

# REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ

ISSN 0073-9855  
RIALA6



Volume 66 número 2, 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 2, 2007**

**ISSN 0073-9855**

**Maio – Agosto - 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 Atuf

## Conselho Editorial/Editorial Board

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

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

## Setor de Publicações

Rocely Aparecida de Souza Bueno

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

1941-2006,  
2007, 66 (2)

ISSN 0073-9855  
RIALA 6

CDD<sub>18</sub> 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/Fax: (11) 3082-9939  
Email: [rial@saude.sp.gov.br](mailto:rial@saude.sp.gov.br)

## 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 revidados com as cópias dos pareceres serão devolvidos aos autores para as devidas correções. Há sigilo no decorrer deste processo. O novo texto deverá retornar aos Editores que notificarão a aceitação ou a recusa do artigo. A lista de pareceristas que colaboraram em cada volume é publicada no último fascículo do ano.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

### 8. Preparação do manuscrito ou artigo

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

#### Estrutura

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

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

**Palavra-chave:** podem ser utilizados até seis descritores que identifiquem o conteúdo do artigo, se possível baseados no DECS (Descritores em Ciências da Saúde), disponível no [www.bireme.br](http://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](http://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. 2<sup>nd</sup> 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 2<sup>nd</sup> 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 3<sup>rd</sup> 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](mailto: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>

SUMÁRIO/CONTENTS

Artigos de Revisão/ Review Articles

- 1111 **Métodos analíticos para detecção de glúten em alimentos.**  
Analytical methods for detecting gluten in foods.  
Sônia F. C. BARBOSA, Rejane Weissheimer de ABREU, Odair ZENEBO ..... 89-94
- 1112 **Ácido fólico e fortificação de alimentos.**  
Folic acid and food enrichment.  
Janete ALABURDA, Luzia SHUNDO ..... 95-102

Artigos Originais/ Original Articles

- 1113 **Matérias estranhas em erva-mate (*Ilex paraguariensis* St Hil) beneficiada no estado de Santa Catarina, Brasil.**  
Extraneous material in maté (*Ilex paraguariensis* St Hil) industrialized in Santa Catarina state, Brasil.  
Rose M. de Oliveira MENDES, Marinho B. QUADRI, Mara G. N. QUADRI ..... 103-107
- 1114 **Determinação de fenitrotiona em farinha de trigo.**  
Fenitrothion determination in wheat flour.  
Thaís V. MILANEZ, Viviane E. NAKANO, Tereza A. KUSSUMI, Sonia B. ROCHA, Heloísa H. B. TOLEDO ..... 108-112
- 1115 **Método de digestão parcial de feijão cru (*Phaseolus vulgaris*) por hidrólise ácida para a determinação simultânea de nutrientes inorgânicos por ICP OES: validação e aplicação.**  
A partial digestion method of raw bean (*Phaseolus vulgaris*) by acid hydrolysis for simultaneously determining inorganic nutrients by means of ICP OES: validation and application.  
Isaura A. OKADA, Maria C. DURAN, Marcia L. BUZZO, Sérgio DOVIDAUSKAS, Alice M. SAKUMA, Odair ZENEBO ..... 113-119
- 1116 **Níveis de retinol em iogurtes naturais comercializados em supermercados de Natal/RN.**  
Retinol concentrations in natural yogurt on sale in supermarkets located in Natal, RN.  
Juliana K. G. RIBEIRO, Fernanda B. SOARES, Danielle S. BEZERRA, Roberto DIMENSTEIN ..... 120-124
- 1117 **Características físico-químicas do leite pasteurizado tipo C e leite Ultra Alta Temperatura comercializados na cidade do Rio de Janeiro.**  
Physical- chemical features of pasteurized and Ultra High Temperature milk marketed in the city of Rio de Janeiro.  
Pedro de M. ARRUDA, Adriano G. da CRUZ, Sidney S. ZOELLNER, Ramon SILVA, Michael M. SOARES, Vanessa S. FERNANDES, Ana Paula G. L. K. GALVÃO ..... 125-129

- 1118 **Composição do leite de éguas da raça Mangalarga Marchador.**  
Composition of Mangalarga Marchador mare milk.  
Alline de Paula REIS, Albenones J. de MESQUITA, Carlos H. G. MOREIRA, Edmêe A.F. CURADO, Ediane B. da SILVA, Edmar S. NICOLAU ..... 130-135
- 1119 **Características físico-químicas do leite de cabra comercializado no estado da Paraíba, Brasil.**  
Physic-chemical characteristics of goat milk marketed in Paraíba state, Brazil.  
Roberto G. COSTA, Edvaldo M. BELTRÃO FILHO, Rita de Cássia R.E. GUEIROGA, Ariosvaldo N. MEDEIROS, Celso J. B. de OLIVEIRA, Ingrid C. D. GUERRA ..... 136-141
- 1120 **Otimização e validação de metodologia analítica para determinação de flavonóis e flavonas por CLAE em hortaliças.**  
Optimization and validation of HPLC methodology for determining flavonols and flavones in vegetables  
Lísia S. HUBER, Delia B. RODRIGUEZ-AMAYA, Maria I. RODRIGUES ..... 142-151
- 1121 **Avaliação da capacidade antioxidante do extrato de gengibre (*Gengiber officinale*) adicionado ao óleo de soja em teste de estocagem acelerada.**  
Evaluation of the antioxidant capacity of ethanolic ginger extract (*Gengiber officinale*) in accelerated incubator-storage test.  
Denise ANDREO, Neuza JORGE ..... 152-157
- 1122 **Atividade antioxidante de extratos de bagaço de uva das variedades Regente e Pinot Noir (*Vitis vinifera*).**  
Antioxidant activity of grape bagasse extracts from Regente and Pinot Noir varieties (*Vitis vinifera*).  
Ismael I. ROCKENBACH, Graciela L. da SILVA, Eliseu RODRIGUES, Luciano V. GONZAGA, Roseane FETT ..... 158-163
- 1123 **Mercurio total em pescado da cadeia produtiva da Baixada Santista, estado de São Paulo, Brasil.**  
Total mercury in fishes from the productive chain at the Santos coastal region, São Paulo, Brazil.  
Marcelo A. MORGANO, Agar C. A. de PEREZ, Raquel F. MILANI, Dilza M. Bassi MANTOVANI, Cristiane R. P. NEIVA, Erika F. FURLAN, Rúbia Y. TOMITA, Roberto da Graça LOPES, Marildes J. Lemos NETOS ..... 164-171
- 1124 **Deteção de bactérias gram-negativas não fermentadoras em água tratada para diálise.**  
Detection of non-fermenting gram-negative bacteria in treated water for dialysis procedure purpose.  
Adriana BUGNO, Adriana A. Buzzo ALMODÓVAR, Tatiana C. PEREIRA, Mariângela T. AURICCHIO ..... 172-175
- 1125 **Determinação de basicidade em produtos alisantes de cabelos contendo guanidina e hidróxido de cálcio em sua formulação.**  
Alkalinity determination in guanidine and hydroxide-containing hair straightening creams.  
Maria Cristina SANTA BARBARA, Lígia Luriko MIYAMARU, Jaim LICHITIG ..... 176-180
- 1126 **Influência da qualidade das culturas de *Mycobacterium tuberculosis* nos resultados negativos dos testes da pirazinamidase.**  
Influence of *Mycobacterium tuberculosis* cultures quality conditions on negative results on pyrazinamidase testing.  
Jonas U. YAMAUCHI, Marina S. HAYASHI, Suely Y. Mizuka UEKI, Carmen M. S. GIAMPAGLIA, Rosângela S. OLIVEIRA, Fábio O. LATRILHA, Maria Alice da Silva TELLES, Maria Conceição MARTINS ..... 181-184
- 1127 **Avaliação do diagnóstico da leishmaniose visceral canina com a utilização de teste rápido com antígeno recombinante K39 em regiões endêmicas do estado de São Paulo.**  
Assessment of canine visceral leishmaniasis diagnosis by means of a rapid test using recombinant antigen K39 in endemic regions of São Paulo State, Brazil.  
Márcia C. BISUGO, Maria de Fátima L. ARAÚJO, Helena H. TANIGUCHI, Elaine A. CUNHA, . Andréa A. SANTOS, Mário SPESSOTO JUNIOR, Carlos N. KANETO, Cristiane V.O. CAMARGO, Milson A. POLIZEL, Marco A.N. VIGILATO, Cláudia M.S. NEGREIROS, Mashami OKAGIMA, Nilton M. GONÇALVES, Larissa P. LUNDSTEDT, Andréa M. ANDRADE, Valéria M.F.LIMA, J. Eduardo TOLEZANO ..... 185-193

