1,0, coeficiente linear próximo de 0,0 e coeficiente de correlação > 0,9¹⁰.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Quando os resultados de coliformes totais obtidos foram correlacionados, o coeficiente de correlação (R²) obtido entre Compact dry® EC e método tradicional foi de 0,9567, entre o Compact dry® CF e o tradicional foi de 0,9621, entre Petrifilm® EC e o tradicional foi de 0,9445, entre o Petrifilm® EC e o Compact dry® EC foi de 0,9512, e entre o Petrifilm® EC e o Compact dry® CF foi de 0,9435. A representação gráfica com o coeficiente de correlação e a equação da reta entre os diferentes sistemas pode ser observada nas Figuras 1, 2, 3, 4 e 5.

Os resultados encontrados mostraram coeficiente de correlação superiores a 0,90 em todas as comparações indicando que os sistemas são equivalentes para enumeração de coliformes totais. Além disso, eles foram bem próximos entre si. Os resultados obtidos neste estudo foram semelhantes a outras comparações^{7,11,12} que demonstraram coeficientes de correlação entre 0,95 e 0,96 para Compact dry® EC e CF, respectivamente.

Os índices de correlação entre o Petrifilm® EC e o método tradicional na enumeração de coliformes totais em carne bovina moída obtidos por Beloti et al.¹³ e por Park et al.¹⁴ foram de 0,93 e 0,91, respectivamente, portanto, bastante semelhantes aos obtidos nesse estudo.

No entanto, os valores obtidos nesse estudo são superiores a outras comparações entre Petrifilm® EC e o método tradicional que demonstraram coeficientes de correlação entre 0,83 e 0,86 na enumeração de coliformes totais¹⁵⁻¹⁷.

No presente trabalho a correlação entre os métodos rápidos foi considerada satisfatória. Ferreira¹⁸ comparou as contagens de coliformes totais em cortes de frangos utilizando o Compact dry® EC e o Petrifilm® EC e obteve um coeficiente de correlação R²= 0,9235.

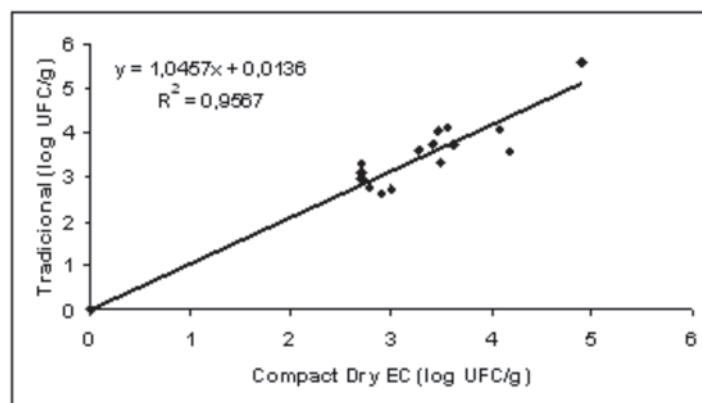


Figura 1. Regressão linear das contagens de coliformes totais obtidas em Compact dry® EC e no método tradicional em 20 amostras de carne bovina moída.

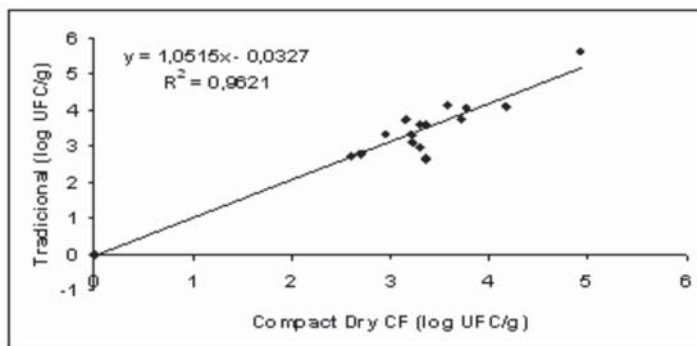


Figura 2. Regressão linear das contagens de coliformes totais obtidas em Compact dry[®] CF e no método tradicional em 20 amostras de carne bovina moída.

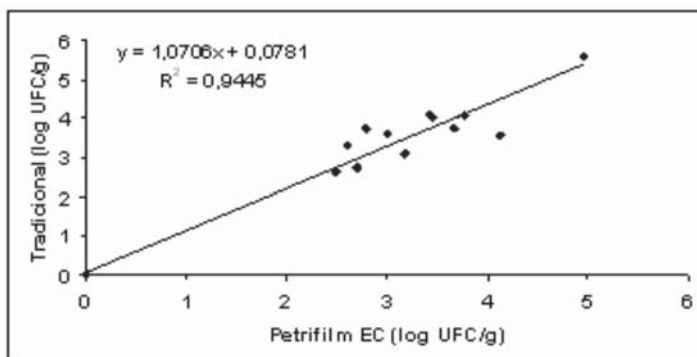


Figura 3. Regressão linear das contagens de coliformes totais obtidas em Petrifilm[®] EC e no método tradicional em 17 amostras de carne bovina moída.

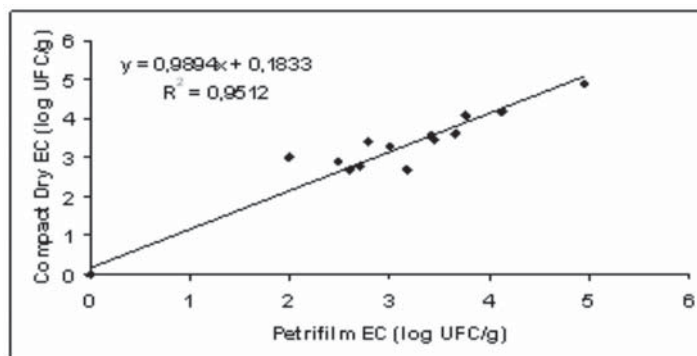


Figura 4. Regressão linear das contagens de coliformes totais obtidas nos sistemas Petrifilm[®] EC e Compact dry[®] EC em 17 amostras de carne bovina moída.

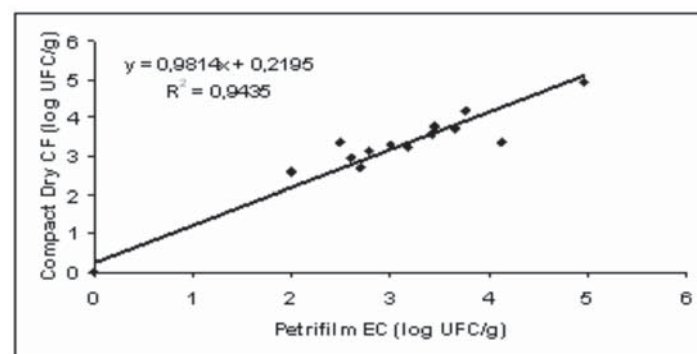


Figura 5. Regressão linear das contagens de coliformes totais obtidas nos sistemas Petrifilm[®] EC e Compact dry[®] CF em 17 amostras de carne bovina moída.

Os métodos rápidos foram desenvolvidos para a incubação a 35°C para a enumeração de coliformes totais e *E. coli*^{19,20}. Ainda não foram desenvolvidas placas específicas dos sistemas Petrifilm® e Compact dry® para a determinação de coliformes fecais, mas é necessário dispor de uma metodologia rápida para detectá-los já que diferentes legislações descrevem padrões para esses microrganismos²¹. Quando Compact dry® EC e CF e o Petrifilm® EC foram incubados a esta temperatura para verificar sua adequação para enumeração de coliformes termotolerantes, os coeficientes de correlação obtidos

foram considerados satisfatórios ($R^2 > 0,9$) quando comparados entre si e à metodologia tradicional. Porém os coeficientes foram ligeiramente inferiores aos observados nas correlações para enumeração de coliformes totais e *E. coli*.

O coeficiente de correlação obtido para contagem de coliformes termotolerantes entre Compact dry® EC e tradicional foi de 0,9137, entre o Compact dry® CF e o tradicional foi de 0,9141, entre Petrifilm® EC e o tradicional foi de 0,9539, entre o Petrifilm® EC e o Compact dry® EC foi de 0,9123, e entre o Petrifilm® EC e o Compact dry® CF foi de 0,9242 (Figuras 6, 7, 8, 9 e 10).

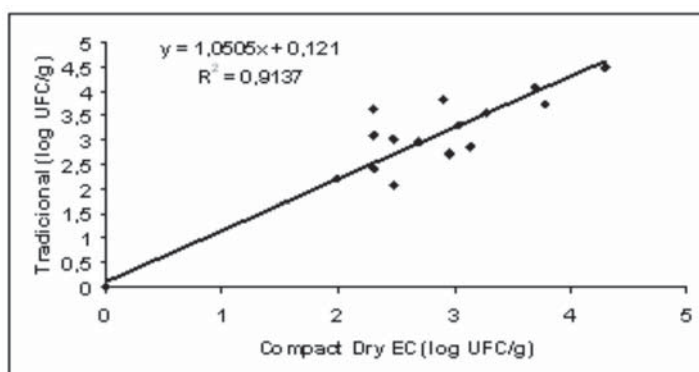


Figura 6. Regressão linear das contagens de coliformes termotolerantes obtidas em Compact dry® EC e no método tradicional em 20 amostras de carne bovina moída

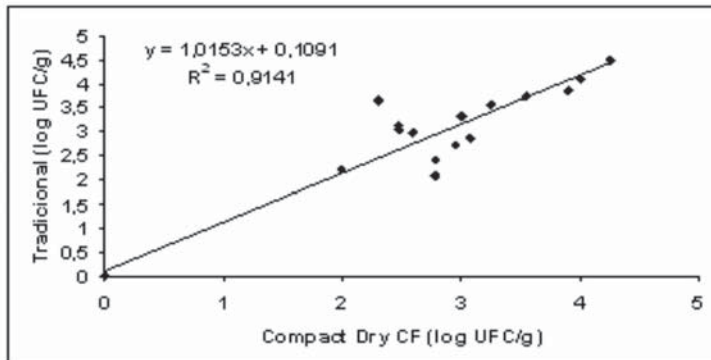


Figura 7. Regressão linear das contagens de coliformes termotolerantes obtidas em Compact dry® CF e no método tradicional em 20 amostras de carne bovina moída.

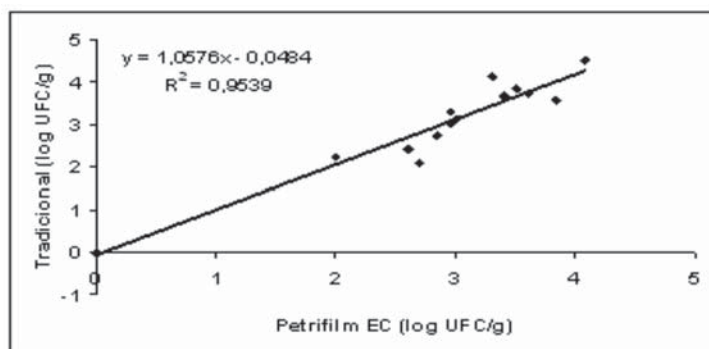


Figura 8. Regressão linear das contagens de coliformes termotolerantes obtidas em Petrifilm® EC e no método tradicional em 17 amostras de carne bovina moída

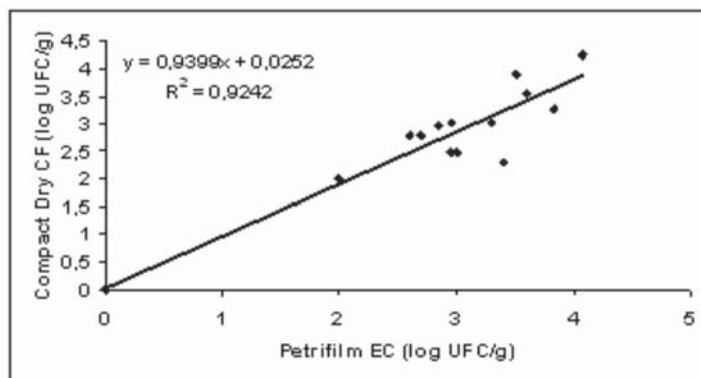


Figura 9. Regressão linear das contagens de coliformes termotolerantes obtidas nos sistemas Petrifilm® EC e Compact dry® EC em 17 amostras de carne bovina moída.

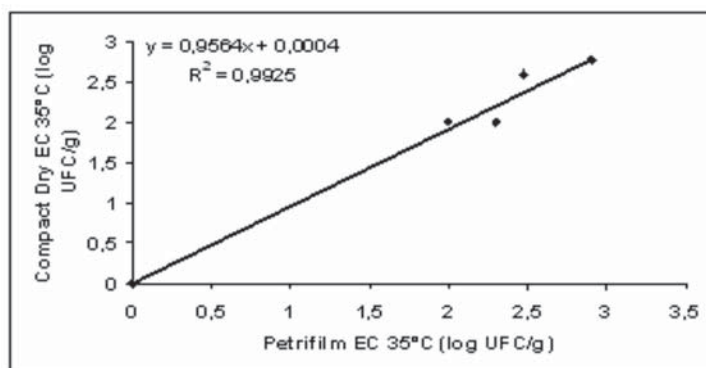


Figura 10. Regressão linear das contagens de coliformes termotolerantes obtidas nos sistemas Petrifilm® EC e Compact dry® CF em 17 amostras de carne bovina moída.

Porém, o coeficiente de correlação para a análise de coliformes termotolerantes obtidos entre Petrifilm® e o método tradicional foi maior do que o encontrado por Blackburn et al.²², que encontraram coeficientes que variaram de 0,85 a 0,93 ao comparar essas metodologias na enumeração de coliformes termotolerantes em uma grande variedade de alimentos. Em outros estudos os coeficientes de correlação encontrados entre o Petrifilm® e o método tradicional na enumeração de coliformes termotolerantes também foram positivos e significativos^{23, 24}.

Os sistemas Petrifilm® EC e Compact dry® EC foram comparados entre si para a enumeração de *E. coli* após incubação nas temperaturas de 35°C, recomendada pelos fabricantes e 45°C. Neste estudo a enumeração de *E. coli* não foi realizada pelo método tradicional.

O índice de correlação entre Petrifilm® EC e Compact dry® EC a 35°C foi de 0,9925 e a 45°C foi de 0,9887 (Figuras 11 e 12). Os índices obtidos indicam que os sistemas são equivalentes para contagem de *E. coli* em ambas as temperaturas. Porém, quando foram realizadas comparações para contagem de *E. coli* entre

Compact dry® a 35°C e 45°C e entre Petrifilm® EC a 35°C e 45°C foi observado decréscimo nos índices de correlação calculados em 0,8041 e 0,7184, respectivamente (Figuras 13 e 14). A diminuição dos coeficientes mostra que existe diferença nas contagens de *E. coli* de acordo com a temperatura de incubação. Em ambos os sistemas as contagens de *E. coli* foram menores quando as placas foram incubadas a 45°C.

Os resultados obtidos indicam que os métodos rápidos analisados podem ser utilizados para a contagem de *E. coli*, desde que a incubação seja realizada à 35°C. Os resultados das contagens de *E. coli* obtidos a 45°C devem ser ignorados, devendo a diferenciação das colônias, somente ser considerada em placas incubadas a 35°C. Isso pode ser comprovado quando se compara os resultados de contagens de amostras em duplicata incubadas a 35°C e 45°C, em que se observa uma diminuição significativa na contagem de *E. coli* ($p < 0,05$) nas placas incubadas a 45°C, quando comparadas com as contagens a 35°C.

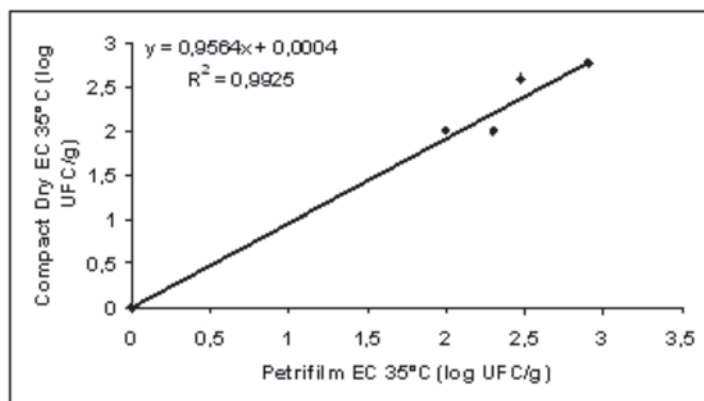


Figura 11. Regressão linear das contagens de *E. coli* obtidas nos sistemas Petrifilm® EC e Compact dry® EC a 35°C em 17 amostras de carne bovina moída.

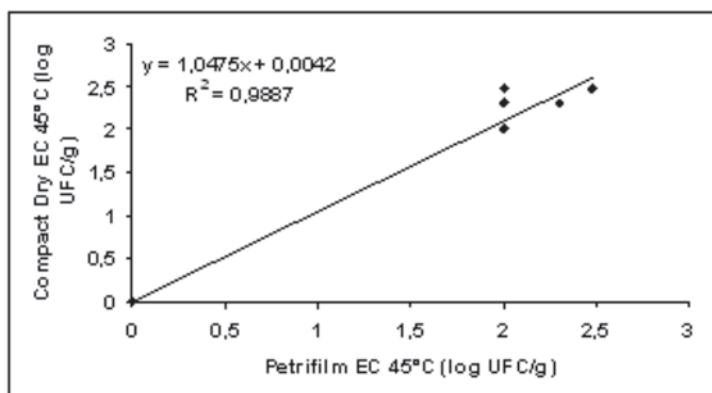


Figura 12. Regressão linear das contagens de *E. coli* obtidas nos sistemas Petrifilm® EC e Compact dry® EC a 45°C em 17 amostras de carne bovina moída.

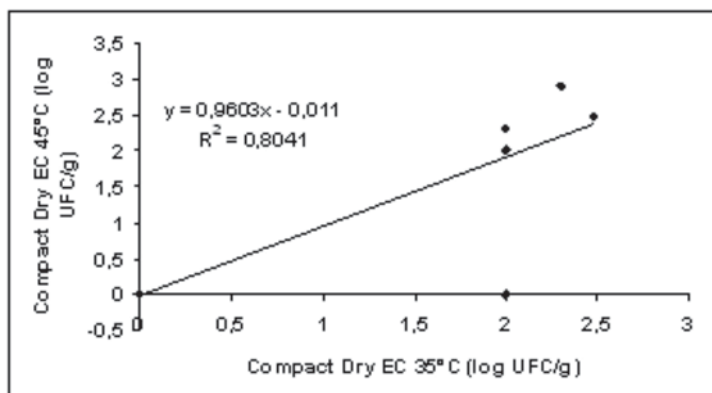


Figura 13. Regressão linear das contagens de *E. coli* obtidas no sistema Compact dry® EC nas diferentes temperaturas de incubação em 17 amostras de carne bovina moída

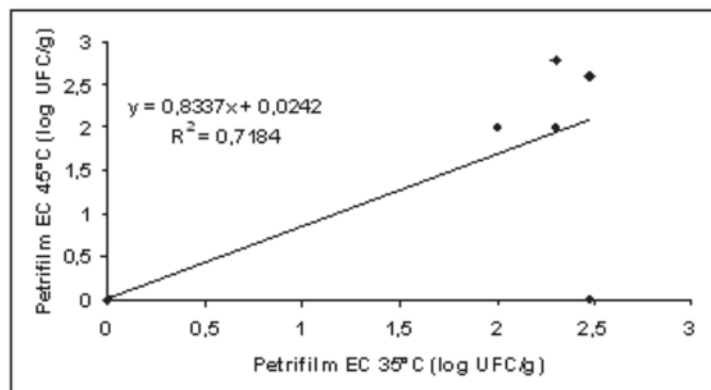


Figura 14. Regressão linear das contagens de *E. coli* obtidas no sistema Petrifilm® EC nas diferentes temperaturas de incubação em 17 amostras de carne bovina moída.

CONCLUSÃO

As correlações encontradas entre as contagens de coliformes totais e coliformes termotolerantes nos sistemas Compact dry® e Petrifilm® EC e a metodologia tradicional indicam que os resultados obtidos através desses métodos rápidos são equivalentes aos obtidos pelo método de referência.

Os resultados obtidos pelos métodos alternativos Compact dry® EC e Petrifilm® EC foram equivalentes na enumeração de *E. coli*, com coeficiente de correlação $R^2 > 0,9$ nas amostras analisadas.

Considerando a boa correlação entre os resultados das metodologias avaliadas e que o Petrifilm® EC e o Compact dry® são sistemas mais simples e práticos, os mesmos podem ser usados como alternativas viáveis nas análises microbiológicas de carne moída bovina, sem comprometer a confiabilidade e a sensibilidade.

REFERÊNCIAS

1. Silva CA, Sousa CP. Estudo da qualidade sanitária da carne moída comercializada na cidade de João Pessoa, PB. *Hig Aliment*. 2004; 18(121): 90-4.
2. Suwansonthichai S, Rengpipat S. Enumeration of coliforms and *Escherichia coli* in frozen black tiger shrimp *Penaeus monodon* by conventional and rapid methods. *Int J Food Microbiol*. 2003, 81(2): 113-21.
3. Loguercio AP, Aleixo JAG. Microbiology of homemade Minas Frescal cheese. *Ciênc Rural*. 2001; 31: 1063-67.
4. Silva N, Junqueira VCA, Silveira NFA. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. São Paulo (BR): Varela, 1996.
5. Franco BDGM, Landgraf M. Microbiologia dos alimentos. 2ed. São Paulo (BR): Atheneu, 1996.
6. Barancelli GV, Sarkis F, Gallo CR, Oliveira AJ. Avaliação de métodos para enumeração de microrganismos aeróbios mesófilos e coliformes em leite cru. *Hig Aliment*. 2004;18(120): 70-84.
7. Bugno A, Almodovar AAB, Pereira TC, Pinto TJA. Aplicabilidade de Petrifilm® na enumeração de bactérias e fungos em drogas vegetais. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2005; 64(1): 20-4.
8. Kodaka H, Mizuochi S, Teramura H, Nirazuka T, Goins D, Odumeru J. et al. Comparison of the Compact Dry EC with the most probable number method (AOAC Official Method 966.24) for enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria in raw meats. *J AOAC Int*. 2006; 89(1): 100-14.
9. Brasil. Instrução Normativa DAS nº62 de 26 de agosto de 2003 do Ministério da Agricultura. Métodos Analíticos Oficiais para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 26 ago. 2003.
10. Fonseca JS, Martins GA. Curso de Estatística. São Paulo (BR): Atlas, 1993.
11. Mizuochi S, Kamiya H, Kodaka H, Sengoku H, Horigome K. Compact dry for the enumeration of bacteria in food. 1999. In: 99th ASM General Meeting, Chicago. 30pp.
12. Kodaka H, Mizuochi S, Teramura H, Nirazuka T, Goins D, Odumeru J. et al. Comparison of the Compact Dry CF with the most probable number method (AOAC Official Method 966.24) for enumeration of coliform bacteria in raw meats. *J AOAC Int*. 2006; 89(1):115-26.
13. Beloti V, Souza JA, Barros MAF, Nero LA, Mattos MR, Gusmão VV, et al. Evaluation of Petrifilm EC and HS for total coliforms and *Escherichia coli* enumeration in water. *Braz J Microbiol*. 2003;34:301-4.
14. Park YH, Seo KS, Ahn JS, Yoo HS, Kim SP. Evaluation of Petrifilm plate method for the enumeration of aerobic microorganisms and coliforms in retail meat samples. *J Food Prot*. 2001;64(11):1841-3.

15. Carvalho CM, Oliveira AJ, Gallo CR. O sistema petrifilm como alternativa aos métodos tradicionais para contagem total de microrganismos aeróbios e coliformes totais em leite cru refrigerado. *Hig Aliment*. 2002; 16(100):116-26.
16. Restaino L; Lyon HR. Efficacy of Petrifilm for enumeration of coliforms and *Escherichia coli* form frozen raw beef. *J Food Prot*. 1987; 50(12):1017-22.
17. Muratori MCS, Oliveira AL, Ribeiro LP, Costa APR, Fernandes SH, Leite RC. Comparación entre el método estándar sugerido por APHA y los métodos Simplate y Petrifilm, para la identificación del grupo coliforme y de *Escherichia coli* em tilapia (*Oreochromis* sp) procedente de piscicultura de agua dulce. *Rev Argent Microbiol*. 2000;32(1):15-9.
18. Ferreira FC. Comparação de diferentes métodos para isolamento de coliformes totais e *Escherichia coli* em cortes de frango. [Tese de Especialização em Biotecnologia e Qualidade de Alimentos]. Minas Gerais: União Educacional Minas Gerais, 2006. 25pp.
19. 3M Company. 3M™Petrifilm™Plates. Folheto teórico, USA, 2004. 4pp.
20. Nissui Co. Simple and Easy Dry Media for Microbial Count and Detection – Compact Dry “Nissui” TC/CF/EC/SA/VP/YM/SL. Folheto teórico, USA, 2006. 8pp.
21. Ortiz MC, Ríos M. Comparación de los métodos Petrifilm y Número Mas Probable (NMP) para La determinación de coliformes fecales em muestras de queso blanco. *Rev Inst Nac Hig Rafael Rangel* 2006; 37(2):15-8.
22. Blackburn CW, Baylis CL, Pettit SB. Evaluation of Petrifilm methods for enumeration of aerobic flora and coliforms in wide range of foods. *Lett Appl Microbiol*. 1996; 22(2):137-40.
23. Schraft H; Watterworth LA. Enumeration of heterotrophs, fecal coliforms and *Escherichia coli* in water: comparison of 3M Petrifilm plates with standard plating procedures. *J Microbiol Methods*. 2005; 60(3):335-42.
24. Priego R, Medina L, Jordano R. Evaluation of Petrifilm series 2000 as a possible Rapid Method to count coliforms in foods. *J Food Prot*. 2000;63(8):1137-40.

Qualidade da água utilizada em escolas atendidas pelo Programa Nacional de Alimentação Escolar (PNAE), em Salvador-BA

Quality of water used in schools supported by National Programme for School Food Provision (NPSFP) in Salvador-BA

RIALA6/1141

Ryzia de Cassia V. CARDOSO^{1*}, Rogéria C. C. ALMEIDA¹, Alaíse G. GUIMARÃES², José Ângelo W. GÓES¹, Sueli A. SILVA³, Aisi A.C. SANTANA³, Larissa B. HUTTNER³, Permínio O. VIDAL Jr.³, Karla V. N. A. FIGUEIREDO⁴

*Endereço para correspondência: ¹Universidade Federal da Bahia (UFBA) Escola de Nutrição, Rua Araújo de Pinho, 32 Campus Canela. CEP: 40.110-150. Salvador, BA/Brasil. E-mail: ryzia@ufba.br. Tel. (71) 3283 7700

² Faculdade de Farmácia/UFBA, Salvador, BA/Brasil.

³ Programa de Iniciação Científica/UFBA, Salvador, BA/Brasil

⁴ Curso de Especialização em Segurança Inspeção de Alimentos /FFAR-UFBA, Salvador, BA/Brasil.

Recebido: 05/10/2007 – Aceito para publicação: 12/12/2007

RESUMO

A água constitui um dos mais importantes recursos para a manutenção da vida, entretanto, doenças associadas à sua contaminação representam uma das maiores ameaças à saúde humana. Este trabalho teve como objetivo avaliar a qualidade da água utilizada em escolas atendidas pelo PNAE, em Salvador-BA. Realizou-se estudo transversal, em amostra estratificada de 83 escolas, 49 municipais e 34 estaduais, nas quais foram coletadas amostras da água usada nas cantinas, em que foram pesquisados coliformes totais e termotolerantes. Adicionalmente, foram levantadas informações quanto à origem e cuidados com a água. Apesar de todas as escolas receberem água do sistema de abastecimento público, em 32% e 22% das amostras colhidas, respectivamente, nas escolas estaduais e municipais, observou-se não conformidade com a legislação vigente; para o conjunto das escolas, a condição de não conformidade foi de 41%. Quanto aos reservatórios, 21% não apresentavam revestimento adequado e em 51% não se identificou a higienização periódica; apenas 17% das escolas dispunham de registros de potabilidade da água. Os resultados obtidos indicam a existência de riscos de contaminação, por meio da água utilizada e ainda, apontam fragilidades no âmbito da implementação do PNAE, o que sugere a necessidade de maior controle, em função da vulnerabilidade das crianças beneficiadas pelo Programa.

Palavras-chave. água potável, qualidade da água, alimentação escolar, higiene de alimentos

ABSTRACT

The water constitutes one of the foremost resources for life sustain, however diseases associated with its contamination have been one of the major threats to human health. This study aimed to assess the quality of drinking water in use in schools supported by NPSFP, in Salvador-BA. A cross-sectional study was performed in a stratified sample from 83 schools, being 49 municipal and 34 state schools, from whence the water samples used in the canteens were collected and analyzed for total and fecal coliforms detection. In addition, information about the water origin and the water care were investigated. Although all schools were supplied by local drinking water distribution system, 32% and 22% of the samples collected from municipal and state schools, respectively, presented no conformity with the effective legislation – in all schools, no conformity condition reached 41%. Regarding to reservoir, in 21% no suitable coating was observed, and 51% had no periodical hygiene procedures; only 17% of the schools showed potable water registers. The results point up the contamination risks from the used drinking water, and point out fragilities on the NPSFP implementation scope, which suggest the necessity of a highest control, facing children vulnerability who are assisted by this Programme.

Key words. drinking water, water quality, school feeding, food hygiene.

INTRODUÇÃO

A água constitui um dos mais importantes recursos para a manutenção da vida. Entretanto, doenças associadas à sua contaminação representam uma das maiores ameaças à saúde humana, fato que descreve confirmação epidemiológica a partir de surtos ocorridos em todo mundo, envolvendo tanto países desenvolvidos quanto aqueles em desenvolvimento^{1,2}.

Bactérias, protozoários, vírus e helmintos, que compreendem os agentes biológicos mais importantes de contaminação da água e, conseqüentemente, dos alimentos, são oriundos principalmente, de contaminação fecal humana e animal das águas destinadas ao consumo. Doenças de origem hídrica decorrem da ingestão (direta ou indireta) de água contaminada por microrganismos patogênicos, sendo essa contaminação mais freqüente em locais onde as condições de saneamento básico são precárias³. Entre os grupos mais expostos ao risco de doenças de veiculação hídrica estão as crianças, pessoas imunossuprimidas e idosos¹.

Quando utilizada na produção primária, processamento e preparo de alimentos, a água deve atender a exigências legais, de natureza físico-química e microbiológica, de modo a não expor a população a riscos, quando do seu consumo direto ou a partir de alimentos por ela contaminados². Nos serviços de alimentação coletiva, uma vez que a água é empregada em diversos procedimentos de higienização, como ingrediente e no preparo de alimentos, assim como para consumo direto é importante que sejam adotadas práticas para sua análise e controles rotineiros de higienização dos reservatórios, requisitos integrantes das Boas Práticas de Produção, exigidos legalmente pela RDC 216/04/ANVISA/MS^{4,5}.

Nesse sentido, o monitoramento da qualidade microbiológica da água destinada ao consumo humano, por meio de pesquisa de agentes contaminantes, principalmente os microrganismos de origem entérica, representa uma possibilidade da diminuição de inúmeros surtos de doenças como cólera, febre tifóide e paratifóide, diarreias infecciosas e gastroenterites dentre outras⁶.

O Programa Nacional de Alimentação Escolar (PNAE), apesar de constituir um dos mais antigos programas na área de alimentação e nutrição do país, atendendo a cerca 36 milhões de alunos - quase 22% da população brasileira⁷, mostra-se insuficiente em ações e informações sistemáticas relativas à infra-estrutura de funcionamento dos seus serviços e à qualidade sanitária da água utilizada e dos alimentos fornecidos.

De modo adverso aos objetivos de promoção à saúde do Programa, estudos conduzidos por investigadores, em diferentes estados do país, evidenciam instalações, condições e práticas impróprias à produção alimentos, colocando em risco a saúde das crianças assistidas^{8,9,10,11}.

Este trabalho, que compreende parte do projeto "Apoio à produção de alimentos seguros em escolas atendidas pelo Programa Nacional de Alimentação Escolar em Salvador-BA" (Processo 505733/04-8/CNPq), constitui uma contribuição ao monitoramento e à geração de informações no âmbito da implementação de um dos maiores programas públicos de alimentação do país. Como objetivo específico busca avaliar a qualidade microbiológica da água utilizada no preparo da alimentação escolar, recurso crítico na determinação da inocuidade dos alimentos distribuídos pelo Programa.

MATERIAL E MÉTODOS

A partir de cálculo específico para formação de amostra estratificada, adotando-se um valor de alfa de 5% e precisão de 0,10, oitenta e três unidades escolares foram investigadas quanto à qualidade microbiológica da água, incluindo 49 municipais e 34 estaduais.

As amostras foram coletadas em condições assépticas, nas cantinas das escolas, e transportadas sob frio, com uso de caixas isotérmicas e gelo reciclável, procedendo-se as análises microbiológicas em período inferior a quatro horas após a coleta.

As análises foram realizadas no Laboratório de Controle de Qualidade dos Alimentos, da Escola de Nutrição – UFBA, utilizando-se para este fim a técnica de tubos múltiplos ou Número Mais Provável (NMP) para estimativa de coliformes totais e termotolerantes, conforme metodologia recomendada pelo *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*¹². Os resultados obtidos foram confrontados com padrões apresentados na Portaria nº 518/04/MS¹³, que estabelece a ausência de coliformes totais e termotolerantes em 100mL de água para consumo.

De modo a descrever melhor a condição de oferta da água nas escolas, foram utilizadas também informações, obtidas por meio da aplicação de formulário estruturado, referentes ao suprimento, armazenamento e controle da qualidade da água.