- 1128 **Diagnóstico laboratorial da coqueluche: frequência do isolamento de *Bordetella pertussis* de amostras clínicas, por meio da técnica de cultura realizada nos laboratórios regionais do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brasil.**  
 Pertussis diagnosis: frequency of *Bordetella pertussis* detection from clinical samples by the culture method performed at regional laboratories of the Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brazil.  
 Rosana B. de OLIVEIRA e SILVA, Eneida G. LEMES-MARQUES, Marta I. C. MEDEIROS, Ivete A. Z. C. de ALMEIDA, Maria Regina N. R. ESPER, Maricene GARBELOTTI, Maria LOPES, Saete F. PORTO, Regina R. F. e SILVA, Beatriz P. PREGNOLATTO, Jane P. dos SANTOS, Ângela Maria G. DIAS ..... 194-200
- 1129 **Riboflavin deficiency in pregnant women in a public institution of São Paulo city, SP, Brazil**  
 Avaliação da deficiência de riboflavina em gestantes de uma instituição pública da cidade de São Paulo, SP, Brasil.  
 Marilena OSHIRO, Karen MIGUITA, Raimundo A. G. OLIVEIRA, Lorena K. F. S. FONSECA, Orlando C. O. BARRETTO ..... 201-205

## RESUMOS DE TESES E DISSERTAÇÕES

- Avaliação das condições higiênico-sanitárias do pescado beneficiado em indústrias paraenses e aspectos relativos à exposição para consumo em Belém, Pará.**  
 Evaluation of hygienic and sanitary quality of fish processed at industries in Northern Brazil and some aspects of the exposition for selling in Belém city, Brazil  
 Farias, MCA ..... 206
- Monitoramento vetorial e do vírus Dengue, Belo Horizonte, Minas Gerais.**  
 Vectorial and Dengue virus monitoring, Belo Horizonte, Minas Gerais.  
 Avendanha, JS ..... 207
- Survey of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies by modified agglutination test in chickens slaughtered for consumption in Belém city, Northern Brazil.**  
 Pesquisa de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* pelo teste de aglutinação modificado em soros de frango de corte abatidos para consumo em Belém-Pará, Brasil,  
 Barbosa, SAA ..... 208
- Methodological optimization for determination of benzo(a)pyrene in cachaças by HPLC with fluorescence detection and evaluation of its occurrence.**  
 Otimização de metodologia para determinação de benzo(a)pireno em cachaças por CLAE com detecção de fluorescência e avaliação de sua ocorrência.  
 Caruso, MSF ..... 209
- Caracteres epidemiológicos clínicos e laboratoriais das Estafilococcias em Manaus – AM.**  
 Epidemiologic, clinical and laboratorial caracteres of *Stafilococcus* in Manaus-AM.  
 Carvalho, MAN ..... 210
- Avaliação das expressões imunocitoquímicas das proteínas p16<sup>INK4a</sup> e Ki-67 em esfregaços cérvico-vaginais colhidos em base líquida, com diagnóstico citológico negativo e ASC-US, com Captura Híbrida 2 e/ou PCR positivos para HPV de alto risco.**  
 Assessment of immunocytochemistry of p16<sup>INK4a</sup> and Ki-67 protein in liquid based cervical smears, with negative and ASC-US diagnosis, with high risk HPV positive in Hybrid Capture 2 and/ or PCR.  
 Namiyama, GM ..... 211
- Efeito antioxidante do extrato de gengibre (*Zingiber officinale*) em óleo de soja submetido ao aquecimento.**  
 Antioxidant effect of ginger extract (*Zingiber officinale*) in soybean oil under heating.  
 Andreo, D ..... 212

# Métodos analíticos para detecção de glúten em alimentos

## Analytical methods for detecting gluten in foods

RIALA6/1111

Sônia França Correia BARBOSA\*<sup>1</sup>, Rejane Weissheimer de ABREU<sup>2</sup>, Odair ZENEON<sup>2</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Instituto Adolfo Lutz, Divisão de Biologia Médica, Seção de Imunologia, Av. Dr. Arnaldo, 351, 11º andar, Cerqueira Cesar CEP 01246-902 São Paulo/SP e-mail: sbarbosa@ial.sp.gov.br.

<sup>2</sup>Instituto Adolfo Lutz, Divisão de Bromatologia e Química, São Paulo/SP.

Recebido: 05/01/2007 – Aceito para publicação: 29/06/2007

### RESUMO

O tratamento para a doença celíaca (DC) consiste em dieta livre das prolaminas: gliadina, hordeína, secalina e avenina existentes no trigo, centeio, cevada e aveia. A Comissão do *Codex Alimentarius* (FAO/WHO) definiu o limite de 200 ppm (mg/kg) de glúten para o alimento ser considerado livre desse produto. A revisão de 2004 do *Codex Alimentarius* sugeriu o limite de 20 ppm para produtos naturalmente sem glúten e de 200 ppm para produtos derivados de ingredientes não fonte de glúten, porém esses limites estão ainda em discussão. Entre os métodos analíticos para detectar ou determinar glúten/gliadina têm sido empregadas as técnicas de: espectrometria de massa, cromatografia líquida, análise de DNA do trigo e imunoenzimáticos. O método oficial adotado pela *Association of Official Analytical Chemistry* (AOAC) é o ELISA baseado no anticorpo monoclonal para  $\omega$  gliadina. O *Codex Alimentarius* endossou temporariamente, o R5 ELISA como Método Tipo I. O R5 ELISA utiliza anticorpo monoclonal para o pentapeptídeo tóxico existente na gliadina, hordeína e secalina. O ELISA, em função de sua maior sensibilidade e apropriado limite de detecção (1,5 ppm de gliadina), é considerado superior às demais técnicas. A presença de pequenos fragmentos de proteína existentes em prolaminas hidrolisadas devem ser avaliados por métodos baseados em DNA.

**Palavras chave.** doença celíaca, gliadina, glúten, epítopos tóxicos, ELISA.

### ABSTRACT

Treatment of celiac disease (CD) is consisted of a diet free of prolamins as gliadin, hordein, secalin, and avenin existing in wheat, barley, rye, and oats. The *Codex Alimentarius Commission* (FAO/WHO) has defined the maximum gluten content of 200 ppm (mg/kg) to consider as gluten-free products. The *Codex Commission* Review 2004 recommended the limits of 20 mg/kg dry mass for naturally gluten-free products, and 200 mg/kg for food derived from gluten-free products. Among analytical methods for detecting or determining glúten/gliadin the following techniques have been used: mass spectrometry, high performance-liquid chromatography, wheat DNA analysis by PCR, and immunoenzyme assay. ELISA based on monoclonal antibody for  $\omega$  gliadin has been the technique officially recommended by the *Association of Official Analytical Chemistry* (AOAC). R5-ELISA has got a provisory approval from the *Codex Alimentarius* as type I method. R5-ELISA is based on the use of a monoclonal antibody for pentapeptide occurring in gliadin, hordein, secalin, and avenin, and this assay presents sensitivity and limit detection (1.5 ppm gliadin) rates superior in comparison to other techniques. Although, the qualitative analysis for detecting the presence of small fragment of protein in hydrolized prolamine should be assessed by means of DNA-based techniques.

**Key-words.** celiac disease, gliadin, gluten toxic epitope, ELISA

## INTRODUÇÃO

A doença celíaca (DC) é uma patologia caracterizada pela intolerância permanente as prolaminas existentes no trigo, centeio, cevada ou aveia, resultando em atrofia total ou subtotal do intestino delgado proximal ocasionando má absorção dos nutrientes<sup>1</sup>. A interação entre fatores genéticos, imunológicos e ambientais explica a heterogeneidade da doença. A DC está associada aos genes do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) e, em particular, ao HLA-DQ2 ou HLA-DQ8, mas outros genes, HLA e não HLA, também estão relacionados no desenvolvimento da doença. A lesão intestinal é mediada por componentes humorais e celulares da resposta imunológica<sup>2</sup>. O tratamento existente é uma dieta livre de prolaminas<sup>3</sup> existentes no trigo, centeio, cevada e aveia. Estudos populacionais indicam que 0,5% e 1% da população do Oeste Europeu<sup>4</sup> e da América do Norte<sup>5</sup>, respectivamente, sofrem de DC, correspondendo em torno de três a seis milhões de pessoas. No Brasil, Patresi et al<sup>6</sup>, em Brasília, estudaram um grupo de 4405 pacientes sem suspeita clínica prévia, observando a prevalência de 1/169 em crianças e 1/474 em adultos com a forma atípica da DC. Este estudo mostra que a DC não é rara no Brasil e na maioria dos casos está sendo subdiagnosticada. O objetivo deste trabalho foi o de revisar os conceitos epidemiológicos, a expressão clínica da doença celíaca e sua prevenção através de alimento livre de glúten assegurado por métodos analíticos.