O estudo foi conduzido entre março e dezembro de 2006. Os resultados foram tratados pelo uso de estatística descritiva.

RESULTADOS

De acordo com os resultados, evidenciou-se não conformidade com a legislação para parte expressiva das unidades escolares investigadas, visto que 32% e 22% das amostras colhidas nas escolas estaduais e municipais, respectivamente (Figuras 1 e 2), registraram a presença de microrganismos do grupo coliformes.

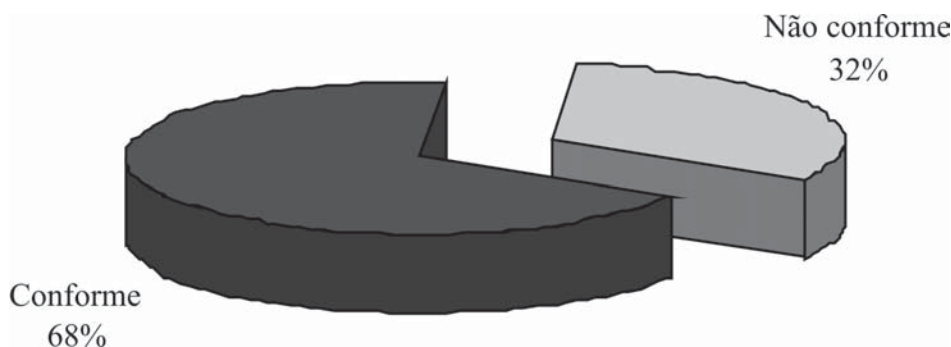


Figura 1. Distribuição (%) das escolas estaduais atendidas pelo PNAE em Salvador-BA, quanto ao atendimento à Portaria 518/04/MS (Brasil, 2004).

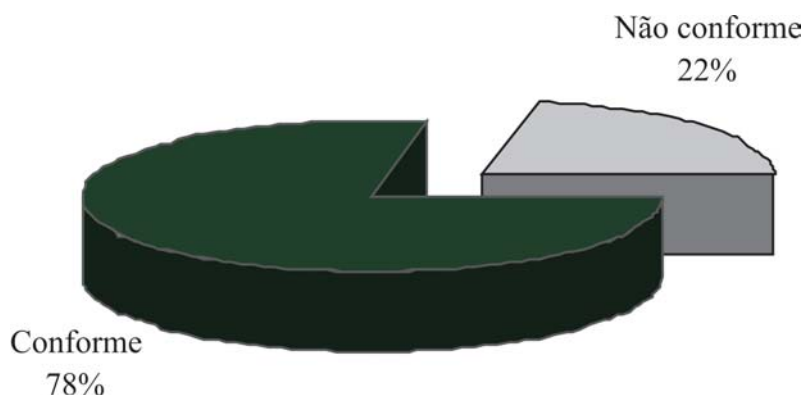


Figura 2. Distribuição (%) das escolas municipais atendidas pelo PNAE em Salvador-BA, quanto ao atendimento à Portaria 518/04/MS (Brasil, 2004).

Nas escolas estaduais, os valores em desacordo com a legislação variaram de 1,1 a >23 NMP/100mL para coliformes totais e termotolerantes, enquanto nas escolas municipais observou-se o intervalo de 1,1 a >23 NMP/100mL para coliformes totais e de 1,1 a 6,9 NMP/100mL para os coliformes termotolerantes.

A avaliação de não conformidade para o conjunto das escolas alcançou 41% (34 unidades), o que representa alto nível de inadequação quanto à qualidade microbiológica da água utilizada na produção da alimentação escolar e para outras finalidades.

Ainda que todas as escolas contassem com o abastecimento de água pelo serviço público, verificou-se, entre os possíveis fatores associados à presença de coliformes, que em 51% dos casos não havia a higienização periódica dos reservatórios e que, apesar de todos terem tampas, 21% não apresentavam revestimento adequado, ou seja, eram revestidos por materiais que não propiciavam a manutenção das características da água de abastecimento –

em apenas 17% das escolas havia registros de potabilidade da água.

DISCUSSÃO

As irregularidades constatadas no presente trabalho, contudo, não se limitam a Salvador, ou mesmo a uma localização geográfica brasileira. Relatos apresentados por autores de regiões distintas do país também evidenciam a criticidade da qualidade da água utilizada em escolas públicas.

Pesquisa conduzida no estado de Goiás, em cidades de diferentes regiões, com a análise de 245 amostras de água nas escolas, reporta um índice de 29,4% de não conformidade em relação aos padrões microbiológicos, valor bem inferior em relação ao encontrado em Salvador. No estudo, foram evidenciadas, ainda, condições insatisfatórias quanto à higienização dos reservatórios e ao controle da potabilidade da água¹⁴, o que se assemelha aos resultados encontrados em Salvador-BA.

Mira¹⁰, em estudo realizado em 339 escolas no estado do Rio de Janeiro, identificou inadequações quanto à qualidade da água, com constatação das seguintes irregularidades: ausência de periodicidade e de técnica correta para a lavagem de caixa d'água e ausência de controle da potabilidade da água; segundo essa autora, verificou-se ainda, expressivo número de escolas que utilizavam água de poço não tratada (4,7%), o que poderia contribuir consideravelmente para aumentar os riscos de veiculação de doenças de origem hídrica.

De modo distinto, na cidade de Curitiba-PR, pesquisa conduzida em 40 escolas da rede estadual constatou que em 97,5% delas havia abastecimento pela rede pública e que em 75% havia a higienização periódica dos reservatórios, com a devida documentação¹⁵.

Os resultados encontrados nas escolas de Salvador foram corroborados posteriormente por dados reportados em relatório da Sub-Coordenadoria de Vigilância em Saúde Ambiental, da Secretaria de Saúde da Prefeitura Municipal de Salvador, que investigou a qualidade microbiológica e físico-química da água em 15 escolas municipais, com coleta de 31 amostras, compreendendo: 15 amostras no ponto de distribuição da empresa de abastecimento público, 15 amostras oriundas das cantinas e uma de tanque subterrâneo¹⁶.

De acordo com esse relatório, 31% das amostras foram positivas para coliformes totais e 16% para coliformes termotolerantes. Cabe destacar, nesse caso, que em três escolas foi identificada a contaminação das amostras de água no ponto de fornecimento pela Empresa Baiana de Água e Saneamento, pela presença de coliformes totais, em estimativas de 38 a >200 NMP/100mL. Adicionalmente, em 33% das amostras o teor de cloro residual livre estava abaixo do parâmetro legal, mínimo de 0,2mg/L.

Embora o presente estudo não tenha apresentado como objetivo investigar a origem da contaminação da água das cantinas escolares, pode-se considerar três vias como possíveis causas: contaminação da água de abastecimento, em virtude de falhas no tratamento e na distribuição; contaminação no ambiente dos estabelecimentos, incluindo reservatórios e sistema de distribuição; e a partir de manipuladores de alimentos².

Nesse sentido, os resultados descritos pela Secretaria de Saúde se encaixam tanto na primeira quanto na segunda forma de contaminação descritas. No segundo caso, destaca-se a existência de tanques subterrâneos nas escolas, que geralmente são de difícil higienização, passíveis de contaminação a partir da rede de esgoto e que, em muitos casos apresentam abertura próxima ao solo e tampas com mau fechamento, o que propicia a contaminação física, química e biológica.

Apesar da insuficiência de publicações quanto à dimensão higiênico-sanitária da implementação do PNAE, os resultados obtidos, acrescidos da evidência de não conformidades em outros estados, mostram com clareza a necessidade de medidas corretivas e do monitoramento da qualidade da água, como uma das ações a ser desenvolvida na

perspectiva de proteção à população de crianças beneficiadas por esse Programa.

CONCLUSÕES

Identificou-se significativo índice de não atendimento quanto aos padrões microbiológicos da água nas escolas, o que reflete condições higiênico-sanitárias inadequadas e a não adoção de um dos principais requisitos das Boas Práticas de Produção, que se refere ao controle da qualidade da água.

Os resultados sinalizam para riscos de contaminação dos alimentos, utensílios e equipamentos nas escolas, a partir da água utilizada, assim como apontam para fragilidades no âmbito da implementação do PNAE, sugerindo a necessidade de maior controle para a qualidade da água utilizada, haja vista a vulnerabilidade das crianças beneficiadas por este Programa.

REFERÊNCIAS

1. World Health Organization. WHO. Guidelines for drinking-water quality [acesso 2007 Jul.10]. Disponível em: http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq3rev/en/index.html
2. Kirby RM, Bartram J, Carr R. Water in food production and processing: quantity and quality concerns. *Food Control* 2003; 14: 283-99.
3. Germano PML, Germano MIS. A água: um problema de segurança nacional. *Hig Aliment* 2001; 15(90/91): 15-8.
4. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária [Internet] [acesso 2004 Set 18] Resolução de Diretoria Colegiada nº 216, 15 de setembro de 2004. Disponível em: <http://legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=12546>.
5. Cardoso RCV, Souza EVA, Santos PQ. Unidades de alimentação e nutrição nos campi da Universidade Federal da Bahia: Um estudo sob a perspectiva de alimento seguro. *Rev Nutr* 2005; 18(5): 669-80.
6. Giombelli A, Rech H, Torres VS. Qualidade microbiológica da água proveniente de poços e fontes de dois municípios da Região do Alto Uruguai Catarinense. *Hig Aliment*. 1998; 12(56): 49-51.
7. Brasil. Ministério da Educação. Fundo Nacional de Desenvolvimento da Educação [Internet] [acesso 2007 Jul 11]. Alimentação Escolar. Disponível em: http://www.fnde.gov.br/home/index.jsp?arquivo=/alimentacao_escolar/alimentacao_esc.html#dadosesta
8. Marchioni DML, Zacarelli EM. Avaliação da temperatura em refeições transportadas de um

- Programa de Alimentação Escolar. Hig Aliment 1999;13(65):13 -8.
9. Silva C. Merenda escolar: levantamento das condições higiênico-sanitárias dos locais de preparação e dos manipuladores em escolas da rede estadual de ensino de São Paulo, SP, Brasil [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2002.
10. Mira FD. Avaliação do Programa de Alimentação Escolar da Rede Estadual de Ensino do Rio de Janeiro [monografia]. Rio de Janeiro: Universidade Estadual do Rio de Janeiro. 2003.
11. Façanha SHF, Ferreira NDL, Monte ALS, Pontes AR. Avaliação da garantia da qualidade higiênico-sanitária do Programa de Alimentação Escolar da cidade de Sobral-CE. Hig Aliment 2002; 16 (100): 54-8.
12. American Public Health of Water and Wastwater. Standard methods for the examination of water and wastewater. 20th Edition. Washington (DC): American Public Health Association, 1998.
13. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária [Internet] [acesso 2004 Set 20]. Portaria nº 518, de 25 de março de 2004. Disponível em: http://elegis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?mode=PRINT_VERSION&id=22322.
4. Goiás. Secretaria de Estado da Saúde. Superintendência de Vigilância Sanitária/Universidade Federal de Goiás (UFG)/Faculdade de Nutrição. Avaliação e monitoramento da qualidade dos alimentos oferecidos na Merenda Escolar – Goiás. Relatório Parcial. 2006.
15. Piragine KO. Aspectos higiênicos sanitários do prepare da merenda escolar na rede estadual de ensino de Curitiba [dissertação]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2005.
16. Salvador. Secretaria Municipal de Saúde. Vigilância em Saúde Ambiental. Ações de promoção à saúde na rede de ensino do município de Salvador – Relatório técnico de visitas. 2007.

Ocorrência de *Staphylococcus* coagulase positiva em queijos Minas tipos frescal e padrão comercializados nas feiras-livres de Goiânia-GO

Occurrence of coagulase positive - *Staphylococci* in fresh and cured types Minas cheese sold at open free market of Goiânia-GO

RIALA6/1142

Marcele L. T. ARRUDA^{1*}, Edmar S. NICOLAU², Alline P. REIS¹, Aariane S. ARAÚJO³, Albenones J. MESQUITA².

* Endereço para correspondência: Quadra 02 conjunto B/10 casa 26, Sobradinho, DF/Brasil CEP 73015-210, marcelelouse@gmail.com

¹Médica Veterinária, Mestre em Ciência Animal/Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia, GO/Brasil.

²Professores da Escola de Veterinária/ Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia, GO/Brasil.

³Acadêmica do Curso de graduação em Engenharia de Alimentos/ Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia, GO/Brasil.

Recebido: 31/09/2007 – Aceito para publicação: 01/11/2007

RESUMO

O queijo Minas, produto largamente consumido no Brasil, por vezes fabricado de forma inadequada, pode causar intoxicações alimentares. Nesses eventos o *Staphylococcus aureus* desempenha importante papel. Desenvolveu-se este trabalho com objetivo de determinar a ocorrência de *Staphylococcus* coagulase positivo em queijos comercializados em feiras-livres de Goiânia-GO. Foram analisadas 84 amostras (42 de queijo Minas frescal e 42 de Minas padrão) oriundas de 21 feiras-livres distribuídas pela cidade de Goiânia, cuja extensão foi dividida em quatro quadrantes para sorteio das feiras. As amostras coletadas foram submetidas à análise para contagem de *Staphylococcus* coagulase positivo. Os valores médios de contaminação por *Staphylococcus* coagulase positivo de queijos frescos foram: $6,3 \times 10^4$; $9,3 \times 10^4$; $3,8 \times 10^3$ e $5,6 \times 10^4$ UFC/g, respectivamente para os quadrantes I, II, III e IV. Para os queijos Minas padrão, os valores médios foram: $1,8 \times 10^5$; $1,3 \times 10^3$; $1,3 \times 10^4$. Os queijos Minas comercializados em feiras-livres de Goiânia/GO apresentam elevadas contagens de *Staphylococcus* coagulase positivo, que podem representar risco para o consumidor.

Palavras-chave. microbiologia de alimentos, queijo Minas, *Staphylococcus aureus*

ABSTRACT

Minas cheese is widely consumed in Brazil. This cheese is often made in an inadequate and inaccurately way, which could be a cause foodborne disease, and among these microorganisms *Staphylococcus aureus* plays a crucial role. This study was performed in order to evaluate the cheese commercialized at open free market in Goiânia-GO concerning the contamination by coagulase positive - *Staphylococcus*. Eighty-four samples (42 samples of fresh Minas cheese and 42 samples of cured one) were collected from 21 open markets set up in different locations of Goiânia, and to conduct this study the local extension was divided into four quadrants. Cheese samples were analyzed for coagulase positive - *Staphylococcus* counting. The mean values of coagulase positive-*Staphylococcus* counting were 6.3×10^4 ; 9.3×10^4 ; 3.8×10^3 and 5.6×10^4 CFU/g in fresh Minas cheese collected from quadrants I, II, III, and IV, respectively. In cured Minas cheese, the mean values of counting were: 1.8×10^5 ; 1.3×10^3 ; 1.3×10^4 and 2.5×10^2 CFU/g, in samples collected from quadrants I, II, III e IV, respectively. The mean values for coagulase positive-*Staphylococcus* counting in cured cheese were higher in samples from quadrants I and III. In conclusion Minas cheese samples commercialized at open market located in Goiânia-GO present high counting of coagulase positive-*Staphylococcus*, and the occurrence of pathogenic microorganisms might be a risk of contamination to consumers.

Key words. food microbiology, Minas cheese, *Staphylococcus aureus*.

INTRODUÇÃO

Historicamente, os queijos e o leite permitiram que populações sobrevivessem a períodos de extrema escassez de alimentos¹. Nutricionalmente, o queijo representa rica fonte de proteínas de alta qualidade, com alto percentual de gordura e cálcio, contendo ainda fósforo, riboflavina e vitamina A².

Economicamente, acredita-se que o queijo seja um dos produtos alimentícios com maior demanda reprimida, até mesmo entre as classes de maior renda³. O mercado de queijo no Brasil foi avaliado em US\$ 1 bilhão/ano e, apesar da presença das multinacionais e da concentração nos mercados de queijos finos, os queijos tradicionais produzidos em condições semi-artesaniais ainda representam grande peso neste mercado⁴.

Nacionalmente, compete às indústrias de menor porte a produção dos queijos Minas e Mussarela, enquanto as de maior porte dedicam-se à fabricação de produtos lácteos mais sofisticados⁵. Além disso, por apresentar baixa visibilidade de marca, os queijos tradicionais, sofrem constante depressão de preços e este segmento torna-se vulnerável à indústria informal pela falta de barreiras tecnológicas⁴.

Estes fatores associados ao contexto econômico a partir da década de 80 resultaram em significativo impulso na produção do queijo Minas principalmente devido ao maior rendimento do produto, ao fácil processamento e à estocagem dispensável em relação a outros tipos de queijo. Desta forma, a indústria, ao optar pelo queijo Minas frescal passou a fabricar um produto com menor exigência de capital de giro, adequando-se à queda do poder aquisitivo dos consumidores⁵.

De acordo com a legislação brasileira o queijo Minas frescal é um produto fresco, semi-gordo (com 38 a 47% de gordura no extrato seco), de muito alta umidade (de 55 a 60% de umidade), obtido pela coagulação enzimática do leite com o coalho e/ou outras enzimas coagulantes apropriadas⁶. Tendo em vista estas características, a sua vida de prateleira é de 7 a 10 dias⁸ e o produto deve ser mantido sob refrigeração em temperaturas abaixo de 8°C durante sua cadeia de comercialização⁹.

O queijo Minas padrão passa por um período de maturação de 20 dias, em média. A legislação brasileira o caracteriza como um produto fresco, de alta umidade (46 a 49% de umidade), semigordo ou gordo (43 a 49% de gordura extrato seco), conforme elaboração⁷. A vida de prateleira é mais longa, de 2 a 3 meses, e durante sua comercialização também é necessário que a refrigeração seja controlada⁸.

O processo de preparo desses queijos requer constante manipulação que, por vezes, é realizado por pessoas sem nenhum conhecimento e/ou cuidado de higiene, como os estafilococos estão primordialmente associados à mucosa e pele de animais de sangue quente são comumente isolados em alimentos, poeira e água¹⁰.

De acordo com a nona edição do Manual Bergey's, o gênero *Staphylococcus* é subdividido em 27 espécies¹⁰

sendo o *Staphylococcus aureus* a espécie mais freqüentemente associada às doenças estafilocócicas, veiculadas ou não por alimentos¹¹.

Staphylococcus são bactérias mesófilas que apresentam temperatura de multiplicação na faixa de 7°C a 47,8°C¹², com temperatura ideal de 30-37°C¹⁰. São cocos Gram-positivos, imóveis, não formadores de esporos e anaeróbios facultativos que podem ocorrer em pares, separadamente ou em cachos irregulares¹⁰. São bastante tolerantes a concentrações de sal de 10% a 20% e a nitratos e são capazes de multiplicar em condições de atividade de água (Aa) inferiores a 0,86¹¹.

Os estafilococos são comumente encontrados nas fossas nasais, garganta, leito subungüal e pele de portadores, portanto, os manipuladores de alimentos constituem importante fonte de disseminação desses microrganismos patogênicos, principalmente para os alimentos e demais funcionários¹³.

Alimentos que requerem considerável manipulação durante o seu preparo e cuja temperatura de conservação seja inadequada são passíveis de causar este tipo de intoxicação¹⁴, como é o caso dos queijos Minas frescal e padrão.

A intoxicação alimentar causada por esta bactéria, conhecida por intoxicação estafilocócica, é causada pela enterotoxina termoestável produzida pelo *S.aureus*¹⁵ e pode ser contraída pela ingestão de alimentos, inicialmente contaminados por esta bactéria, submetidos a temperaturas de cocção insuficientes para provocar sua destruição e submetidos a temperaturas inadequadas de conservação. Alimentos contaminados após o preparo e mantidos sob temperaturas que permitam a multiplicação do microrganismo também são potenciais causadores de intoxicação estafilocócica¹⁴. Geralmente, a produção da enterotoxina, ocorre quando a bactéria está no alimento em concentrações em torno de 10⁵ UFC/g¹⁶.

Tendo em vista o grande consumo de queijo Minas no Brasil, as condições de fabricação e suas características físico-químicas, desenvolveu-se o presente trabalho com o objetivo de determinar a ocorrência de *Staphylococcus* coagulase positivo em queijos comercializados em feiras-livres de Goiânia-GO.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem

No período de maio a setembro de 2005, foram colhidas e analisadas 84 (oitenta e quatro) amostras de queijos Minas oriundos de 21 (vinte e uma) feiras-livres do município de Goiânia/GO. Em cada uma das feiras, foram escolhidas aleatoriamente duas bancas e em cada uma delas foram colhidas duas amostras de queijo, sendo uma amostra do produto tipo frescal e outra do produto tipo padrão; perfazendo assim um total de quatro amostras de queijo por feira.

Para efeito de sorteio, o mapa de Goiânia-GO foi dividido em quatro quadrantes. Como ponto central foi definido a Praça Cívica. Feiras noturnas não participaram do sorteio por privilegiarem o comércio de roupas e artesanato.

No momento da organização do sorteio, observou-se que o IV quadrante possuía apenas 6 feiras-livres e, no momento da coleta, constatou-se que duas feiras do quadrante IV e uma no quadrante I eram muito pequenas e não dispunham de bancas de venda de queijo. Assim os quadrantes I, II, III e IV foram representados respectivamente por 5, 6, 6 e 4 feiras.

No momento da aquisição dos queijos que compuseram a amostragem foram observadas as características ideais para o produto, quais sejam: coloração branco-amarelada, aroma suave e consistência macia, para os queijos minas frescal.

As amostras eram colhidas antes das 10 horas da manhã. Em todas as feiras, os queijos eram mantidos em ambiente não refrigerado. Sendo importante salientar, que a temperatura média ambiente no período de maio a setembro varia de 22°C a 24,6°C¹⁷. Uma vez colhidas, eram acondicionadas em sacos plásticos para produtos alimentícios evitando o contato manual, e postas em caixas isotérmicas contendo gelo “reciclável” e transportadas ao Centro de Pesquisas em Alimentos (CPA) da Escola de Veterinária da UFG para análise. Aqueles queijos que não puderam ser analisados imediatamente foram mantidos sob refrigeração por um prazo máximo de 48 horas e em seguida analisados.

Para as análises microbiológicas foram pesados asepticamente 10 gramas de queijo e homogeneizados em Stomacher juntamente com 90ml de solução de citrato de sódio a 2%¹⁸, durante dois minutos, obtendo-se assim, uma diluição 10⁻¹. A partir das diluições 10⁻¹ foram preparadas diluições seriadas de 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴ e 10⁻⁵ usando como diluente a água peptonada 0,1%¹⁹.

Em seguida, foi semeado 0,1mL de cada diluição sobre a superfície seca do ágar Baird-Parker. Com o auxílio de alça de Drigalski ou bastão do tipo “hockey”, o inóculo foi espalhado cuidadosamente por toda a superfície do meio, até sua completa absorção. As placas foram incubadas invertidas a 36°C ± 1°C por 30 a 48 horas.

As placas selecionadas para a contagem foram aquelas que continham entre 20 e 200 colônias. Foram selecionadas de 3 a 5 colônias típicas e atípicas, para inoculação, individualmente, em tubos contendo Brain Heart Infusion Broth (BHI). Foram incubadas a 36°C±1°C, por 24 horas. A partir das culturas em caldo BHI efetuou-se a prova de coagulase²⁰ e as seguintes provas complementares: Prova de Catalase, Termonuclease, Teste de Oxidação e Fermentação da Glicose e Manitol e Produção de Acetoína¹⁹

Delineamento Estatístico

Foram utilizadas estatísticas descritivas e distribuições de frequência e análise de variância do delineamento inteiramente casualizado, com a média dos tratamentos comparada pelo teste F²¹.

Tais procedimentos estatísticos foram empregados na análise biométrica do experimento, tanto na comparação entre quadrantes como nas comparações entre feiras dentro de cada quadrante, e os dados foram tabulados em um quadro auxiliar.

Para as comparações entre as médias das variáveis estudadas, utilizou-se o teste de Tukey²⁰.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores médios das contagens de *Staphylococcus* coagulase positiva de cada quadrante, estão representados na Tabela 1. A análise de variância pode ser visualizada na Tabela 2.

No quadrante I para o queijo Minas frescal (Tabela 1), a menor contagem média de *Staphylococcus* coagulase positiva neste quadrante foi de 1,0 x 10¹ UFC/g na Feira E e a maior contaminação por esta bactéria foi representada por uma contagem média de 2,6 x 10⁶ UFC/g na Feira A. Todas as amostras analisadas neste quadrante, com exceção das amostras da feira E, apresentaram contagens de *S.aureus* em níveis passíveis de causar intoxicação alimentar (acima de 10⁵ UFC/g)¹⁶.

Em relação às contagens de *Staphylococcus* coagulase positiva dos queijos Minas padrão das feiras do Quadrante I (Tabela 1), os queijos Feira A tiveram com contagem média de 1,1 x 10³ UFC/g, o que representa boa qualidade microbiológica. Neste quadrante, as únicas amostras de queijo Minas padrão com valores de contagens individuais que apresentavam pouco risco de intoxicação estafilocócica foram: Feira A (amostra 1 - < 1,0 x 10¹UFC/g), Feira D (amostra 2 - 5,4 x 10⁴UFC/g) e Feira E (amostra 1 - 6,3 x 10⁴UFC/g), as demais amostras representavam risco ao consumidor com valores de contagem de *Staphylococcus* coagulase positivo acima da contagem mínima necessária à produção de enterotoxina (10⁵UFC/g)¹⁶.

No quadrante II a Feira K apresentou a menor contagem média de *Staphylococcus* coagulase positiva - 4,4 x 10²UFC/g - para o queijo Minas frescal. As amostras deste queijo coletadas nesta feira (2,2 x 10⁴UFC/g e < 1,0 x 10¹UFC/g) e aquelas coletadas na Feira J (5,0 x 10⁴UFC/g e 4,3 x 10²UFC/g) foram as únicas que representaram baixo risco ao consumidor de intoxicação alimentar por *Staphylococcus aureus*¹⁶. A amostra de queijo Minas frescal de maior contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva neste quadrante - 2,8 x 10⁶UFC/g - foi colhida em banca da Feira F.

No quadrante III, (Tabela 1) para o Minas frescal, a feira de melhor qualidade foi a Feira Q (Tabela 1) com média de 2,8 x 10²UFC/g, onde as duas amostras coletadas representaram baixo risco de intoxicação alimentar por *Staphylococcus aureus*, fato observado também nas Feiras O e P. Na comparação dos queijos Minas padrão, a feira de melhor qualidade foi a Feira N com média de 2,5 x 10² UFC/g, representando baixo risco de contaminação alimentar estafilocócica¹⁶.

Em referência ao quadrante IV (Tabela 1) a feira onde foram coletadas as amostras de melhor qualidade foi a Feira U, com média de $7,2 \times 10^4$ UFC/g. Em uma das feiras deste quadrante foi encontrada a maior contagem média dentre as amostras coletadas neste estudo: $2,3 \times 10^7$ UFC/g em queijos frescos colhidos na Feira R.

Os valores médios das contagens de *Staphylococcus* coagulase positiva obtidas de queijos Minas padrão no quadrante IV foram consideradas relativamente baixas, apesar de terem sido observadas elevadas contagens isoladas (Feira R – $1,0 \times 10^5$ UFC/g e Feira S - $1,0 \times 10^6$ UFC/g), passíveis de causar intoxicação.

Tabela 1. Valores médios de contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva (UFC/g) em queijo Minas frescal e padrão colhidos em feiras-livres na cidade de Goiânia, 2005.

Local	Tipo de Queijo	
	Minas frescal	Minas padrão
Quadrante I		
Feira A	$2,6 \times 10^6$ a	$1,1 \times 10^3$ a
Feira B	$5,4 \times 10^5$ ab	$1,8 \times 10^6$ a
Feira C	$3,7 \times 10^5$ b	$1,6 \times 10^6$ a
Feira D	$1,9 \times 10^5$ b	$1,5 \times 10^6$ a
Feira E	$1,0 \times 10^1$ c	$3,9 \times 10^5$ a
Quadrante II		
Feira F	$9,6 \times 10^5$ a	$7,4 \times 10^3$ a
Feira G	$4,9 \times 10^6$ a	$3,0 \times 10^2$ a
Feira H	$4,1 \times 10^5$ a	$1,0 \times 10^1$ a
Feira I	$1,7 \times 10^5$ a	$2,8 \times 10^3$ a
Feira J	$4,6 \times 10^3$ a	$9,3 \times 10^4$ a
Feira K	$4,4 \times 10^2$ a	$9,5 \times 10^2$ a
Quadrante III		
Feira L	$1,3 \times 10^4$ a	$4,1 \times 10^3$ a
Feira M	$1,7 \times 10^4$ a	$4,2 \times 10^3$ a
Feira N	$1,0 \times 10^3$ a	$2,5 \times 10^2$ a
Feira O	$8,6 \times 10^4$ a	$4,6 \times 10^5$ a
Feira P	$6,0 \times 10^2$ a	$6,1 \times 10^3$ a
Feira Q	$2,8 \times 10^2$ a	$4,9 \times 10^5$ a
Quadrante IV		
Feira R	$2,3 \times 10^7$ a	$9,4 \times 10^2$ a
Feira S	$3,1 \times 10^3$ a	$3,0 \times 10^3$ a
Feira T	$1,9 \times 10^3$ a	$1,0 \times 10^1$ a
Feira U	$7,2 \times 10^4$ a	$1,4 \times 10^2$ a
Entre Quadrantes		
Quadrante I	$6,3 \times 10^4$ a	$1,8 \times 10^5$ a
Quadrante II	$9,3 \times 10^4$ a	$1,3 \times 10^3$ b
Quadrante III	$3,8 \times 10^3$ a	$1,3 \times 10^4$ ab
Quadrante IV	$5,6 \times 10^4$ a	$2,5 \times 10^2$ b

Obs: Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si (teste t para múltiplas médias, $p < 0,05$).

Observa-se na Tabela 2, que não há diferença significativa ($P>0,05$) na comparação entre queijos Minas frescal entre os quatro quadrantes. A maior contaminação por *Staphylococcus* coagulase positivo para o queijo Minas frescal foi apresentada pelo Quadrante II, com média de $9,3 \times 10^4$ UFC/g. Por outro lado o queijo Minas padrão apresentou diferença significativa ($P>0,05$) entre os quadrantes sendo os quadrantes I e III os mais contaminados, com médias de $1,8 \times 10^5$ UFC/g e $1,3 \times 10^4$ UFC/g, respectivamente e o quadrante I o único a diferir dos demais.

Comparando-se os valores médios de cada quadrante para os diferentes queijos, observa-se que os queijos Minas padrão apresentaram contagens superiores aos queijos Minas frescal, nos quadrantes I e III.

Os valores de tolerância para a contagem de *Staphylococcus* coagulase positivo em queijos expostos à comercialização, podem variar de acordo com o teor de umidade dos queijos. Para queijos de muito alta umidade, característica

no qual se enquadra o queijo Minas frescal, os valores de tolerância são de $5,0 \times 10^2$ UFC/g. Já para os queijos de alta umidade, dentre eles, o queijo Minas padrão, os valores de tolerância para contagem de *Staphylococcus* coagulase positivo são de 10^3 UFC/g²¹.

Ao analisar as contagens médias obtidas no quadrante I (Tabela 1), observa-se que apenas 20% dos queijos frescos apresentavam contagens inferiores aos valores de tolerância, sendo estes produtos adquiridos em uma mesma feira (Feira E). Dentre os queijos Minas padrão, todos estão em desacordo com as normas estabelecidas pela legislação nacional²¹.

No quadrante II (Tabela 2), 16,6% dos valores médios das contagens obtidas para os queijos Minas frescal se encontravam em acordo com os padrões estabelecidos e 50% das contagens médias para os queijos Minas padrão foram considerados aceitáveis para o consumo em relação às contagens de *Staphylococcus* coagulase positivo.

Tabela 2. Análise de Variância para a contagem de *Staphylococcus* coagulase positiva (UFC/g) em queijo Minas frescal e padrão colhidos em feiras-livres na cidade de Goiânia-GO em cada um dos quadrantes e entre quadrantes.

FV	GL	Quadrado Médio Minas frescal	Minas padrão
Quadrante 1			
Feiras	4	9,3801**	3,9913
Resíduo	5	0,1944	2,0660
CV		4,1067	26,81
X _G		$6,3 \times 10^4$	$1,8 \times 10^5$
Quadrante 2			
Feiras	5	3,5407	3,6166
Resíduo	6	1,4563	6,9648
CV		25,0811	84,0423
X _G		$9,3 \times 10^4$	$1,3 \times 10^3$
Quadrante 3			
Feiras	5	1,4199	3,3252
Resíduo	6	4,3394	8,6204
CV		59,2738	70,8076
X _G		$3,8 \times 10^3$	$1,3 \times 10^4$
Quadrante 4			
Feiras	3	6,9347	2,3907
Resíduo	4	6,1069	5,7991
CV		51,9144	99,7041
X _G		$5,6 \times 10^4$	$2,5 \times 10^2$

FV: Fonte de variação; GL: Grau de liberdade; CV: Coeficiente de variação; X_G: Média geral de todas as observações; * e **: Significativos a 5% e 1% respectivamente.

No quadrante III, tanto para o queijo Minas frescal quanto para o Minas padrão, 16,6% dos valores médios obtidos das amostras analisadas estavam de acordo com o padrão estabelecido pela legislação.

No quadrante IV foram encontrados os melhores resultados para queijos Minas padrão (Tabela 1). Dos valores médios referentes aos queijos Minas frescal colhidos neste quadrante, 100% foram consideradas inaceitáveis para o consumo. Para os queijos Minas padrão, a porcentagem de produtos aceitáveis para o consumo foi de 75%.