### Química das proteínas do glúten

As proteínas do glúten representam 80% das proteínas totais dos grãos formada por um complexo de proteínas-lipídio-carboidrato com a seguinte composição proteína (75%); carboidrato (15%); lipídio (6%) e minerais (0,8%).

As proteínas dos cereais podem ser divididas em quatro classes segundo a sua solubilidade<sup>7</sup> (1) albuminas solúveis em água, (2) globulinas solúveis em soluções salinas, (3) prolaminas solúveis em soluções de álcoois a 70 e 90% e glutelinas solúveis em soluções ácidas ou alcalinas. As prolaminas e glutelinas constituem 80 a 90% do total das proteínas do trigo, centeio, cevada, enquanto que as albuminas e globulinas contribuem com 20% ou menos. Na aveia as globulinas são predominantes, representando aproximadamente 56% da proteína de reserva. As prolaminas são denominadas de gliadina no trigo, hordeína na cevada, secalina no centeio e avenina na aveia enquanto para as glutelinas, tem-se a glutelina no trigo, a hordenina na cevada<sup>8</sup>.

Quanto ao peso molecular as gluteninas possuem alto peso molecular (APM), as gliadinas  $\omega$  1,2 médio peso molecular (MPM), as gliadinas  $\alpha$ ,  $\gamma$  e subunidades de glutenina baixo peso molecular (BPM). Gliadinas são monômeros de proteínas classificadas em  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\omega$  conforme sua mobilidade eletroforética. A diferença entre as duas primeiras é pequena, sendo designadas de  $\alpha/\beta$ . As gliadinas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  têm estrutura compacta, são ricas em enxofre e não são estáveis ao tratamento térmico. As  $\omega$  gliadinas podem ser subdivididas, de acordo com

a sua composição de aminoácidos e seqüência de N terminais, em dois formatos:  $\omega 5$  e  $\omega 1,2$ . A fração das  $\omega$  gliadinas não contém cisteína e, portanto, não estão envolvidas na troca de dissulfeto, sendo por esta razão termoestável. As  $\alpha$  e  $\gamma$  gliadinas possuem unidades repetitivas do formato  $\alpha$ , formada pelos peptídeos glutamina-prolamina-glutamina-prolina-prolina prolina glutamina glutamina fenilalanina-prolina-tirosina-fenilalanina (G.P.G.P.P.P.G.G.Fen.P.Tir.Fen) que são repetidos por cinco vezes. A unidade típica do formato  $\gamma$  é P.G.G.P.Fen.P.G., repetida por 16 vezes e interespaçada por G.G.G.Tir.G.G, L.G.G ou P.G.G. Os diferentes grupos de proteínas são homólogos em duas das cinco regiões e são tipicamente diferentes nos N terminais e seqüências repetidas<sup>3</sup>.

As gluteninas são agregados de proteínas ligadas intermolecularmente por pontes de dissulfeto, podendo originar um amplo espectro de pesos moleculares, atingindo a ordem de milhões. Após redução das pontes de dissulfeto, as subunidades de glutenina mostram solubilidade similar à das gliadinas. Com base na estrutura primária, as gluteninas podem ser divididas em subunidades de APM, incluindo os formatos x e y, e subunidades de BPM<sup>9</sup>.

A importância do glúten na tecnologia de panificação se prende às propriedades de coesividade-elasticidade da massa obtida a partir da farinha e de outros ingredientes incorporados à farinha<sup>8</sup>.

O aspecto estrutural destas proteínas reflete a relação taxonômica entre os cereais. Desta maneira, nas *Triticeae* (trigo, centeio e aveia) estão presentes os três tipos de grupos de proteínas de alto, médio e baixo peso molecular. As prolaminas das aveias (aveninas) podem ser classificadas como pertencentes ao grupo BPM. As proteínas do arroz, milho e sorgo não possuem relação com as *Triticeae*<sup>3</sup>.

### Relação entre a estrutura química e toxicidade celíaca

As prolaminas tóxicas para celíacos são gliadina, secalina, hordeína e a avenina. Ensaio *in-vitro* (em cultura de células de intestino delgado) demonstraram que todos os tipos de gliadinas ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\omega$ ) produzem efeitos tóxicos. A gliadina e fragmentos formados por digestão péptica estimulam monócitos e aumentam interleucina 8 e a produção de interferon  $\alpha^9$ . As subunidades de glutenina de alto peso molecular estimulam células do intestino delgado de celíacos e produzem aumento de interleucina 5 após 2 horas ao desafio<sup>10</sup>. Alguns indivíduos com doença celíaca podem ser sensíveis às proteínas existentes na aveia<sup>11-13</sup>. Estudos têm demonstrado que a maioria dos indivíduos com doença celíaca pode tolerar um limite diário de 50 g de aveia<sup>14</sup>. A controvérsia sobre a sua toxicidade pode ser explicada pela presença de trigo, centeio e/ou cevada na maioria dos alimentos com farinhas de aveia comercializadas na Europa, EUA e Canadá<sup>15</sup>.

### Limites clínicos de tolerância ao glúten

A contaminação do glúten em produtos livres de glúten deve ser evitada. Para minimizar tais riscos na produção,

recomenda-se a adesão às diretrizes de “Boas Práticas de Fabricação” referentes à fabricação, rotulagem e informação aos consumidores<sup>16</sup>. A dificuldade em se estabelecer os limites aceitáveis de traços de glúten em amostras livres de glúten é devido à toxicidade e imunogenicidade das prolaminas não serem idênticas em todos os pacientes celíacos<sup>3</sup>.

Estudo de micro desafio, formato duplo-cego, utilizando placebo e grupo controle selecionado ao acaso foi realizado em 49 adultos com biópsia comprovada de doença celíaca, tratados com dieta livre de glúten por tempo maior ou igual há dois anos. Não foram observadas mudanças clínicas e sorológicas nestes pacientes quando submetidos à exposição de 10 a 50 mg de glúten ao dia por três meses. As biopsias dos pacientes que ingeriram 50 mg por dia de glúten apresentaram, aumento de linfócitos intraepiteliais, e ligeira hiperplasia das criptas intestinais<sup>17</sup>. O significado estatístico destes valores não pode ser considerado devido ao pequeno número de participantes por grupo estudado, e a baixa hiperplasia observada com relação ao início dos testes de desafio dos participantes. A informação dos limites de tolerância ao glúten dos pacientes com DC é crucial para a legislação dos alimentos livres de glúten e deve ser estabelecida por estudos aleatórios com número significativo de pacientes para ser conclusiva<sup>18-20</sup>. O alimento livre de glúten para ser consumido pelo celíaco deve obedecer os limites estabelecidos pelo Comissão do *Codex Alimentarius* não sendo necessária a sua total ausência no produto analisado.

### Alimentos livres de glúten

O *Codex Alimentarius Committee on Nutrition e Food for Special Dietary* adotaram o primeiro padrão de alimento livre de glúten em 1981 (*Codex Stan 118-1981*)<sup>21</sup> avaliado em 0,05 g de nitrogênio por 100g de produto seco (referente ao amido do trigo). Na última revisão do *Codex Alimentarius*, foi proposto o limite de 20 ppm para alimentos naturalmente sem glúten e 200 ppm de glúten para misturas de ingredientes derivadas com não contêm glúten<sup>22</sup>. Estes valores estão apoiados na dose de glúten tolerada pelos pacientes celíacos e na análise dos alimentos livres de glúten. Estes parâmetros estão em discussão devido aos estudos terem sido realizados com pequeno número de pacientes e os alimentos livres de glúten analisados pelo ELISA que utiliza anticorpo monoclonal para  $\omega$  gliadina com sensibilidade e especificidade menor do que o R5 ELISA. A revisão dos limites (*Codex document ALINORN 07/30/26 APPENDIX IV*) estabelece um novo limite de 20mg/kg para produto constituído por alimento naturalmente livre de glúten e uma quantidade não superior a 100mg/kg na mistura de dois ingredientes naturalmente livres de glúten e no alimento processado derivado de ingredientes não fontes de glúten<sup>23</sup>.