A partir de uma observação global, observou-se que 100% dos valores médios para os queijos Minas frescal colhidos para este estudo apresentaram contagens de *Staphylococcus coagulase* positivo superiores aos limites estabelecidos pela ANVISA²¹. Apenas 25% dos valores médios relacionados aos queijos Minas padrão foram considerados aceitáveis para o consumo.

A comparação destes resultados com estudos realizados em outros estados brasileiros permitiu observar que os queijos Minas frescal comercializados em Poços de Caldas - MG²² e Campo Grande - MS² apresentavam melhor qualidade microbiológica quanto à presença de *Staphylococcus aureus*, pois 50% e 70% das amostras, respectivamente, apresentaram contagem acima de $1,0 \times 10^3$ UFC/g. Da mesma forma, os queijos Minas frescal comercializados em Campo Grande - MT apresentavam melhor qualidade microbiológica relacionada à presença deste patógeno, pois 96,67% das amostras apresentaram contagem acima de $1,0 \times 10^3$ UFC/g²³.

Os queijos Minas frescal e padrão comercializados em feiras-livres da capital goiana apresentaram elevadas contagens de *Staphylococcus coagulase* positivo e seu consumo pode representar um perigo para o consumidor.

REFERÊNCIAS

1. Kosikowski F. Cheese and Fermented Milk Foods, Ed. 2. Michigan: Edwards Brothers, Inc, 700p. 1982.
2. Câmara SAV, Amaral GB, Muller MT, Silveira KCS, Almeida TN, Medeiro CF Avaliação microbiológica de queijos tipo Minas frescal artesanal, comercializados no mercado municipal de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, 2000. Hig Aliment 2002; 16 (101): 32-6.
3. Macedo MA, Albuquerque LC. Queijos no Mundo, volume V: Sistema Integrado de Qualidade, Marketing – Uma Ferramenta Competitiva. Juiz de Fora: Templo Gráfica e Editora, 2003.
4. Wilkinson J. Estudo da competitividade da indústria brasileira: competitividade da indústria de laticínios. Campinas, MCT/FINEP/PADCT, 1993. [acesso em 15Dec 2006] Disponível em: <http://www.mct.gov.br/publi/Compet/Default.htm>.
5. Pinto PSA, Germano MIS, Germano PML. Qualidade do Queijo. In: Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos, 2nd ed. São Paulo: Editora Varela; 2003. p. 111-23.
6. Brasil. Resolução Mercosul/GMC/RES.Nº145/96 de 13 de dezembro de 1996. Regulamento Técnico MERCOSUL de Identidade e Qualidade de Queijo Minas frescal do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 1996 [acesso em 20 Nov 2005] Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/consultasislegis/doconsultaLei?op=viewTextual&codigo=5774>.
7. Brasil. Instrução Normativa nº 4, de 1 de março de 2004. Inclui o termo “Muito” na expressão “Alto Umidade” nos itens 2.2 (Classificação), 4.2.3 (Requisitos Físico-Químicos) e 5.1 (Aditivos), no Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade do Queijo Minas do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2004 [acesso 2005 Nov 20] Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/consultasislegis/doconsultaLei?op=viewTextual&codigo=5974>.
8. Furtado MM. Quesos Típicos de Latinoamérica, 1st ed. São Paulo (SP): Fonte Comunicação e Editora; 2005.
9. Bressan MC. Apostila - Legislação de Alimentos de Origem Animal, Lavras (MG): UFLA/FAEPE; 2002.
10. Holt JG, Krieg NR, Sneath JT, Staley JT, Williams ST. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9th ed. Baltimore: Willians&Wilkins; 1994.
11. Franco BDGM, Landgraf M. Microbiologia de Alimentos. São Paulo: Atheneu; 2004.
12. Jay JJ, Microbiologia de Alimentos. Porto Alegre: Artmed; 2005.
13. Vanzo SP, Azevedo RVP. Detecção de *S.aureus* em Manipuladores de Alimentos – Perfil de Resistência a Antibióticos e Quimioterápicos. Hig Aliment 2003, 17 (104/105): 114-23.
14. Germano PML, Germano MIS. Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos. São Paulo: Varela, 2003.
15. Genigeorgis CA. Present state of knowledge on *Staphylococcus* intoxication. Int J Food Microbiol 1989; 9: 327-60.
16. Almeida PMP, Franco RM. Avaliação Bacteriológica de Queijo Tipo Minas Frescal com Pesquisa de Patógenos Importantes à Saúde Pública: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp e Coliformes Fecais. Hig Aliment 2003; 17 (111): 79-85.
17. Brasil. Instituto Nacional de Meteorologia. Gráficos Climatológicos/Temperatura média/ 1661-1990. [acesso em 22 Out 2007] Disponível em: <http://www.inmet.gov.br/html/clima/graficos/index4.html>
18. Silva N, Junqueira VCA, Silveira NFA. Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos. 2nd ed. São Paulo: Livraria Varela, 2001.
19. Brasil. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003 do Ministério da Agricultura,

- Pecuária e Abastecimento. Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e água. 2003 [acesso em 31 Nov 2005] Disponível em:<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=2851>.
20. Brasil. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001 da ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. 2001 [acesso 2005 Nov 20] Disponível em: <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php>.
 21. Centeno AJ. Curso de estatística aplicada à biologia. Goiânia: CEGRAF, 186p. 1990.
 22. Almeida Filho ES, Nader Filho A. Ocorrência de *Staphylococcus aureus* em queijo tipo “frescal”. *Rev Saúde Pública* 2003; 34(6): 578-80.
 23. Loguercio, AP, Aleixo JAG. Microbiologia de Queijo Tipo Minas frescal Produzido Artesanalmente. *Ciência Rural*, 2001; 31(6):1063-67.

Avaliação das características físico-químicas de ricotas comercializadas no município de Campinas-SP e da conformidade das informações nutricionais declaradas nos rótulos

Physical-chemical characteristics of the ricotta cheese samples on sale in the local markets of Campinas City, SP, Brazil, and the compliance of the nutritional information on the labels assessment

RIALA6/1143

Luciana M.R. ESPER*, Patrícia A. BONETS, Arnaldo Y. KUAYE

*¹Endereço para correspondência: FEA-UNICAMP – Faculdade de Engenharia de Alimentos – Rua Monteiro Lobato, nº 80 Campinas, SP/Brasil, fone: (19) 3521 4097. e-mail lumaesper@gmail.com
Recebido: 17/09/2007 – Aceito para publicação: 10/12/2007

RESUMO

O Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) estabelece alguns parâmetros de identidade e qualidade para a ricota, mas sem definir parâmetros físico-químicos importantes que possibilitam uma classificação mais específica do produto. Este trabalho teve como objetivo avaliar o perfil relativo à composição físico-química de ricotas comerciais e a conformidade dos valores declarados na tabela de “informação nutricional” dos rótulos, com aqueles obtidos por análises laboratoriais, tendo como referência as exigências da Resolução da Diretoria Colegiada RDC nº360/2003 da ANVISA. Foram coletadas 45 amostras, constituídas por três lotes de 15 diferentes marcas e os parâmetros avaliados foram umidade, gordura, gordura no extrato seco, proteína, sal, cinza, acidez em ácido láctico e pH. As análises revelaram uma variação muito grande na composição dos diferentes constituintes dos produtos e as informações nutricionais, na maioria dos rótulos, se apresentavam em desacordo com a legislação ($> \pm 20\%$ de tolerância). Esta grande variação na composição físico-química da ricota, provavelmente esta associada a diversidade de alternativas tecnológicas utilizadas pelos diferentes produtores. Estes resultados sinalizam a necessidade do estabelecimento de padrões de identidade e qualidade mais definidos visando o melhor controle de qualidade do produto e a segurança do consumidor.

Palavras chaves. ricota, físico-química, rotulagem nutricional

ABSTRACT

The Brazilian Regulation for industrial and sanitary inspection of animal by-products (RIISPOA-Brazil), establishes some identity and quality parameters for ricotta cheese, without defining important physical-chemical characteristics which could specifically classify the product better. The objective of this investigation was to evaluate the commercially available ricotta cheeses with respect to physical-chemical composition, and the conformity of the declared values on the “nutritional information” table in the label, with those found at official laboratory analyses, taking into account the requirements established by Resolution RDC nº 360/2003 of the Brazilian Regulatory Agency ANVISA as the reference. Forty five samples consisted of three batches of 15 different brands of ricotta cheese were collected, and the analysed parameters were moisture, fat contents, protein, salt content, ash, titratable acidity, and pH. These analyses showed a considerable variations on the diverse product constituents, and the majority of the nutritional information on the labels failed to comply with the legislation ($> \pm 20\%$ tolerance). This high variation on ricotta cheeses physical-chemical composition might probably be associated with the diversity of alternative technologies used by the different manufacturers. These results indicated the need in establishing well-defined identity and quality standards aiming at product quality control and consumer safety improvement.

Key words. ricotta cheese, physical-chemical characteristics, nutritional labeling.

INTRODUÇÃO

A ricota é um queijo fresco de origem italiana, obtido pela precipitação das proteínas do soro do queijo, por acidificação associada ao calor¹. A elaboração da ricota visa agregar valor ao soro, considerado um resíduo.

A produção anual brasileira de ricota aumentou significativamente nos últimos anos. Em 1991 era de cerca de 4,1t e no ano de 2003 praticamente dobrou, passando para 8,2t².

Um dos fatores para esse aumento expressivo seria a busca crescente de uma alimentação mais saudável e com baixo valor calórico. Verifica-se, portanto, a necessidade da garantia da qualidade e segurança para este tipo de produto.

O Regulamento de Inspeção Industrial Sanitária de Produtos de Origem Animal (RISPOA)³ é o único diploma legal brasileiro vigente onde se descreve alguns parâmetros de identidade e qualidade para a ricota. O artigo 610 define ricota fresca como um produto obtido da albumina do soro de queijos, adicionado de leite em até 20% do seu volume. Algumas características sensoriais, tais como consistência, textura, cor, além de formato e peso também são estabelecidas.

Em geral, observa-se no mercado a oferta de ricotas com diferentes características, fato este motivado pela produção artesanal e também pela ausência de regulamento técnico mais definido. A inexistência de padrões legais pode ser prejudicial ao próprio controle oficial de qualidade destes produtos; por exemplo, a falta de definição de um parâmetro físico-químico, como o teor de umidade, dificulta a interpretação dos resultados do controle microbiológico conforme estabelecido na RDC n° 12, de 02/01/2001⁴.

O objetivo deste trabalho foi realizar o diagnóstico da qualidade de ricotas oferecidas ao consumidor baseado em avaliações físico-químicas o que poderá contribuir para o estabelecimento de diretrizes para fixação de padrões de identidade e qualidade mais específicos; bem como avaliar a conformidade das informações nutricionais declaradas nos rótulos com os parâmetros estabelecidos pela RDC n° 360 de 23/12/2003⁵ e com os dados obtidos por análises laboratoriais.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas 45 amostras de ricota, no primeiro semestre de 2005, sendo 15 diferentes marcas comerciais com registro no Serviço de Inspeção Federal (SIF) ou no Serviço de Inspeção no Estado de São Paulo (SISP), adquiridas no varejo do município de Campinas-SP em três períodos diferentes do ano, apresentando de 10 a 15 dias de fabricação. Foram realizadas análises físico-químicas para determinação de pH, acidez titulável, teor de sal, cinzas, teor de gordura (gordura no extrato seco total), teor de umidade (extrato seco total) e proteína total. As determinações foram efetuadas em triplicata, com exceção do teor de umidade que foi realizado em

quadruplicata. O teste para verificar diferenças entre as médias foi o de Tukey e análise de variância ANOVA.

Determinação de pH

O pH dos queijos foi determinado, por meio de método potenciométrico, utilizando-se pHmetro Marca Micronal, Modelo B374, conforme AOAC⁶.

Teor de Umidade e Extrato Seco Total (EST)

O extrato seco total e o teor de umidade do queijo foram determinados segundo o método de secagem até peso constante, em estufa a 105°C⁵, conforme AOAC⁶.

Teor de Gordura e Gordura no Extrato Seco

O teor de gordura do queijo foi determinado utilizando-se o método de Gerber⁷.

O teor de gordura no extrato seco (GES) foi calculado utilizando-se a fórmula da AOAC⁶ na qual: $GES = \% \text{ de gordura} \times 100 / \% \text{ de extrato seco total}$.

Acidez titulável

A acidez titulável foi determinada por titulação com solução de NaOH 0,1 N conforme o método descrito pela AOAC⁶, adaptado por Yun e Barbano⁸ e expresso em % de ácido láctico.

Teor de Nitrogênio total

A quantidade de nitrogênio total nas amostras foi determinada utilizando-se o método oficial de Kjeldahl⁹ e um fator de 6,38 para obter o teor de proteína total segundo a AOAC⁶.

Teor de sal

O teor de sal no queijo foi determinado utilizando-se o método de Volhard¹⁰.

Teor de cinzas

O teor de cinzas foi determinado utilizando-se o método recomendado pela AOAC⁶.

Valor energético total

O valor energético total foi determinado segundo a RDC n° 360 de 23/12/2003⁵, para tanto, calculou-se o teor de carboidratos por diferença segundo RDC n° 360 de 23/12/2003⁵.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta a composição média das quinze marcas de ricota avaliadas e revela que houve diferença significativa para todos os componentes analisados. Os resultados das análises físico-químicas das 45 amostras

de ricotas demonstraram diferenças entre os lotes de uma mesma marca. Essa variabilidade em princípio seria função da falta de padronização no processamento por parte das empresas, da variação na composição e quantidade dos ingredientes, além da inexistência, na legislação brasileira, de um Padrão de Identidade e Qualidade (PIQ) específico para ricota.

Teor de Umidade

Os teores de umidade das amostras de ricotas variaram de 58,49 a 77,45%. A partir destes dados, e segundo a Portaria nº 146/96 do MAARA¹¹, todas as amostras de ricota analisadas

receberiam a classificação de queijo de “muita alta umidade” por apresentar teor de umidade acima de 55%.

A análise comparativa entre as diversas marcas mostra que os valores de umidade encontrados apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) entre si (Tabela 1).

Estes resultados não diferem muito daqueles apresentados por Souza et al.¹² que ao avaliarem 30 amostras de ricotas, de cinco marcas diferentes, comercializadas na cidade de Belo Horizonte-MG, mostraram que 93,34% das amostras se enquadrariam na classificação de queijo de muita alta umidade e apenas 3,33% como queijo de “média umidade” e 3,33% de “alta umidade”.

Tabela 1. Composição média das três amostras de quinze marcas comerciais de ricota.