### Regulamentação

No Brasil a lei 10.674/2003<sup>24</sup> obriga as inscrições “CONTÊM GLÚTEN ou NÃO CONTÊM GLÚTEN” nos rótulos dos produtos alimentícios e farmacêuticos, comercializados, como medida preventiva e de controle da

doença celíaca. A Lei até o momento não foi regulamentada devido a não definição de padrões para um alimento ser considerado livre de glúten.

## MÉTODOS DE ANÁLISE DE GLÚTEN

As gliadinas podem ser detectadas por espectrometria de massa<sup>25</sup>, cromatografia líquida de alta resolução<sup>26</sup>, análise de DNA<sup>27,28</sup>, e métodos imunológicos<sup>29-36</sup>. A espectrometria de massa é utilizada para triagem, enquanto a cromatografia líquida de alta resolução é altamente específica, uma vez que as prolaminas dos cereais são conhecidas. Entretanto, este método tem sensibilidade e especificidade mais baixa do que os imunológicos, possuem custo mais elevado maior tempo de execução, e com frequência apresentam resultados não confiáveis quando o alimento for processado ou aquecido. O emprego do método de PCR pode ser utilizado na detecção do DNA do trigo para confirmar a análise de alimentos onde o método de ELISA não for conclusivo. As técnicas imunológicas adotadas na detecção de glúten são ELISA<sup>29,30</sup>, *Western blotting*<sup>31</sup>, e *dot blotting*<sup>32</sup>. Os métodos para a análise de glúten confrontam-se com diferentes problemas, tais como natureza heterogênea dos alimentos, composição variável do glúten e dificuldade de quantificar produtos processados aquecidos ou quando o glúten estiver parcialmente hidrolisado.

### Padrão de gliadina

A seleção de um padrão de gliadina adequado é crucial para a determinação de glúten em amostras de alimentos. Durante a extração de gliadinas com etanol a presença de proteínas de alto e médio peso molecular pode superestimar os resultados do ELISA. O padrão de gliadina (Sigma) pode ser estocado em solução alcoólica a 60% ou liofilizado. Alíquotas de 250 $\mu$ L em solução alcoólica a 60% numa concentração de 500 $\mu$ g/mL são estáveis pelo menos por 10 $\mu$ g meses à temperatura ambiente<sup>30</sup>. Um novo padrão de gliadina foi produzido a partir de 28 diferentes variedades de trigo mais frequentes na Inglaterra, França e Alemanha<sup>33</sup>. O padrão possui alto conteúdo de proteína, boa solubilidade, estabilidade e sensibilidade frente a diferentes anticorpos para gliadinas em ensaios de ELISA. O padrão está para ser certificado como IRMM-480 pela Comissão Européia<sup>34</sup> do (Institute Reference Materials and Measurements Geel, Bélgica).

### Processos de extração

A solução de 40 a 70 % de etanol pode ser empregada para a extração em alimentos de  $\omega$  gliadinas estáveis ao calor e pequenas quantidades de  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  gliadinas. A maioria das  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  gliadinas somente é extraída por redução e com o uso de agentes desagregantes. Observam-se diferenças de resultados quando se compara a solução coquetel contendo 250 mm de 2-mercaptoetanol e 2M de cloridrato de guanidina revelando alta eficiência na detecção de gliadina em produtos aquecidos.

O coquetel pode ser usado como processo geral em todos os métodos para aumentar o desempenho da análise de gliadina em alimentos<sup>35</sup>.

### Métodos utilizando anticorpos policlonais

Friis, em 1981<sup>36</sup>, desenvolveu o método de ELISA competitivo utilizando anticorpos policlonais para prolaminas. O limite de detecção foi de 1ng de antígeno, mas somente podia ser aplicado em alimentos não processados. Troncone et al<sup>37</sup> utilizaram o ELISA formato sanduíche com anticorpos IgG de coelho específicos para gliadina. O ensaio exibiu alta sensibilidade, mas houve reação cruzada com prolaminas do arroz e milho. Fredman et al.<sup>38</sup> analisaram produtos sem glúten empregando ELISA formato sanduíche utilizando anticorpo policlonal para gliadina como para captura e um segundo anticorpo monoclonal para gliadina. O limite de detecção foi 15ng. O ensaio detectou todos os tipos de prolaminas tóxicas aos celíacos, não se evidenciando as proteínas não tóxicas do arroz e milho. Chirido et al.<sup>39</sup> desenvolveram o ELISA competitivo usando anticorpo policlonal com alto grau de detectabilidade, e discriminaram as prolaminas não tóxicas para celíacos. Anticorpos policlonais reagem com diferentes epítomos e, como consequência, os resultados são menos dependentes da cultura de trigo<sup>40</sup>. A desvantagem é que o efeito desnaturante do processo de aquecimento das amostras alimentícias faz com que algumas frações de gliadina sejam pouco extraídas e, desta maneira, os epítomos não estão disponíveis para reagir com o anticorpo, influenciando fortemente o resultado<sup>41</sup>.

### ELISA com anticorpo monoclonal

O método oficialmente aceito pela *Association of Official Analytical Chemistry* (AOAC) utiliza anticorpo monoclonal para  $\omega$  gliadinas, que são estáveis ao calor<sup>3</sup>. O limite de detecção é de 16mg/100 g de gliadina, possui baixa sensibilidade para aveia e cevada e não detecta as prolaminas do arroz e milho. Existe um risco de serem estimados valores acima ou abaixo do total de gliadina devido à concentração das  $\omega$  gliadinas variar de 6% a 20% em função da variedade do trigo<sup>42</sup>. O R5 ELISA utiliza anticorpo monoclonal dirigido contra o pentaptídeo tóxico G.G.P.F.P. existente nas  $\alpha$ ,  $\gamma$  e  $\omega$  gliadinas, existente em diferentes variedades de trigo, centeio, cevada e gluteninas de baixo peso molecular<sup>43</sup>. Não é cultivo dependente, é compatível com a solução de extração coquetel, sendo hábil para detectar produtos aquecidos ou não. O anticorpo não reage com as prolaminas do milho, arroz e aveia. O ensaio utiliza gliadina padrão (IRM-480) e detecta glúten em alimentos contendo transglutaminase utilizada para o enriquecimento da farinha. O conteúdo de glúten no alimento é calculado levando-se em conta a estimativa de que 50% do glúten está sob a forma de gliadina<sup>30</sup>. Estudo colaborativo realizado com dois kits comerciais R5 ELISA, foram comparados. Os resultados demonstraram que a repetitividade e a reprodutibilidade dos dois kits foram aceitáveis para o teste de ELISA e garantiram uma sensibilidade 1,5 ppm de gliadina

em alimento livre de glúten<sup>44</sup>. O R5 ELISA pode ser empregado na triagem de prolaminas hidrolisadas da cevada e do trigo (como maltodextrinas, prolaminas no malte e cerveja etc) provenientes da proteólise ocorrida durante o processamento do alimento, sendo que os resultados podem ser confirmados por *Wethern blot*<sup>45</sup>.

## CONCLUSÃO

Assegurar que um alimento é livre de glúten é de vital importância para o doente celíaco sendo imperativa a necessidade de métodos analíticos confiáveis para atender a legislação. Novos estudos devem ser realizados para se estabelecer a quantidade de glúten tolerada pelos celíacos. O R5 ELISA foi endossado, provisoriamente pelo *Codex Alimentarius* como Método Tipo I para a análise de glúten após sua avaliação por ensaios colaborativos. O R5 ELISA possui limitações preocupantes devido ao padrão de gliadina não ter sido aceito internacionalmente e o anticorpo não reconhecer subunidades de alto peso molecular de glutenina conhecida por ser tóxica em pacientes celíacos. Outros métodos deverão ser desenvolvidos utilizando o anticorpo monoclonal para pentaptídeo tóxico, proporcionando melhores resultados do que do que o método R5 ELISA para a análise de glúten. Por outro lado, a análise qualitativa indicando fragmentos de proteína de glúten deve ser baseada em métodos de DNA.