Marca	Umidade (%)	Gordura (%)	Gordura no extrato seco (%)	Proteína total (%)	Sal (%)	S/U ¹	Cinzas (%)	Acidez titulável (% ac.lático)	pH
A	69,68 ^{ecd} (0,81)	13,28 ^{fe} (1,54)	43,72 ^{ed} (3,85)	13,17 ^{ba} (0,62)	0,20 ^f (0,02)	0,29 ^{fhg} (0,03)	0,59 ^e (0,13)	0,25 ^{de} (0,06)	5,07 ^{figh} (0,40)
B	77,08 ^a (0,31)	5,89 ^h (0,53)	25,70 ^g (2,82)	10,99 ^{edc} (0,63)	1,21 ^a (0,01)	1,6 ^a (0,01)	2,48 ^{cd} (0,16)	0,22 ^{de} (0,05)	6,26 ^a (0,20)
C	68,62 ^{ed} (2,43)	16,83 ^{dc} (2,51)	53,95 ^{cb} (7,83)	10,90 ^{edc} (0,63)	0,18 ^f (0,04)	0,26 ^{hg} (0,08)	0,84 ^e (0,13)	0,30 ^{de} (0,06)	5,91 ^{bac} (0,46)
D	74,57 ^{ab} (0,71)	8,30 ^h (0,87)	32,59 ^{fg} (2,42)	12,85 ^{ba} (0,68)	0,31 ^{ed} (0,09)	0,41 ^{fg} (0,12)	0,94 ^{ef} (0,30)	0,21 ^{de} (0,02)	5,96 ^{bac} (0,21)
E	62,22 ^h (2,68)	17,94 ^{dc} (2,41)	47,36 ^{ecd} (3,13)	13,73 ^a (0,91)	0,19 ^f (0,04)	0,30 ^{fhg} (0,06)	2,13 ^{cbd} (0,21)	0,33 ^{ede} (0,10)	5,75 ^{bdec} (0,34)
F	62,79 ^h (2,15)	18,61 ^{bc} (0,78)	50,06 ^{cbd} (0,88)	12,61 ^{bac} (0,47)	0,41 ^d (0,04)	0,65 ^{dc} (0,09)	1,29 ^{gfed} (0,14)	0,30 ^{de} (0,11)	5,84 ^{bdc} (0,27)
G	72,07 ^{bc} (0,43)	12,00 ^f (0,44)	43,36 ^{ed} (2,90)	10,01 ^{edf} (0,43)	0,31 ^{ed} (0,05)	0,43 ^{fe} (0,08)	2,72 ^b (0,10)	0,54 ^{cb} (0,27)	5,46 ^{dle} (0,48)
H	67,73 ^{efg} (3,16)	13,05 ^{fe} (3,53)	39,60 ^{fe} (6,97)	13,25 ^a (1,11)	0,26 ^{ef} (0,07)	0,39 ^{fg} (0,09)	1,79 ^{efed} (0,23)	0,30 ^d (0,05)	6,03 ^{ba} (0,10)
I	63,13 ^h (1,14)	21,55 ^{ba} (0,96)	58,20 ^b (1,9)	12,54 ^{bac} (3,33)	0,88 ^b (0,15)	1,40 ^b (0,24)	1,79 ^{ced} (0,16)	0,30 ^{de} (0,08)	5,86 ^{bdac} (0,22)
J	76,15 ^a (0,81)	7,44 ^h (1,07)	31,23 ^{fg} (3,42)	10,59 ^{ed} (0,93)	0,39 ^d (0,02)	0,50 ^{de} (0,03)	2,43 ^{cb} (0,36)	0,40 ^{ed} (0,25)	5,61 ^{dec} (0,59)
K	72,44 ^{bc} (1,13)	13,72 ^{fe} (1,67)	49,73 ^{cbd} (4,11)	9,67 ^{ef} (0,28)	0,19 ^f (0,02)	0,27 ^{hg} (0,03)	1,06 ^{gfe} (0,49)	0,63 ^b (0,22)	4,95 ^h (0,69)
L	74,32 ^{ba} (0,97)	11,61 ^{fg} (0,34)	45,10 ^{ed} (0,61)	11,49 ^{bdc} (1,86)	0,17 ^f (0,08)	0,24 ^h (0,11)	0,56 ^e (0,05)	0,18 ^{de} (0,02)	5,91 ^{bac} (0,42)
M	66,47 ^{fg} (1,74)	15,11 ^{de} (0,57)	45,42 ^{ecd} (3,95)	10,93 ^{edc} (0,95)	0,54 ^e (0,06)	0,80 ^c (0,08)	2,97 ^b (0,05)	0,63 ^b (0,13)	5,37 ^{fg} (0,33)
N	65,17 ^{hg} (1,36)	24,22 ^a (2,11)	69,79 ^a (4,58)	8,78 ^f (0,52)	0,20 ^{ef} (0,06)	0,31 ^{fg} (0,09)	0,46 ^e (0,05)	0,14 ^e (0,02)	5,41 ^{fg} (0,19)
O	71,62 ^{bcd} (0,50)	8,83 ^{hg} (4,93)	31,02 ^g (16,96)	10,94 ^{edc} (1,42)	0,22 ^{ef} (0,12)	0,30 ^{fhg} (0,17)	3,84 ^a (2,27)	0,98 ^a (0,29)	5,03 ^{hg} (0,14)

Médias com letras em comum na mesma coluna não diferem entre si significativamente ($p > 0,05$), segundo o teste de Tukey.

¹Relação Sal/umidade - () desvio padrão entre os lotes de uma mesma marca.

Teor de Gordura

Os teores de gordura nas amostras de ricotas avaliadas variaram ainda mais que os teores de umidade, observando-se valores da ordem de 5,50 a 26,67%.

Teor de Gordura no extrato seco

Considerando-se o conteúdo de matéria gorda no extrato seco, segundo a classificação para queijos em geral estabelecida pela Portaria nº 146/96 do MAARA¹¹, a distribuição das amostras neste trabalho seria a seguinte 8,89% (4/45) queijo magro, 42,22% (19/45) queijo semi-gordo; 40,00% (18/30) queijo gordo e 8,89% (4/45) queijo extra gordo, conforme mostra a Figura 1.

Souza et al.¹² avaliaram 30 amostras de ricotas e relataram a seguinte classificação: 16,7% como “queijo magro”, 23,3% como “queijo semi-gordo” e 60,0% “queijo gordo”.

A grande variação na composição entre as amostras avaliadas pode ser atribuída, principalmente, à porcentagem de leite adicionado ao soro - visando melhorar o rendimento, o sabor e a textura da ricota - além da ausência de padronização do teor de gordura neste leite.

A disposição à venda de produtos como a ricota, com uma variação tão elevada na sua composição é preocupante, pois este produto normalmente é apresentado e associado à produtos de baixo teor de gordura, sendo mais utilizado por pessoas com restrição alimentar (dietas hipocalóricas, doenças cardiovasculares, colesterol e triglicérides elevados).

Teor de proteínas

Os dados encontrados de proteínas revelaram uma grande variação (8,84 a 16,35%), provavelmente, associada à porcentagem de leite adicionado ao soro. Segundo Guinee et al.¹ o teor de proteínas da ricota variaria de 11,5 a 12%.

Teor de sal

Os teores de sal nas amostras de ricota se situaram na faixa de 0,14 a 1,27 %, enquanto que a literatura internacional relata valores de 0,2% à ausência de sal neste tipo de queijo^{13,14}.

Os valores de sal acima do esperado, podem também estar associado, em alguns casos, à presença de outros tipos de sais, além do cloreto de sódio, como o cloreto de cálcio que é utilizado como agente de firmeza por algumas empresas.

Teor de cinzas

Os produtos lácteos são ricos em cálcio e fósforo com o conteúdo de cinzas total variando de 0,7% a 6,0%¹⁵. Neste trabalho, o teor de cinzas das amostras de ricotas variou de 0,41 a 5,24 %.

Acidez titulável e pH

Os valores de acidez titulável em ácido láctico foram bem variáveis entre as amostras de ricota. O maior teor foi de 1,25 % e o menor teor, 0,13%. Os valores de pH e o teor de acidez titulável, podem se correlacionar de forma inversamente proporcional, fato este não observado na comparação entre os dados das 45 amostras ($R < 0,5$). Observaram-se amostras com acidez elevada e pH não tão baixo; este perfil poderia ser justificado, em algumas amostras, pelo efeito tampão promovido pela adição de cloreto de cálcio - aumento da acidez aparente ocorreria sem alteração significativa do pH, assim como a presença de ácidos fracos (baixa dissociação).

Adequação legal das informações nutricionais declaradas nos rótulos

Segundo a Resolução RDC nº 360/2003, a informação nutricional contida no rótulo deve conter, obrigatoriamente o valor energético total e a quantidade de: carboidratos, proteínas, gordura total, gordura saturada, gordura trans, fibra alimentar e sódio. Além destes itens obrigatórios, outros nutrientes podem ser declarados opcionalmente, tais como vitaminas e sais minerais, desde que estejam presentes em pelo menos 5% da Ingestão Diária Recomendada (IDR), por porção do alimento indicada no rótulo.

A Resolução RDC nº 360/2003⁵ orienta também como deve ser realizado o cálculo para obtenção do valor calórico

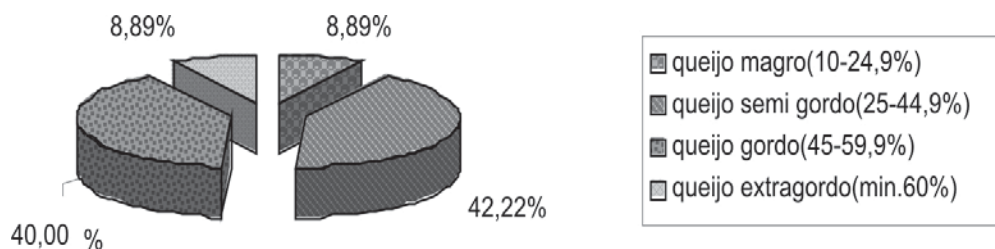


Figura 1. Classificação das 45 amostras de ricota em relação ao teor de gordura (extrato seco), segundo a Portaria nº 146/96 do MAARA¹⁰.

de carboidratos, proteínas e de gordura. De acordo com esta resolução, a informação nutricional do rótulo de um alimento deve apresentar o conteúdo dos seus componentes e a declaração da porcentagem do Valor Diário (% VD) baseados em uma ingestão diária pré-definida para cada nutriente e considerando uma dieta de 2.000 kcal.

Tendo como referência a RDC nº 360/2003⁵ em vigor, que permite uma variação de nutrientes com limite de tolerância de $\pm 20\%$ foram analisados o teor de gordura, proteína e valor energético total (Tabela 2).

As análises do teor de gordura mostraram que em 66,67% (10/15) das amostras, os valores descritos nos rótulos se apresentavam em desacordo com os dados analíticos, sendo 20% (3/15) com valores acima do limite superior e 46,67% (7/15) abaixo do limite inferior de tolerância permitida.

Para os teores de proteínas, 60% (9/15) das amostras estavam fora dos limites de tolerância permitidos, dos quais 53,3% (8/15) apresentavam-se abaixo e 6,70% (1/15) acima dos limites permitidos.

Para o valor energético total, 60% (9/15) das amostras apresentavam-se fora da faixa de variação permitida, sendo 20% (3/15) acima e 40% (6/15) abaixo dos limites.

Os resultados revelam o não cumprimento da legislação relativa à informação nutricional, bem como o conseqüente prejuízo do consumidor que adquire, em geral, produtos com variação na composição superior ou inferior a 20% ao valor declarado.

CONCLUSÃO

Os resultados globais evidenciaram a falta de uniformidade das diferentes marcas e lotes, e a dificuldade da maioria das empresas, em atender as exigências da legislação relativa à informação nutricional, situação esta prejudicial aos consumidores que desejam utilizar estas informações para definição de dietas alimentares melhor balanceadas e adequadas para suas necessidades.

AGRADECIMENTOS

À FAPESP pelo auxílio à Pesquisa e à CAPES e CNPQ pela bolsas de mestrado e iniciação científica concedidas

REFERÊNCIAS

1. Guinee TP, Pudja PD, Farkye NY. Fresh Acid-Curd Cheese Varieties. In: Cheese: Chemistry, physics and microbiology (2ed, vol).1999.
2. Associação Brasileira de Indústria de Queijos (ABIQ) Produção de queijos no Brasil. [acesso em 19 nov.2004] Available: <http://luesper@fea.unicamp.br>
3. Brasil. Ministério da Agricultura e Pecuária. Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal: MAPA, 1997.
4. Brasil. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília, 18p,2001a.
5. Brasil, Resolução nº 360, de 23 de dez. de 2003. Aprova o regulamento técnico sobre rotulagem nutricional de alimentos embalados. Diário Oficial da União, Brasília, dez.2003a n.251, Seção I, p.33,26.
6. Association of Official Analytical Chemists (AOAC). Official methods of analysis of AOAC International. 18 ed. Washington, 2005.
7. Instituto Adolfo Lutz (IAL). Normas Analíticas do IAL. D.B. Rebocho Ed. São Paulo-SP, 1985.
8. Yun JJ, Barbano DM. Department of Food Science, Cornell University- september/91, Adaptação AOAC 15ª ed. Metodologia 971.19. 1995.
9. International Dairy Federation (IDF). Determination of the total nitrogen content of milk by the Kjeldahl method. Brussels, n.20, p.1-3, 1962.

Tabela 2. Distribuição das marcas em função das diferenças entre valores experimentais e declarados nos rótulos de ricotas

Informação nutricional	Amostras dentro da variação permitida ^a ($\pm 20\%$)	Amostras com valores abaixo do limite inferior	Amostras com valores acima do limite superior
Proteína	6	8	1
Gordura	5	7	3
Valor Energético Total	6	6	3

^aa variação permitida de $\pm 20\%$ é estabelecida na Resolução RDC nº 360/2003.

10. International Dairy Federation (IDF). Determination of the total solids content of cheese and processed cheese. IDF-FIL., n.88, p.1-3, 1979.
11. Brasil. Portaria nº 146, de 07 de março de 1996. Aprova regulamentos técnicos de identidade e qualidade dos produtos lácteos. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. Brasília, 50p.1996.
12. Souza MR, Morais CFA, Corrêa CES, Rodrigues R. Características Físico-Químicas de ricotas comercializadas em Belo Horizonte, MG. Hig Aliment 2000; 14(73):68-71.
13. Fox PF, Guinee TP, Cogan TM, Mcsweeney PLH. Fundamentals of cheese science. Massachusetts: Kluwer Academic, 578p. 2000.
14. Kosikowski FV, Mistry VV. Soft Italian Cheese-Mozzarella and Ricotta. Cheese and Fermented Milk Foods: Volume I: Origins and Principles. 3ªed. Virginia: FV Kosikowski, LLC, p. 174-79,1999.
15. Cecchi HM. Fundamentos teóricos e práticos em alimentos análise de alimentos.2ªed. Editora da UNICAMP,Campinas, SP, 2003.

Diferenciação entre *Entamoeba histolytica* e *Entamoeba dispar* por meio de ensaio imunoenzimático para pesquisa de antígenos em amostras fecais

Differentiation between *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* by means of immunoenzymatic assay for antigens detection in children fecal samples

RIALA6/1144

Juliane B. S. TOMÉ^{1*}, Rejane G. TAVARES¹

*Endereço para correspondência: Rua Professora Eugênia dos Reis Perito, 103/301 Bairro Passagem, Tubarão, SC/Brasil
CEP: 88705-370. E-mail: jbstome@hotmail.com Telefone: (48) 9109-1783

¹Curso de Biomedicina do Centro Universitário Feevale, Instituto de Ciências da Saúde, Centro Universitário Feevale, Novo Hamburgo, RS/Brasil. Laboratório de Biomedicina, Setor de Parasitologia, Centro Universitário Feevale
Recebido: 11/06/2007 – Aceito para publicação: 06/12/2007

RESUMO

A diferenciação do agente patogênico causador de amebíase obteve grande importância desde que *Entamoeba histolytica* (patogênica) foi considerada como espécie distinta de *Entamoeba dispar* (não patogênica). No presente estudo, foi realizada a pesquisa de antígenos de *E. histolytica* em amostras fecais de crianças residentes na cidade de São Leopoldo, Rio Grande do Sul, Brasil, utilizando-se ensaio imunoenzimático, ELISA (*E. histolytica* Test, TechLab Inc., Blacksburg, EUA) disponível no comércio. Foram analisadas 262 amostras de fezes pela técnica de Hoffman, Pons e Janer (HPJ), em que três amostras apresentaram positividade para o complexo *E. histolytica/E. dispar*. Do total de amostras, 91 (incluindo aquelas positivas pela técnica de HPJ) foram analisadas por meio de ELISA. Houve discordância entre os resultados obtidos no exame coproparasitológico e no ELISA, pois todas amostras foram não reagentes no ELISA. Estes dados indicam a presença de *E. dispar* e ausência de *E. histolytica* nas três amostras positivas pela técnica de HPJ. Os dados do presente estudo mostram a importância de utilização de técnica mais específica para efetuar identificação e diferenciação da amebíase intestinal.

Palavras-chave. *Entamoeba histolytica*, amebíase, ELISA, coproantígeno.

ABSTRACT

The differentiation of the pathogen that cause amebiasis has turned to be relevant since *Entamoeba histolytica* (pathogenic) has been considered as a distinct species from *Entamoeba dispar* (non-pathogenic). In the present study *E. histolytica* antigens were investigated in stool samples from children of São Leopoldo, Rio Grande do Sul, Brazil, by means of a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA (*E. histolytica* Test, TechLab Inc., Blacksburg, USA). A total of 262 fecal samples were analyzed by Hoffman, Pons and Janer method, and three samples showed positive result for *E. histolytica/E. dispar* complex. Of 262 samples, 91 (including those positive on Hoffman, Pons and Janer method) were analyzed by ELISA. The discrepancy of results on coproparasitologic exam and on ELISA was detected as all fecal samples were negative on ELISA, indicating the presence of *E. dispar* but not of *E. Histolytica* in those three positive samples on HPJ technique. These data point out the relevance in employing a highly specific technique for performing the identification and differentiation of intestinal amebiasis.

Key words. *Entamoeba histolytic*, amebiasis, ELISA, coproantigen.

INTRODUÇÃO

A amebíase é uma infecção causada pelo protozoário *Entamoeba histolytica*, e se adquire por meio da ingestão de cistos presentes em alimentos ou água contaminados por matéria fecal. Esta doença apresenta distribuição mundial, tendo uma prevalência elevada em regiões tropicais e subtropicais, principalmente em comunidades que vivem em condições sanitárias inadequadas^{1,2,3}. No Brasil, estudos epidemiológicos têm demonstrado que os índices de prevalência variam de acordo com a região e a população estudada⁴.

O método de Hoffman, Pons e Janer⁵, que se baseia na sedimentação espontânea, ainda é o método de escolha para identificação de parasitoses intestinais, porém não permite a diferenciação entre *E. histolytica*, patogênica e invasiva, da *E. dispar* considerada espécie não patogênica, visto que ambas são morfológicamente idênticas⁶. Por isso a Organização Mundial da Saúde recomenda que, depois de identificado microscopicamente o complexo *E. histolytica/E. dispar*, seja feita a diferenciação por testes mais específicos⁷, como o imunoensaio enzimático (ELISA), que detecta antígenos específicos para *E. histolytica*^{1,3,6,8}, ou testes de biologia molecular⁹, ambos com boa sensibilidade e especificidade¹⁰. O objetivo deste estudo foi diferenciar *Entamoeba histolytica* de *Entamoeba dispar* por meio da detecção de coproantígenos de *Entamoeba histolytica* em uma amostra da população de São Leopoldo, Rio Grande do Sul.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostra, Coleta e Análise Parasitológica

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Centro Universitário Feevale, processo número 2.13.03.06.475. Foram coletadas 262 amostras de fezes de crianças na faixa etária de 2 a 12 anos em três Escolas Municipais de Educação Infantil e em duas Entidades Assistenciais de São Leopoldo, RS. As amostras foram espontaneamente emitidas em frascos adequados, e em seguida processadas no Laboratório de Biomedicina pelo método de Hoffman, Pons e Janer (HPJ). De cada amostra foram confeccionadas três lâminas, coradas com lugol para análise microscópica (100x e 400x). Para a realização do método de ELISA, alíquotas das mesmas amostras foram congeladas a -20°C, e a validação do método foi realizada através de controles comerciais negativo e positivo fornecidos juntamente com o *kit*. O método de ELISA foi realizado seguindo as instruções do fabricante do *kit Entamoeba histolytica* II (00265), TechLab®. Neste método foram utilizadas somente 91 amostras aleatórias, previamente analisadas pelo método HPJ, sendo três positivas para o complexo *E. histolytica/E. dispar*, 84

positivas para alguma espécie de parasita e quatro amostras negativas, além do controle negativo e controle positivo do *kit*. A leitura foi realizada visualmente, onde a amostra negativa deve ser semelhante ao controle negativo, ou seja, apresentar ausência de cor ou ligeiramente amarelado. Já as amostras positivas devem ser semelhantes ao controle positivo, ou seja, apresentarem coloração mais amarela que a cavidade controle negativo.

RESULTADOS

Das 262 amostras analisadas pelo método HPJ, 62,21% (163) resultaram negativas para enteroparasitas e 37,79% (99) positivas. Das amostras positivas, três apresentaram o complexo *E. histolytica/E. dispar*. Na Tabela 1 estão citados a frequência de parasitas encontrados, ressaltando-se que estão incluídas também crianças poliparasitadas. Foi também realizada a análise macroscópica das fezes, sendo que não foram observadas amostras diarreicas.

Tabela 1. Frequência de parasitas encontrados nas 99 amostras fecais positivas, analisadas pelo método de Hoffman, Pons e Janer (HPJ).

Parasitos	Frequência
<i>Endolimax nana</i>	42
<i>Giardia lamblia</i>	36
<i>Entamoeba coli</i>	29
<i>Ascaris lumbricoides</i>	14
<i>Trichuris trichiura</i>	8
Complexo <i>E.histolytica/E.dispar</i>	3
<i>Strongyloides stercoralis</i>	3
<i>Hymenolepis nana</i>	1
<i>Enterobius vermiculares</i>	1
Total	137

Tabela 2. Resultado das 91 amostras testadas pelo método de ELISA (*E. histolytica* Test, TechLab Inc.) para detecção de *Entamoeba histolytica*, em comparação com o método de Hoffman, Pons e Janer (HPJ).

HPJ	ELISA		TOTAL
	Positivo	Negativo	
Positivo	0	3	3
Negativo	0	88	88
Total	0	91	91

Quando 91 amostras analisadas pelo método HPJ, incluindo as três amostras positivas para o complexo *E. histolytica/E. dispar*, foram analisadas pelo método de ELISA, houve uma negatividade de 100% no teste de ELISA para a presença do protozoário *E. histolytica* (Tabela 2).

DISCUSSÃO

A ocorrência de parasitoses, principalmente em crianças, é um importante problema de saúde pública. Para o seu diagnóstico, o método clássico é a utilização de métodos de sedimentação, mais comumente o método de Hoffman, Pons e Janer. Este método, apesar de economicamente mais viável, não é capaz de diferenciar o complexo *E. histolytica/E. dispar*, já que estas são morfológicamente idênticas⁶. Para isto, sugere-se o uso de técnicas específicas como, por exemplo, a técnica de imunensaio enzimático (ELISA) ou biologia molecular. Entretanto, em nosso meio, estes métodos não são rotineiramente utilizados, seja por divulgação ineficiente da técnica ou por questões econômicas.

Nas 91 amostras analisadas pelo método ELISA para o diagnóstico do patógeno *E. histolytica*, três apresentaram-se positivas na análise microscópica, porém, quando analisadas pelo método enzimático revelaram-se negativas. Pode-se sugerir que o diagnóstico adequado destas amostras é a presença de *E. dispar*, protozoário não patogênico.

É interessante avaliar que em nenhuma das amostras houve a ocorrência isolada do complexo *E. histolytica/E. dispar*. Este sempre ocorreu em crianças poliparasitadas, simultaneamente com a presença do protozoário *E. coli*, pertencente à mesma família e também com semelhanças morfológicas, diferenciando-se principalmente pelo número de núcleos. Embora as amostras tenham sido avaliadas por três observadores independentes, este fato poderia ser motivado por dificuldades de identificação adequada na análise microscópica. Este fato também poderia ter sido minimizado com o uso de coloração mais específica como, por exemplo, hematoxilina férrica ou tricrômica, já que a coloração com lugol não fornece detalhamento morfológico para o diagnóstico.

Não foi identificada a presença de trofozoítos, já que esta forma parasitária é mais comumente observada em fezes diarréicas, e todas as amostras examinadas apresentavam consistência sólida.

Os nossos resultados estão de acordo com estudos prévios, que demonstram que o Rio Grande do Sul apresenta baixos índices de ocorrência de amebíase¹¹. Entretanto, levando-se em consideração a morbi-mortalidade desta patogenicidade, e de acordo com a orientação da OMS, que estabelece a necessidade de diagnóstico efetivo para que se efetue o tratamento da

amebíase⁷, é de extrema importância a validação de um método diagnóstico mais específico, embora com custo efetivo mais elevado, que possa ser utilizado conjuntamente ao exame parasitológico de fezes, oferecendo maior confiabilidade ao diagnóstico da infecção.

REFERÊNCIAS

1. Braga LLBC, Gomes ML, Silva MW, Paiva C, Sales A, Mann BJ. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* infections as detected by monoclonal antibody in an urban slum in Fortaleza, Northeastern Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2001; 34 (Suppl 5): 467-71.
2. Cimerman B, Cimerman S. *Parasitologia Humana e seus Fundamentos Gerais* 2nd ed. São Paulo: Ed. Atheneu; 2001.
3. Delialioglu N, Aslan G, Sozen M, Babur C, Kanik A, Emekdas G. Detection of *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* in stool specimens by using enzyme-linked immunosorbent assay. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004; 99 (Suppl 7): 769-72.
4. Maciel A, Dourado A, Aca IS. Ocorrência de *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* em pacientes ambulatoriais de Recife, PE. *Rev Soc Bras Med Trop* 2006; 39 (Suppl 4): 388-9.
5. Wiebbling AMP, Santos DE, Mezzari A. Parasitas intestinais: aspectos gerais e prevalência em um escola da periferia de Porto Alegre – RS. *News lab* 2003; 60: 118-34.
6. Redondo RB, Méndez LGM, Baer G. *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*: differentiation by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and its clinical correlation in pediatric patients. *Parasitologia Latinoamericana* 2006; 61: 37-42.
7. World Health Organization. *Entamoeba* taxonomy. *Bull WHO* 1997; 75 (Suppl 3): 291-2.
8. Abd-Alla MD, Ravdin JI. Diagnosis of amoebic colitis by antigen capture ELISA in patients presenting acute diarrhea in Cairo, Egypt. *Trop Med Intern Health* 2002; 7: 365-70.
9. Zaki M, Meelu P, Sun W, Clark CG. Simultaneous differentiation and typing of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. *J Clin Microbiol* 2002; 40 (Suppl 4): 1271-6.
10. Uecker M, Copetti CE, Polize L, Flores V. Infecções parasitárias: diagnóstico imunológico de enteroparasitoses. *RBAC* 2007; 31 (Suppl 1): 15-19.
11. Nozaki T, Aca IS, Okuzana E, Magalhães M, Tateno S, Takeuchi T. Zymodemes of *Entamoeba histolytica*, isolated in Amazon and the Northeast Regions of Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1990; 84: 387-8.

Erro na manipulação de cápsulas de alprazolam

Error in pharmaceutical compounding of alprazolam capsules

RIALA6/1145

Luz Marina TRUJILLO^{1*}, Mônica A. BATISTIC-LONGATTO¹, Maria Ângela P. ZORZETTO¹, Sueli O. FRANCIOSI¹

*Endereço para correspondência : Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr. Arnaldo, 355, CEP: 01246-902- 5º andar, Seção de Química Farmacêutica, Cerqueira César, São Paulo/Brasil. E-mail: ltruji@ial.sp.gov.br

¹ Serviço de Medicamentos do Instituto Adolfo Lutz, Laboratório Central, São Paulo, SP/Brasil.

Recebido: 27/07/2007 – Aceito para publicação: 28/12/2007.

RESUMO

O aumento do consumo de medicamentos manipulados pela população brasileira demandou uma maior ação por parte do laboratório oficial na avaliação da conformidade desses produtos que, em grande parte, são constituídos por fármacos com propriedades ansiolíticas. No presente trabalho, é relatado um grave erro de manipulação em cápsulas de alprazolam, o qual foi trocado pelo clordiazepóxido, ambos pertencentes à classe terapêutica das benzodiazepinas. Alerta-se para a importância do controle de qualidade do processo de manipulação de fármacos.

Palavras-chave. alprazolam, benzodiazepina, medicamento manipulado.

ABSTRACT

The increase of pharmaceutical drugs formulations consumption by Brazilian population demanded a greater action from the official laboratory to verify the conformity of these products, as the majority of them are composed by anxiolytics. This study reports a serious manipulation error in preparing alprazolam capsules formulation, where the chlordiazepoxide was placed instead of alprazolam, being both drugs belonged to therapeutic class of the benzodiazepines. A warning on the importance of manipulation process control of drugs is presented.

Key words. alprazolam, benzodiazepine, pharmaceutical compounded preparation.

INTRODUÇÃO

Com a consolidação de instrumentos legais para a defesa do consumidor, o brasileiro conscientizou-se de seus direitos e passou a buscar um produto com mais segurança e eficácia, mas que, concomitantemente, apresentasse melhor preço. Em relação aos medicamentos, este fato também foi observado, principalmente quanto ao consumo de produtos manipulados. Nos últimos anos, a prescrição destes cresceu consideravelmente, contribuindo para o aumento do número de farmácias de manipulação que passaram a investir na divulgação de suas atividades. Conseqüentemente, o laboratório oficial de controle de qualidade de medicamentos, responsável pelas análises de conformidade, constatou uma maior demanda destes produtos, observando importantes desvios de qualidade.

Muitos medicamentos manipulados com frequência são constituídos por benzodiazepinas, fármacos pertencentes a uma das mais prescritas classes terapêuticas¹. As benzodiazepinas são psicofármacos que agem aumentando a atividade inibitória do GABA (ácido gama-aminobutírico), principal neurotransmissor inibitório do cérebro, produzindo calma ou sonolência. Como as benzodiazepinas possuem apenas uma capacidade limitada para provocar uma depressão profunda, sendo praticamente incapazes de causar depressão respiratória fatal ou colapso cardiovascular, são muito empregadas para o tratamento da ansiedade e assim, classificadas como fármacos ansiolíticos. À medida que se aumenta a dose, a sedação progride para hipnose e, a seguir, para estupor. Os efeitos mais proeminentes são sedação, hipnose, redução da ansiedade, relaxamento muscular, amnésia anterógrada e atividade anticonvulsivante. Todas as benzodiazepinas têm perfis farmacológicos muito semelhantes, mas diferem quanto à seletividade e farmacocinética, podendo se afirmar que a utilização clínica de cada uma varia de forma considerável^{2,3}.

Durante a manipulação qualquer erro ocorrido pode levar a uma conseqüência séria na saúde do consumidor, corroborando a premissa de que um medicamento manipulado deve ter o controle de qualidade igualmente eficiente ao do industrializado. O objetivo deste relato é descrever o que foi constatado na Seção de Química Farmacêutica na análise de cápsulas manipuladas de alprazolam, uma benzodiazepina, e alertar os responsáveis pela Vigilância Sanitária e a população para a gravidade do problema.

RELATO DO CASO

Em fevereiro de 2007, a Seção de Química Farmacêutica recebeu para análise cápsulas manipuladas contendo o fármaco alprazolam, na dose de 2mg, enviadas pela Vigilância Sanitária de um município do interior de São Paulo, para ensaios de conformidade, já que a queixa do consumidor relatava a ausência de efeito terapêutico.

Mesmo quando uma denúncia de não eficácia está declarada no pedido de análise, o laboratório realiza os ensaios necessários para comprovar a conformidade do produto com a fórmula descrita no rótulo.

A princípio, foram realizados os ensaios de peso-médio e variação de peso, conforme a Farmacopéia Brasileira 4^a ed.⁴, e os ensaios de identificação e teor de alprazolam, de acordo com a Farmacopéia Americana 28⁵ e Moffat⁶. Foram traçados os perfis espectrofotométricos para amostra e padrão de alprazolam, nos meios etanol, etanol-HCl, metanol e metanol-HCl, na concentração de leitura de 4µg/mL, observando-se o comprimento de onda de 220nm. Foi utilizado um espectrofotômetro com detector de ultravioleta de arranjo de diodos (DAD) controlado por um sistema de gerenciamento Chemstation. Como resultado, não foi observado perfil espectrofotométrico semelhante ao do padrão nos quatro meios testados. Considerando-se uma possível interferência dos excipientes, procedeu-se à extração do fármaco com clorofórmio em meio alcalino, segundo Chaves et al.⁷, e mais uma vez não foi observado perfil espectrofotométrico semelhante ao do padrão, nos quatro meios testados, mas já foi possível observar picos de máxima absorção característicos de alguma outra substância. Comparando-se aos gráficos da literatura, primeiramente, pesquisou-se o clonazepam, fármaco com potência semelhante ao alprazolam; a seguir, comparou-se aos dos fármacos prescritos em baixa dose e, finalmente, ao perfil de clordiazepóxido, outro fármaco da classe das benzodiazepinas. Simultaneamente, procedeu-se à cromatografia em camada delgada em comparação com estes mesmos fármacos: clonazepam, midazolam, lorazepam, nitrazepam, bromazepam, diazepam e o clordiazepóxido. O resultado mostrou, após a revelação da placa cromatográfica, segundo Auricchio et al.⁸, uma mancha com Rf semelhante ao padrão de clordiazepóxido.

Uma vez identificado o fármaco por cromatografia em camada delgada e, por meio de diluições sucessivas da amostra, estimando-se a dose manipulada, partiu-se para os ensaios de identificação e teor de clordiazepóxido por análise espectrofotométrica, em meio etanol-HCl, nos comprimentos de onda de 246 e 309nm e na concentração de 10µg/mL. Os resultados obtidos mostraram que a amostra continha 5,08mg de cloridrato de clordiazepóxido por cápsula.

DISCUSSÃO

No tratamento da ansiedade, as doses recomendadas de alprazolam variam de 0,25 a 0,50mg, três vezes ao dia, via oral, aumentando-se a uma dose total de 3,0 a 4,0mg; para o clordiazepóxido, a dose usual varia até 30mg por dia, em doses divididas, via oral, e em condições severas a até 100mg ao dia³.

Os resultados obtidos mostraram que a amostra continha 5,08mg de cloridrato de clordiazepóxido por cápsula, até seis vezes menos a quantidade de fármaco do que o valor

desejável, (30mg), considerando-se a dose diária para tratamento da ansiedade.

Dois importantes desvios da qualidade foram observados: troca de substância ativa e quantidade desta, tanto no que se refere ao declarado no rótulo quanto a um possível acerto de dosagem. Embora o alprazolam e o clordizepóxido sejam fármacos pertencentes à mesma classe terapêutica, a quantidade do fármaco revelada pelos ensaios estava abaixo daquela recomendada para um tratamento de ansiedade semelhante, com dose diária de alprazolam de 2,0mg. Além deste fato, a farmacocinética dos dois fármacos difere muito no que diz respeito, principalmente, aos tempos de $\frac{1}{2}$ vida, e à atividade e tempos de $\frac{1}{2}$ vida dos metabólitos.

Desta forma, o consumidor teve razão em sua queixa, que teve comprometimento sério de seu tratamento, não só pela ausência da ação terapêutica desejada, mas por outros agravos oriundos da descontinuação da dose correta de uma benzodiazepina e da presença de outros metabólitos ativos com alta permanência no organismo.