## REFERÊNCIAS

1. Catassi C, Ratsch IM, Fabiani E, Rossini M, Bordicchia F, Candela F, et al. Coeliac disease in the year 2000: exploring the iceberg. *Lancet*. 1994; 343(8891):200-3.
2. Utiyama SR, Reason IJ, Kotze LM. Genetics and immunopathogenesis aspects of the celiac disease: a recent vision. *Arq Gastroenterol*. 2004; 41(2): 121-8.
3. Stern M, Ciclitira PJ, van Eckert R, Feighery C, Janssen FW, Méndez, et al. Analysis and clinical effects of gluten in coeliac disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2001; 13(6):741-7.
4. Rostami K, Mulder CJ, Werre JM, van Beukelen FR, Kerchhaert J, Crusius JB, et al. High prevalence of celiac disease in apparently healthy blood donors suggests a high prevalence of undiagnosed celiac disease in the Dutch population. *Scand J Gastroenterol*. 1999; 34(3): 276-9.
5. Fasano A, Berti I, Gerarduzzi T, Not T, Colletti RB, Drago S, et al. Prevalence of celiac disease in at-risk and not-at-risk groups in the United States: a large multicenter study. *Arch Intern Med*. 2003; 163(3): 286-92.
6. Pratesi R, Gandolfi L, Garcia SG, Modelli IC, Lopes de Almeida P, Bocca AL, et al. Prevalence of coeliac disease: unexplained age-related variation in the same population. *Scand J Gastroenterol*. 2003; 38(7): 747-50.

7. Osborne, TB. The vegetable proteins 2nd London: Longmans Green and Company 1924.
8. Sgarbieri, VC. Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações, modificações/Valdemiro C.Sgarbieri.-São Paulo: Livraria Varela, 1996.
9. Dewar DH, Amato M, Ellis HJ, Pollock EL, Gonzalez-Cinca N, Wieser H, Ciclitira PJ. The toxicity of high molecular weight glutenin subunits of wheat to patients with coeliac disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2006; 18(5):483-91.
10. Shidrawi RG, Day P, Przemioslo R, Ellis HJ, Nelufer JM, Ciclitira PJ. In vitro toxicity of gluten peptides in coeliac disease assessed by organ culture. *Scand J Gastroenterol*. 1995; 30(8):758-63.
11. Arentz-Hansen H, Fleckenstein B, Molberg O, Scott H, Koning F, Jung G, et al. The molecular basis for oat intolerance in patients with celiac disease. *PLoS Med*. 2004; 1(1):e1. Epub 2004.
12. Lundin KE, Nilsen EM, Scott HG, Loberg EM, Gjoen A, Bratlie J, et al. Oats induced villous atrophy in coeliac disease. *Gut*. 2003; 52(11):1649-52.
13. Janatuinen EK, Kempainen TA, Julkunen RJ, Kosma VM, Maki M, Heikkinen M, et al. No harm from five year ingestion of oats in coeliac disease. *Gut*. 2002; 50(3):332-5.
14. Størsrud S, Olsson M, Arvidsson Lenner R, Nilsson LA, Nilsson O, Kilander A. Adult coeliac patients do tolerate large amounts of oats. *Eur J Clin Nutr*. 2003; 57(11): 163-9.
15. Størsrud S, Malmhen YI, Lenner RA. Gluten contamination in oats and products naturally free from gluten. *Eur Food Res Technol*. 2003; 217(6):481-5.
16. Huggett AC, Hischennhuber C. Food manufacturing initiatives to protect the allergic consumer. *Allergy*. 1998; 53(46 Suppl):89-92.
17. Catassi C, Fabiani E, Iacono G, D'Agate C, Francavilla R, Biagi F, et al. A prospective, double-blind, placebo-controlled trial to establish a safe gluten threshold for patients with celiac disease. *Am J Clin Nutr*. 2007; 85(1):160-6.
18. Hischenhuber C, Crevel R, Jarry B, Maki M, Moneret-Vautrin DA, Romano A, et al. Review article: safe amounts of gluten for patients with wheat allergy or coeliac disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2006; 23(5):559-75.
19. Gibert A, Espadaler M, Angel Canela M, Sanchez A, Vaque C, Rafecas M. Consumption of gluten-free products: should the threshold value for trace amounts of gluten be at 20, 100 or 200 p.p.m.? *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2006; 18(11):1187-95.
20. Collin P, Thorell L, Kaukinen K, Maki M. The safe for gluten contamination in gluten-free products. Can trace amounts be accepted in the treatment of coeliac disease? *Aliment Pharmacol Ther*. 2004; 19(12):1277-83.
21. *Codex Alimentarius Commission. Codex Standard for 'gluten-free food' (Codex Stan 118-1981, Amended 1983)*. Rome, Italy: FAO/WHO, p 1983.21.
22. *Codex Alimentarius Draft revised standard for gluten free foods. Codex Alimentarius ALINORN 04/27/26, 2004 Appendix III, Rome, pp., 43-45.*
23. Report of the 28<sup>th</sup> session of the *Codex Committee on Nutrition and for Special Dietary Uses*, 30 October-3 November, Chiang Mai, Thailand ALINORM 07/30/26-Rev APP. IV.
24. BRASIL. Lei n. 10.674 de 16 de maio de 2003. Obriga a que todos os produtos alimentícios comercializados informem sobre a presença de glúten, como medida preventiva e de controle da doença celíaca. *Diário Oficial da União, Brasília, (2003 maio); Séc.1. Disponível em:< http://www.anvisa.gov.br.> Acesso em: 22 de junho 2007.*
25. Hernando A, Valdes I, Mendez E. New strategy for the determination of gliadins in maize- or rice-based foods matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry: fractionation of gliadins from maize or rice prolamins by acidic treatment. *J Mass Spectrom*. 2003; 38(8): 862-71.
26. DuPont FM, Chan R, Lopez R, Vensel WH. Sequential extraction and quantitative recovery of gliadins, glutenins, and other proteins from small samples of wheat flour. *J Agric Food Chem*. 2005; 53(5):1575-84.
27. Henterich N, Osman AA, Méndez E, Mothes T. Assay of gliadin by real-time immunopolymerase chain reaction. *Nahrung*. 2003; 7(5):345-8.
28. Allmann M, Candrian U, Hofelein C, Luthy J. Polymerase chain reaction (PCR): a possible alternative to immunochemical methods assuring safety and quality of food. Detection of wheat contamination in non-wheat food products. *Z Lebensm Unters Forsch*. 1993; 196(3):248-51.
29. Skerritt JH, Hill AS. Enzyme immunoassay for determination of gluten in foods: collaborative study. *J Assoc Off Anal Chem*. 1991; 74(2):257-64.
30. Valdés I, Garcia E, Llorente M, Mendez E. Innovative approach to low-level gluten determination in foods using a novel sandwich enzyme-linked immunosorbent assay protocol. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2003; 15(7):465-74.
31. Freedman AR, Galfre G, Gal E, Ellis HJ, Ciclitira PJ. Western immunoblotting of cereal proteins with monoclonal antibodies to wheat gliadin to investigate coeliac disease. *Int Arch Allergy Appl Immunol*. 1988; 85(3):346-50.
32. Miletic ID, Miletic VD, Miller Sattley EA, Schiffman SS. Identification of gliadin presence in pharmaceutical products. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1994; 19(1):27-33.
33. Eckert van R, Berghofer E, Ciclitira PJ, Chirido F, Denery-Papini S, Ellis HJ, et al. Towards a new gliadin

- reference material- isolation and characterization. *J Cereal Sci.* 2006; 43(3):331-41.
34. Klein C, Yazgan S, Franchini F. The certified reference material for gliadin from European wheat: status quo. In Stern M, ed. *Proceedings of the 18<sup>th</sup> Meeting Group on Prolamin Analysis and Toxicity*, October 2-5, 2003, Stockholm, Sweden. Zwickau: Verlag Wissenschaftliche Scripten 2004: 125-7.
35. Garcia E, Llorente M, Hernando A, Kieffer R, Wieser H, Mendez E. Development of a general procedure for complete extraction of gliadins for heat processed and unheated foods. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2005; 17(5):529-39.
36. Friss U. Enzyme-linked immunosorbent assay for quantification of cereal proteins toxic in coeliac disease. *Clin Chim Acta.* 1988; 178(3):261-70.
37. Troncone R, Vitale M, Donatiello A, Farris E, Rossi G, Auricchio S. A sandwich enzyme immunoassay for wheat gliadin. *J Immunol Methods* 1986; 92(1):21-3.
38. Freedman AR, Galfre G, Gal E, Ellis HJ, Ciclitira PJ. Monoclonal antibody ELISA to quantitate wheat gliadin contamination of gluten-free foods. *J Immunol Methods.* 1987; 98(1):123-7.
39. Chirido FG, Amon MC, Fossati CA. Optimization of a competitive ELISA with polyclonal antibodies for quantification of prolamins in foods. *Food Agric Immunol.* 1995; 7(4):333-43.
40. Denery-Papini S, Nicolas Y, Popineau Y. Efficiency and limitations of immunochemical assay for the testing of gluten-free foods. *J Cereal Sci.* 1999; 30(2): 121-31.
41. Rumbo M, Chirido FG, Fossati CA, Amon MC. Influence of thermal treatment of food on the immunochemical quantification of gliadin. *Food Agric Immunol.* 1996; 8(3):195-203.
42. Wieser H. Quantitative determination of gliadin subgroups from different wheat cultivars. *J Cereal Sci.* 1994a: 19(2):149-55.
43. Osman AA, Uhlig HH, Valdes I, Amin M, Mendez E, Mothes T. A monoclonal antibody that recognizes a potential coeliac-toxic repetitive pentapeptide epitope in gliadins. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2001; 13(10):1189-93.
44. Méndez E, Vela C, Immer U, Janssen FW. Report of a collaborative trial to investigate the performance of the R5 enzyme linked immunoassay to determine gliadin in gluten-free food. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2005; 17(10):1053-63.
45. Iametti S, Bonomi F, Ferranti P, Picarielo G, Gabrovská D. Characterization of gliadin content in beer by using different approaches In; Stern M, ed.. *Proceedings of the 19th Meeting of the Working on Prolamin Analysis and Toxicity*, September 30-October 3, 2004, Prague, Czech Republic. Zwickau: Verlag Wissenschaftli Scripten 2005: Verlag Wissenschaftliche Scripte 2005; 73-8.

# Ácido fólico e fortificação de alimentos

## Folic acid and food enrichment

RIALA6/1112

Janete ALABURDA\*, Luzia SHUNDO

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

Recebido: 01/06/2007 – Aceito para publicação: 20/07/2007

### RESUMO

Folato é o termo genérico utilizado para os compostos que apresentam atividade vitamínica similar a do ácido pteroilglutâmico e é usado para descrever as formas da vitamina que ocorrem naturalmente nos alimentos, enquanto que o termo ácido fólico representa a forma sintética encontrada em suplemento medicamentoso e em alimento enriquecido. O folato está diretamente relacionado com a prevenção de defeitos do tubo neural, além da prevenção de outras doenças como problemas cardiovasculares, doença de Alzheimer, alguns tipos de cânceres, entre outras. No Brasil, o Ministério da Saúde determinou que a partir de junho de 2004, todas as farinhas de trigo e de milho fabricadas no país ou importadas devem ser enriquecidas com ferro e ácido fólico. A presente revisão faz uma abordagem geral sobre o ácido fólico e folatos, em que é feita a discussão sobre as características físico-químicas, biodisponibilidade, funções bioquímicas, fontes, uso na fortificação de alimentos e metodologia analítica para sua quantificação em alimentos.

**Palavras-chave.** ácido fólico, folatos, vitaminas, alimentos fortificados.

### ABSTRACT

Folates are the generic term used to designate the class of compounds having a chemical structure and nutritional activity similar to that of folic acid (pteroyl-L-glutamic acid), while folic acid is a synthetic fully oxidized folic acid (FA) form added into foodstuffs and pharmaceutical preparations. Folate deficiency is a well-known risk factor for causing neural tube disorders, cardiovascular diseases, Alzheimer disease, some types of cancer, among others diseases. In Brazil, since June 2004 the Agency for Public Health Surveillance (ANVISA) has established the mandatory enrichment of wheat and corn flours with FA and iron. The present review describes some general approaches on folic acid and folates, including physical-chemical characteristics, bioavailability, biochemistry functions, sources, food fortification, and analytical methodology for performing their quantification in food.

**Key words.** folic acid, folates, vitamins, enriched food.

## INTRODUÇÃO

A nutrição inadequada é um problema mundial tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento, com sérias implicações econômicas e à saúde. A fortificação contínua tem sido uma das principais estratégias empregadas para minimizar este problema, desde que é uma maneira eficaz para corrigir as deficiências de nutrientes essenciais de uma população, devido a sua abrangência, biodisponibilidade e baixo custo<sup>1</sup>.

A falta de vitaminas pode causar sérias doenças aos seres humanos, apesar de que somente quantidades reduzidas são necessárias para garantir uma boa saúde. A principal fonte de vitaminas para o ser humano são os alimentos.

Nos últimos anos os folatos, uma vitamina do complexo B denominada vitamina B<sub>9</sub>, tem despertado um grande interesse devido a sua ligação na prevenção dos defeitos do tubo neural e possível prevenção de doenças cardiovasculares, alguns tipos de cânceres e problemas neuro-psiquiátricos, tais como demência e depressão<sup>2</sup>.

O Ministério da Saúde determinou que a partir de junho de 2004, todas as farinhas de trigo e de milho fabricadas no Brasil ou importadas devem ser enriquecidas com ferro e ácido fólico<sup>3</sup>.

### Ácido fólico e folatos

Os folatos são vitaminas hidrossolúveis naturais que contém a estrutura do ácido pteroilmonoglutâmico (ácido fólico), denominados vitamina B<sub>9</sub>. Eles exibem atividade vitamínica similares a do ácido fólico e existem na forma de poliglutamatos<sup>4</sup>. A história da descoberta dos folatos teve início em 1935, quando começou a ser descrita uma série de distúrbios decorrentes da deficiência nutricional de um composto pertencente à família do ácido pteroilglutâmico, cujo protótipo do grupo era o ácido fólico<sup>5</sup>.

Este ácido recebeu este nome em 1941, quando foi isolado a partir das folhas do espinafre. Esta vitamina foi sintetizada na forma cristalina em 1943 por Bob Stokstad e em 1945 por Angier<sup>6</sup>, sendo possível demonstrar que ele é formado por um anel pteridínico e pelos ácidos para-aminobenzóico e glutâmico (Figura 1). Após sua síntese, pode-se verificar que os folatos diferem do ácido fólico em três aspectos: (i) possuem resíduos adicionais de unidades de glutamatos (poliglutamatos), (ii) sofrem redução para di- ou tetra-hidroderivados; e (iii) podem conter unidades carbônicas adicionais, tais como, radicais metil, formil, metileno ligados aos átomos de nitrogênio.

O termo ácido fólico é usado para caracterizar a forma totalmente oxidada não presente naturalmente nos alimentos, enquanto que o termo folatos representa o grupo de compostos que possuem a mesma atividade vitamínica e inclui os folatos naturais e o ácido fólico, o qual é a forma sintética utilizada na fortificação dos alimentos.

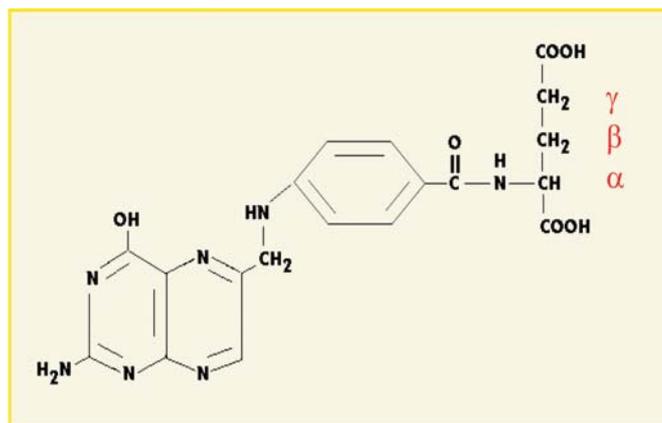


Figura 1. Fórmula estrutural do ácido fólico.

### Características químicas e físicas

O ácido fólico (2-amino-4-hidroxi-6-metilenoaminobenzol-L-glutâmico), também denominado ácido pteroilglutâmico ou vitamina B<sub>9</sub>, é uma substância cristalina amarela de peso molecular 441,40 g/mol e fórmula molecular C<sub>19</sub>H<sub>19</sub>N<sub>7</sub>O<sub>6</sub>, sendo composto de três subunidades: pteridina, ácido p-aminobenzóico e ácido glutâmico. Os folatos apresentam estruturas similares à do ácido fólico, porém ocorrem naturalmente nos alimentos na forma reduzida como derivados de poliglutamatos, contendo de 2 a 7 unidades de ácido glutâmico. Além de apresentarem estrutura similar a do ácido fólico, eles também apresentam atividade vitamínica semelhante à deste ácido.