Deve-se alertar as autoridades fiscalizatórias das farmácias de manipulação e do exercício profissional do farmacêutico para o controle adequado do processo de manipulação, numa atitude responsável, que resulte em medicamentos seguros e eficazes. Os erros durante o processo de manipulação, referentes à pesagem ou troca dos fármacos, devem ser totalmente evitados pelo uso de procedimentos eficientes e rastreáveis.

REFERÊNCIAS

1. Chouinard G. Issues in the clinical use of benzodiazepines: potency, withdrawal, and rebound. *J Clin Psychiatry* 2004; 65 Suppl 5: 7-12.
2. Goodman & Gilman. *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*, 11ª ed., Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil; 2005, 1847 p.
3. Sweetman SC. *The Martindale the complete drug reference*, 34th ed., London: The Pharmaceutical Press; 2005, 3187 p.
4. *Farmacopéia Brasileira*, 4ª ed. São Paulo: Ed. Atheneu, 1988.
5. *The United States Pharmacopeia*, 28th ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention Inc.; 2005, 3187 p.
6. Moffat AC, editor. *Clarke's isolation and identification of drugs*, 2nd ed., London: The Pharmaceutical Press; 1986, 1223 p.
7. Chaves MA, Akatuka AS, Trujillo LM. Dietilpropiona, femproporex, diazepam e fenoltaleína: determinação em formulações para emagrecimento. *Rev Inst Adolfo Lutz* 1994; 54(1): 36-43.
8. Auricchio MT, Batistic MA, Markman BEO. Detecção de anorexígenos e benzodiazepínicos em formulações "naturais" empregadas em regimes de emagrecimento. *Rev Inst Adolfo Lutz* 1991; 51 (1/2): 105-10.

Avaliação do quadro de estresse metabólico em ratos Wistar expostos à aflatoxina B₁

Silva RA. *Avaliation of the metabolic stress in Wistar rats exposed to aflatoxin B₁*. São Paulo, 2007 [Tese de doutorado - Coordenadoria de Controle de Doenças – SES]. Área Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública
Orientador: Prof. Dr. Jaim Lichtig.

As aflatoxinas são metabólitos secundários produzidos pelas espécies do gênero *Aspergillus* (*A. parasiticus*, *A. flavus*, *A. nomius*). Esses fungos são contaminantes naturais dos alimentos e suas micotoxinas podem causar várias doenças no homem e nos animais, constituindo um fator de risco importante para o carcinoma hepatocelular. A aflatoxina B₁ (AFB₁) exerce seus efeitos após conversão hepática em AFB₁-epóxido, pela ação de enzimas do citocromo P-450, o qual reage com macromoléculas celulares, incluindo proteínas, RNA e DNA. O presente trabalho teve como objetivo avaliar, por meio de testes bioquímicos, morfológicos e do comportamento, os efeitos da administração da AFB₁ em ratos Wistar machos. Os animais receberam uma dose diária de 0.25 mg/Kg de peso corpóreo durante 10 dias (exposição subcrônica) e foram avaliados em campo aberto e labirinto em cruz elevado. Em seguida, os ratos foram eutanasiados; o sangue e o fígado foram coletados para as análises bioquímicas e morfológicas. Os resultados dos estudos do comportamento no campo aberto mostraram redução na locomoção e um aumento na duração da imobilidade, enquanto que nenhuma diferença foi observada no labirinto em cruz elevado. Os resultados obtidos no labirinto em cruz elevado indicaram que a droga não modifica o estado de ansiedade nesse teste. Em relação à análise morfológica, a avaliação macroscópica não revelou anormalidades hepáticas e, na microscopia, observou-se ausência de infiltrado inflamatório e presença de raros hepatócitos sugestivos de apoptose. Os resultados referentes aos pesos dos animais e aos pesos relativos do fígado, mostraram que não houve diferenças significativas entre os grupos “experimental” e “controle”. As análises do sangue não mostraram diferenças estatisticamente significativas para glicose, creatinina, ácido úrico e função hepática, quando comparadas com o grupo “controle”. Entretanto, a atividade da superóxido dismutase, a capacidade antioxidante do plasma, os níveis de glutathiona reduzida e concentração de grupamentos sulfidríla totais, foram significativamente diferentes dos grupos “controle”. Esses resultados evidenciam a presença de estresse oxidativo em um modelo subcrônico, o que torna preocupante a exposição à AFB₁, ainda que a níveis baixos.

Tese disponível
na Biblioteca da SES <http://ses.sp.bvs.br>
e-mail: rasilva@ial.sp.gov.br

Avaliação antioxidante do extrato de coentro (*Coriandrum sativum* L.) e do palmitato de ascorbila em óleo de girassol sob aquecimento

Angelo, PM. **Antioxidant evaluation of the coriander extract (*Coriandrum sativum* L.) and ascorbyl palmitate in sunflower oil under heating** São José do Rio Preto, SP 2007. [Dissertação de mestrado – Área de Ciência e Tecnologia de Alimentos Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto – UNESP]. Orientadora: Neuza Jorge.

O presente trabalho teve como objetivos: avaliar a atividade antioxidante do extrato de coentro e do palmitato de ascorbila em diferentes concentrações, para que sejam aplicadas no óleo de girassol as mais eficazes; determinar o efeito isolado e o sinérgico dos antioxidantes, extrato de coentro e palmitato de ascorbila, em óleo de girassol, sob diferentes condições de oxidação; verificar a influência do extrato de coentro e do palmitato de ascorbila na resistência do α -tocoferol naturalmente presente no óleo de girassol, em condições de aquecimento. Desta forma, foram realizados três ensaios. No Ensaio I, a atividade antioxidante do extrato de coentro e do palmitato de ascorbila, em diferentes concentrações, foi avaliada no óleo de girassol por meio da estabilidade oxidativa, sendo as concentrações de 1.600 e 500 mg kg⁻¹, respectivamente, selecionadas para serem submetidas aos ensaios posteriores. Nos Ensaios II e III, o óleo de girassol adicionado das concentrações selecionadas dos antioxidantes citados ou da mistura dos mesmos foram submetidos à termoxidação (180°C/30 horas) e ao teste de estufa (60°C/10 dias), cujas amostras foram tomadas nos intervalos de tempo de 0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 horas e 0, 2, 4, 6, 8 e 10 dias, respectivamente. As amostras termoxidadas, referentes ao Ensaio II, foram analisadas quanto à estabilidade oxidativa, índice de peróxidos, dienos conjugados, compostos polares totais e teor de α -tocoferol, enquanto as amostras do teste acelerado em estufa, que se referem ao Ensaio III, foram analisadas quanto ao índice de peróxidos e dienos conjugados. Os resultados obtidos das determinações analíticas foram submetidos às análises de variância e testes de Tukey para as médias a 5%, em esquema fatorial, no delineamento inteiramente casualizado, a fim de determinar a influência dos Tratamentos e Tempos de aquecimento sobre as alterações nos óleos sob aquecimento. A partir dos resultados, verificou-se que os antioxidantes, extrato de coentro e palmitato de ascorbila, apresentam capacidade de retardar a oxidação lipídica, quando adicionados isolados em óleo de girassol submetido ao aquecimento em alta e em baixa temperatura, como se procedeu nos Ensaios II e III, respectivamente. Entretanto, a mistura dos antioxidantes adicionada ao óleo de girassol, apresentou um poder antioxidante maior que os antioxidantes aplicados isolados, comprovando, assim, o efeito sinérgico dos antioxidantes em estudo.

Dissertação disponível na Biblioteca do
Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto
E-mail: pmileneangelo@yahoo.com.br

AGRADECIMENTOS AOS COLABORADORES

O Corpo Editorial agradece a todos os pareceristas abaixo relacionados que, com o trabalho voluntário e anônimo ao longo de 2007 contribuíram para esta Revista.

- Adelaide José Vaz** Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo/SP.
- Adriano Gomes da Cruz** Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas/SP.
- Afonso Liguori Oliveira** Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Belo Horizonte/MG.
- Alberto Duarte** Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, São Paulo/SP.
- Alberto Keidi Kurebayashi** Associação Brasileira de Cosmetologia, São Paulo/SP.
- Alceu Afonso Jordão Junior** Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto/SP.
- Alice Sakuma** Instituto Adolfo Lutz, Divisão de Bromatologia e Química, São Paulo/SP.
- Ana Maria Ramalho de Paula** Instituto Adolfo Lutz, Divisão de Bromatologia e Química, São Paulo/SP.
- Ana Maria Rauen de Oliveira Miguel** Instituto de Tecnologia de Alimentos, Centro de Química de Alimentos e Nutrição Aplicada, Campinas/ SP.
- Ana Terezinha Tavechio** Instituto Adolfo Lutz, Divisão de Biologia Médica, São Paulo/SP.
- Ana Vlândia Bandeira Moreira** Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Centro de Ciências da Saúde, Natal/RN.
- Anderson de Souza Sant'ana** Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo/SP.
- Anna Lucia Casanas Haasis Villavicencio** Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Comissão Nacional de Energia Nuclear, São Paulo/SP.
- Armando Perez Flores** Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo (SABESP), Divisão de Gestão e Desenvolvimento Operacional de Recursos Hídricos Metropolitanos, São Paulo/SP.
- Bernadette Dora Gombossy de Melo Franco** Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo/SP.
- Célia Leite Sant'Anna** Instituto de Botânica, Seção de Ficologia, São Paulo/SP.
- Célia Maria de Sylos** Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Araraquara/SP.
- Christiane Asturiano Ristori** Instituto Adolfo Lutz, Divisão de Bromatologia e Química, São Paulo/SP.
- Claudete Rodrigues Paula** Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas, São Paulo/SP.
- Cristina Adelaide Figueiredo** Instituto Adolfo Lutz, Divisão de Biologia Médica, São Paulo/SP.
- Daniel Altino de Jesus** Instituto de Saúde do Paraná, Laboratório Central, Curitiba/PR.
- Deborah Ines Teixeira Favaro** Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo/SP.
- Delia Rodrigues Amaya** Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas/SP.
- Dilza Maria Bassi Mantovani** Instituto de Tecnologia de Alimentos, Centro de Química de Alimentos e Nutrição Aplicada, Campinas SP
- Douglas Wagner Franco** Universidade de São Paulo, Instituto de Química, São Carlos/SP.
- Eduardo Purgatto** Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo/SP.
- Elaine Cristina Pinto Moreschi** Companhia Industrial Nestlé do Brasil Ltda, São Paulo/SP.
- Eliana Roxo** Instituto Biológico, Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal, São Paulo/SP.
- Elisabeth Maria Heins** Universidade de São Paulo, Instituto de Medicina Tropical, São Paulo/SP.

Elizabete Wenzel de Menezes Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo/SP.
Elizabeth Aparecida Ferraz da Silva Torres Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública, São Paulo/SP.
Emy Takemoto Instituto Adolfo Lutz, Divisão de Bromatologia e Química, São Paulo/SP.
Estevão de Camargo Passos Instituto Adolfo Lutz, Divisão de Laboratórios Regionais, Santos/SP.
Giselle Ibetta Silva Lopez Lopes Instituto Adolfo Lutz, Divisão de Bromatologia e Química, São Paulo/SP.
Gislaine Ricci Leonardi Universidade Metodista de Piracicaba, Faculdade de Ciências da Saúde, Piracicaba/SP.
Glavur Rogerio Matté Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública, São Paulo/SP.
Glória Maria Direito Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Veterinária, Rio de Janeiro/RJ.
Heitor Franco de Andrade Jr. Universidade de São Paulo, Instituto de Medicina Tropical, São Paulo/SP.
Herminia Yohko Kanamura Universidade de Taubaté, Instituto Básico de Biociências, Taubaté/SP.
Irma Nelly Gutierrez Rivera Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas, São Paulo/SP.
Ivone Martins Cipriano Universidade Federal de São Paulo, Departamento de Morfologia, São Paulo/SP.
Izildinha Moreno Instituto de Tecnologia de Alimentos, Centro de Tecnologia de Laticínios, Campinas/SP.
Jane Gonçalves Menegaldo Snow Instituto de Tecnologia de Alimentos, Centro Cereal Chocotec, Campinas SP.
Janete Alaburda Instituto Adolfo Lutz, Divisão de Bromatologia e Química, São Paulo/SP.
Jorge Mancini Filho Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo/SP.
Jorge Timenetsky Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas, São Paulo/SP.
José Ângelo Lauletta Lindoso Universidade de São Paulo, Instituto de Medicina Tropical, São Paulo/SP.
José Carlos Gomes Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Viçosa/MG.
José Luiz Pereira Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas/SP.
Juliana Pereira. Fundação Pró-Sangue, Hemocentro, São Paulo/SP.
Kátia Gianni de Carvalho Lima Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo/SP.
Kioko Takei Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo/SP.
Leonor Almeida de Souza Soares Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Departamento de Química, Rio Grande/RS.
Lígia Bicudo de Almeida Muradian Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo/SP.
Lúcia Maria Valente Soares Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas/SP.
Luiz Antonio Gioielli Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo/SP.
Márcia Regina Beaux Universidade Federal do Paraná, Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos, Curitiba/PR.
Márcia Regina Pennacino do Amaral Mello Instituto Adolfo Lutz, Divisão de Bromatologia e Química, São Paulo/SP.
Marcos Antonio Munhoz Hospital das Clínicas, Serviço de Hematologia, São Paulo/SP.
Maria Anita Scorsafava Instituto Adolfo Lutz, Divisão de Bromatologia e Química, São Paulo/SP.
Maria Aparecida Nicoletti Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo/SP.
Maria Aurora Prado Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo/SP.
Maria do Carmo Carvalho Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB), São Paulo/SP.
Maria Helena Iha Instituto Adolfo Lutz, Divisão de Laboratórios Regionais, Ribeirão Preto/SP.
Maria Helena Martini Instituto Adolfo Lutz, Divisão de Laboratórios Regionais, Campinas/SP.
Maria Helena Matté Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública, São Paulo/SP.
Maria Inês Zanoli Sato Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, Departamento de Análises Ambientais (CETESB), São Paulo/SP.

Maria Lucia Ribeiro Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Química de Araraquara, Araraquara/SP.

Marilda Duarte Instituto Adolfo Lutz, Divisão de Bromatologia e Química, São Paulo/SP.

Mário Tavares Instituto Adolfo Lutz, Divisão de Laboratórios Regionais, Santos/SP.

Marisa Landgraf Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo/SP.

Martha Hiromi Taniwaki Instituto de Tecnologia de Alimentos, Núcleo de Microbiologia, Campinas/SP.

Miracy Muniz de Albuquerque Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Recife/PE.

Monamaris Marques Borges Instituto Butantan, Laboratório de Bacteriologia, São Paulo/SP.

Neura Bragagnolo Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas/SP.

Neuza Jorge Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, São José do Rio Preto/SP.

Patrícia Bianca Clissa Instituto Butantan, Laboratório de Imunopatologia, São Paulo/SP.

Patrícia Sartorelli Universidade Federal de São Paulo, Curso de Química, Campus Diadema, Diadema/SP.

Paulo Roberto Nogueira de Carvalho Instituto de Tecnologia de Alimentos, Divisão de Pesquisa, Campinas/SP.

Pedro Luiz Silva Pinto Instituto Adolfo Lutz, Divisão de Biologia Médica, São Paulo/SP.

Pedro Manuel Leal Germano Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública, São Paulo/SP.

Pedro Paulo Chieffi Universidade de São Paulo, Instituto de Medicina Tropical, São Paulo/SP.

Regina Maura Cabral de Melo Abrahão Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública, São Paulo/SP.

Rosemar Antoniassi Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisa de Tecnologia Agroindustrial de Alimentos, Rio de Janeiro/RJ.

Sidinea Cordeiro Freitas Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisa de Tecnologia Agroindustrial de Alimentos, Rio de Janeiro/RJ.

Silvana do Couto Jacob Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Rio de Janeiro/RJ.

Solange Maria Gennari Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, São Paulo/SP.

Sylvia Luisa Pincherle Cardoso Leão Universidade Federal de São Paulo, Departamento de Microbiologia Imunobiologia e Parasitologia, São Paulo/SP.

Tânia Aparecida Tardelli Gomes do Amaral Universidade Federal de São Paulo, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, São Paulo/SP.

Tânia Mara Amâncio Peixoto Fundação Ezequiel Dias, Instituto Octávio Magalhães, Belo Horizonte/MG.

Terezinha de Jesus Andreoli Pinto Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo/SP.

Valéria Christina Amstalden Junqueira Instituto de Tecnologia de Alimentos, Núcleo de Microbiologia, Campinas/SP.

Vera Akiko Maihara Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Comissão Nacional de Energia Nuclear, São Paulo/SP.

Viviane Emi Nakano Fukasawa Instituto Adolfo Lutz, Divisão de Bromatologia e Química, São Paulo/SP.

Agradecimento especial pela revisão do inglês

Letícia Maria de Campos Secretaria de Estado da Saúde, Coordenadoria de Controle de Doenças, São Paulo/SP.

Mirthes Ueda Instituto Adolfo Lutz, Divisão de Biologia Médica, São Paulo/SP.

Diagramação visual e layout

Marcos Rosado Secretaria de Estado da Saúde, Coordenadoria de Controle de Doenças, São Paulo/SP.

ISSN 0073-9855



9 770073 985009