O ácido fólico puro é inodoro e insípido. É levemente solúvel em água em pH neutro (aproximadamente 1% em água fervendo), porém bastante solúvel em solução aquosa ácida e alcalina e insolúvel em solventes orgânicos, tais como etanol, acetona e éter<sup>7</sup>. O ácido fólico não apresenta ponto de fusão, decompondo-se a 250°C, possui rotação quiral [α]<sub>D</sub> igual a +23° em solução 0,5 % em hidróxido de sódio 0,1 M. As soluções aquosas de ácido fólico são sensíveis ao calor e se decompõem na presença de luz.

O ácido fólico apresenta mais estabilidade em meio alcalino do que em meio ácido, sendo que as soluções padrão são preferencialmente preparadas em condições alcalinas. Ainda, a sua estabilidade depende do tipo de tampão em que ele é armazenado, sendo que a presença de fosfato no tampão pode diminuir a estabilidade desta vitamina<sup>7</sup>. Salienta-se que tampão fosfato é utilizado na maioria das metodologias para análise deste ácido em alimentos, nas etapas de extração como de separação e quantificação<sup>8,9,10</sup>.

O ácido fólico absorve radiação eletromagnética na região do ultravioleta porém não apresenta fluorescência, enquanto que os folatos absorvem na região do ultravioleta e apresentam fluorescência. Este ácido possui vários grupos ionizáveis com constantes de dissociação ácida variando dentro de uma ampla faixa de pH, de forma que as medidas de absorvância dependem drasticamente do pH do meio<sup>11</sup>. Os

comprimentos de onda ( $\lambda$ ) de absorção na região eletromagnética do ultravioleta e as respectivas absorptividades em solução tampão fosfato 0,10 M a pH 7 estão apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Valores de absorbância da radiação eletromagnética na região do ultravioleta de alguns folatos: comprimentos de onda máximos e absorptividades.

Composto	$\lambda$ (nm)	Absortividade ( $E\%_{1cm}$ )	
		( $\mu\text{mol.L}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ )	Referência
Ácido fólico	287	27,6	15
	346	7,2	16
5-metiltetraidrofolato	290	31,7	15
	290	30,8	17
5-formiltetraidrofolato	285	37,2	15
10-formilfolato	297	29,1	15
Tetraidrofolato	297	29,1	15

### Biodisponibilidade

A biodisponibilidade se refere à porção do folato ingerido que é absorvido e torna-se disponível para os processos metabólicos e para o armazenamento pelo organismo. Estima-se que a biodisponibilidade dos folatos naturais é incompleta em relação à vitamina na sua forma sintética, o ácido fólico. Devido a esta diferença de biodisponibilidade, que pode acarretar erros entre 10-98% em estudos epidemiológicos, recentemente foi introduzido o termo equivalente de folatos na dieta, que é definido como a quantidade de folato natural no alimento mais 1,7 vezes a quantidade de ácido fólico na dieta. Estima-se que a biodisponibilidade do ácido fólico adicionado aos alimentos é maior do que o folato natural dos alimentos por um fator de 1,7<sup>12</sup>. Este fator é baseado num estudo realizado com mulheres não gestantes, o qual avaliou que a biodisponibilidade de folatos em alimentos é 50% menor ou igual que a do ácido fólico<sup>13</sup> e em outra pesquisa que demonstrou que o ácido fólico adicionado nos alimentos apresenta cerca de 85% da biodisponibilidade do composto na forma pura<sup>14</sup>.

A biodisponibilidade dos folatos naturais é dependente de vários fatores, tais como: desconjugação intestinal dos poliglutamatos, matriz alimentícia, instabilidade de certos folatos lábeis e presença de certos componentes no alimento que pode aumentar a estabilidade do folato natural durante a digestão.

Os folatos são predominantemente poliglutamatos, os quais necessitam ser hidrolisados para monoglutamatos para serem absorvidos no intestino delgado. Este processo ocorre num pH ótimo entre 6-7, portanto alimentos que alteram o pH intestinal podem acarretar uma incompleta desconjugação do poliglutamato, e conseqüentemente, uma diminuição na sua biodisponibilidade<sup>12</sup>.

O equivalente de folato dietético (EFD) foi definido para ajustar as diferenças de biodisponibilidade de ácido fólico que é considerado mais disponível do que os folatos dos alimentos. O  $\mu\text{g}$  de EFD é estabelecido como:  $1\mu\text{g EFD} = 1\mu\text{g de folato}$

no alimento =  $0,6\mu\text{g}$  de ácido fólico no alimento. Portanto,  $\mu\text{g EFD} = \mu\text{g folato no alimento} + 1,7 \times \mu\text{g ácido fólico}$ <sup>18</sup>. Para se calcular o equivalente de folato dietético presente no alimento, o método analítico utilizado deve ser capaz de diferenciar o ácido fólico dos folatos naturais presentes.

### Funções

Os folatos atuam como coenzimas mediando a transferência de unidades de carbono, podendo agir como aceptores ou doadores de unidades de carbono numa variedade de reações críticas para o metabolismo de ácidos nucléicos e aminoácidos.

Eles exercem um papel vital no metabolismo do DNA através de duas rotas diferentes: (i) síntese de DNA a partir de seus precursores e (ii) síntese de metionina, a qual é necessária para a síntese de S-adenosilmetionina (SAM). O SAM é um doador de grupo metila (unidade de carbono) usada em muitas reações biológicas de metilação, incluindo um número de sítios do DNA e RNA<sup>19,20</sup>. A metilação do DNA pode ser importante na prevenção de câncer.

As coenzimas também são importantes para o metabolismo de muitos aminoácidos essenciais. Elas participam, juntamente com uma enzima dependente de vitamina B<sub>12</sub>, da síntese de metionina a partir de homocisteína. Desta forma uma deficiência de folato pode causar uma diminuição na síntese de metionina e uma elevação nos teores de homocisteína, os quais podem ser um fator de risco para doenças cardiovasculares<sup>20</sup>, bem como, outras doenças crônicas<sup>21</sup>.

O folato está diretamente relacionado com a prevenção de defeitos do fechamento do tubo neural (DFTN), além da prevenção de outras doenças como problemas cardiovasculares, doença de Alzheimer, alguns tipos de cânceres, entre outras<sup>22,23</sup>. Vários estudos têm demonstrado que esta vitamina pode ajudar na diminuição dos teores de homocisteína no sangue, reduzindo ataques de coração e doença de Stroke. Em contrapartida, o excesso de ácido fólico pode mascarar os sintomas da deficiência da vitamina B<sub>12</sub>.

A deficiência de folatos pode ser causada por diferentes situações, como uma dieta pobre de folatos ou uma absorção diminuída, como por exemplo, por alcoolismo. Certas condições como gravidez ou câncer resultam em taxas maiores de divisão e metabolismo celular, implicando um aumento na demanda corpórea de folatos. Alguns medicamentos também podem contribuir para esta deficiência, como trimetoprima, metotrexato, anticonvulsivantes e anticoncepcionais. Uma dieta deficiente de folatos pode ocasionar após quatro meses o desenvolvimento de anemia megaloblástica, além de severa deficiência de potássio<sup>6</sup>.

### Fontes de folatos

Os alimentos com maior conteúdo de folatos são as verduras e hortaliças, os cereais e as frutas, cujos valores de folatos variam entre 20 a 160 $\mu\text{g}/100\text{g}$ . Os alimentos de origem animal, de forma geral, apresentam baixos teores desta

vitamina, com exceção de fígado que apresenta altas concentrações (700 a 1400µg/100g)<sup>24</sup>. Os valores tabelados para esta vitamina apresentam uma variabilidade bastante grande, que está relacionada com o método analítico utilizado e com a baixa estabilidade dos folatos naturais.

Dependendo da dieta adotada pela população, pode-se obter uma ingestão adequada de folatos, como por exemplo na Espanha, onde os teores de ingestão desta vitamina são uns dos maiores entre os países da Europa<sup>24</sup>. Salienta-se que além da composição da dieta, outro fator importante é o preparo dos alimentos, uma vez que estes compostos são hidrossolúveis e termolábeis.

As recomendações de teores de ingestão diárias estão baseadas na prevenção da anemia megaloblástica e de DFTN, doenças cardiovasculares, entre outras. Em 2000, o Instituto de Medicina dos Estados Unidos estabeleceu a ingestão diária recomendada de ácido fólico de 0,4mg/dia para as mulheres e 0,6mg/dia para as gestantes<sup>25</sup>, valores similares publicados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária no Brasil<sup>26</sup>. Estes requerimentos de folatos são difíceis de serem alcançados com uma dieta normal equilibrada, pois esta fornece cerca de 0,25mg/dia tomando como base um valor energético total de 2200 Kcal diárias<sup>27,28</sup>.

### **Fortificação de alimentos**

O enriquecimento dos alimentos tem sido uma estratégia para aumentar os níveis de folatos, tendo a vantagem de alcançar uma ampla parte da população, sem a necessidade de mudanças nos hábitos alimentares<sup>29</sup>. Alguns estudos têm demonstrado que o enriquecimento dos alimentos pode ser a forma mais eficaz devido ao seu custo, menos que 0,1 % do custo da farinha<sup>30</sup>, quando comparado com mudanças nas dietas ou administração de suplementos<sup>31</sup>.

Atualmente, mais do que 2 bilhões de pessoas no mundo sofrem pela deficiência de micronutrientes. Nos Estados Unidos, 10 a 20 % da população consomem menos do que 50 % da ingestão diária recomendada de ácido fólico e vitaminas B<sub>6</sub>, C e E<sup>32</sup>. Desta forma, visando à prevenção de doenças causadas pela deficiência de folatos, principalmente defeitos do fechamento do tubo neural, muitos países tem estabelecido a obrigatoriedade da fortificação de certos alimentos com ácido fólico.

O ácido fólico sintético tem uma maior biodisponibilidade que os folatos naturais, os quais apresentam uma biodisponibilidade aproximada de 50%<sup>24</sup>. Esta menor biodisponibilidade dos folatos naturais está relacionada a vários fatores como: a estrutura química, o tamanho da cadeia poliglutâmica, matriz alimentícia, fatores genéticos da população, entre outros.

A escolha do produto alimentício para fortificação depende dos hábitos alimentares da população, dos aspectos logísticos do processo de fortificação e a relação química entre o ácido fólico e o produto a ser fortificado. O alimento mais frequentemente escolhido tem sido a farinha de trigo<sup>24</sup>.

A fortificação da farinha de trigo vem sendo realizada desde a década de 90 em El Salvador, Guatemala, Honduras, Costa Rica, Nicarágua e Panamá. Os teores de ácido fólico adotados para o enriquecimento variam entre os países, como por exemplo na Guatemala utiliza-se 0,35-0,45mg/Kg, no México 2,0mg/Kg e na Costa Rica 1,5mg/Kg<sup>24</sup>. Em 1998, a fortificação obrigatória de produtos de cereais em grãos teve início nos Estados Unidos com 1,40mg/Kg de produto<sup>29</sup> e no mesmo ano no Canadá com teores mínimos de 1,5mg/Kg de farinha de trigo<sup>33</sup>, enquanto que no Chile começou em 2002 utilizando-se 2,20mg/Kg de farinha de trigo.

No Brasil a fortificação tornou-se obrigatória a partir de junho de 2004 com a publicação da RDC n. 344, que determinou que as farinhas de trigo e de milho deveriam conter 150µg de ácido fólico para cada 100g de farinha<sup>9</sup>. Na Europa, apesar de reconhecerem os benefícios e a importância dos folatos para a saúde humana, a fortificação não é obrigatória, e em alguns países somente voluntária.

Efeitos adversos de altas doses de ácido fólico podem ocorrer se for ingerida uma quantidade superior a 1mg folato por dia para adultos e de 300 a 800µg/dia para crianças. Estas altas concentrações podem mascarar a detecção da deficiência de vitamina B<sub>12</sub><sup>2</sup>. Desta forma, alguns autores sugerem a fortificação conjunta de ácido fólico e vitamina B<sub>12</sub>.

Depois do início da fortificação obrigatória das farinhas nos Estados Unidos, os níveis médios de folato no soro sanguíneo em mulheres não grávidas mas em idade reprodutível mais do que dobraram. A fortificação tem sido responsável pela redução de 30% de defeitos do tubo neural. No Canadá esta redução foi de 50% e no Chile cerca de 70%<sup>30</sup>, sendo cerca de 44% no México<sup>34</sup>. Resultados similares foram observados para o efeito protetor do ácido fólico em alguns países (Estados Unidos, Canadá, Chile e Austrália), verificando-se percentuais de redução da prevalência de defeitos do tubo neural na faixa de 16 a 78%<sup>27</sup>.

### **Metodologia analítica**

Os métodos para análise de ácido fólico podem ser agrupados em métodos biológicos, químicos, bio-específicos (imunoenzimático e radioimunoensaio), microbiológicos e cromatográficos, sendo que os dois últimos são os mais utilizados<sup>7</sup>. O método reconhecido oficialmente para análise de folatos é o ensaio microbiológico que se baseia na relação quantitativa entre o conteúdo de folato e o crescimento do microrganismo<sup>35</sup>.

Os procedimentos bio-específicos podem apresentar algumas vantagens sobre o ensaio microbiológico e cromatográfico, porém são pouco utilizados. Eles são mais rápidos, de baixo custo, apresentam procedimento simples com pouco preparo de amostras. O radioimunoensaio é adequado para a análise de material biológico, porém apresenta restrita aplicação para alimentos<sup>36</sup>.

### **Ensaio microbiológico**

O ensaio microbiológico baseia-se na medida de turbidez da solução<sup>37</sup>. O crescimento do microrganismo depende

da quantidade de folato presente na amostra, sendo que este crescimento é proporcional a turbidez do meio. Este ensaio requer equipamentos de baixo custo, determina a quantidade total de folatos e é muito sensível. Por outro lado, pode ocorrer reação cruzada, isto é, algumas substâncias presentes podem estimular ou inibir o crescimento do microrganismo, além de ser demorado e necessitar de pessoa experiente para o manuseio da amostra e do microrganismo, para garantir a qualidade e reprodutibilidade dos resultados analíticos<sup>7</sup>.

Os microrganismos usados são *Lactobacillus rhamnosus*, *Enterococcus hirae* e *Pediococcus acidilactici*. *Streptococcus faecalis* (*E. hirae*) (ATCC 8043) foi inicialmente o mais comum, porém como ele não responde para as formas metiladas, normalmente presentes nos alimentos, foi substituído pelo *L. rhamnosus* (*L. casei*) (ATCC 7469). O *Enterococcus hirae* é utilizado para quantificar somente a forma livre do ácido fólico, aplicando-se para a análise desta vitamina em alimentos fortificados sem pré-digestão enzimática<sup>38</sup>.

Para a análise de folatos totais nos alimentos, normalmente se emprega o ensaio microbiológico com *L. rhamnosus* (*L. casei*) (ATCC 7469) com diferentes processos de digestão enzimática<sup>16</sup>. A resposta de *L. rhamnosus* para folatos naturais diminui com o aumento da cadeia poliglutâmica<sup>39</sup>, sendo que ele responde igualmente de mono a triglutamatos. Atualmente o processo de digestão trienzimático, que consiste do tratamento seqüencial da matriz alimentícia com protease e  $\alpha$ -amilase antes da adição da conjugase, está sendo utilizado na etapa de extração<sup>40</sup>. A protease e a  $\alpha$ -amilase são utilizadas para digerir a matriz alimentícia e liberar os folatos, enquanto que a conjugase promove a hidrólise dos poliglutamatos para mono ou diglutamatos<sup>16</sup>.

A etapa de extração, como para as demais técnicas analíticas, é um dos pontos mais críticos para a exatidão e precisão dos resultados. Condições do pH do meio reacional, diluição das soluções, temperaturas de aquecimento para obtenção de condições assépticas para incubação, seqüência de adição das enzimas durante o processo de digestão, temperatura de incubação, entre outros, são fatores que podem influenciar significativamente os resultados obtidos. A combinação ideal das enzimas e condições reacionais pode variar dependendo da composição da matriz alimentícia<sup>41</sup>.

A introdução de microplacas ao invés dos tubos de ensaio para incubação e medida de absorbância em leitora de placas tem apresentado vantagens quando comparado com o procedimento convencional, como diminuição no uso de reagentes, redução do tempo analítico para pipetagem e leitura de turbidez e maior sensibilidade<sup>7</sup>.

### Método cromatográfico

O método cromatográfico, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) permite a separação dos diferentes isômeros de folatos e a quantificação individual de cada um. Este método pode ser altamente específico, confiável e requer menos tempo do que o ensaio microbiológico, porém

requer equipamento mais caro e apresenta menor sensibilidade. Utiliza-se a cromatografia em fase reversa com detectores de ultravioleta ou de massas, uma vez que o ácido fólico não apresenta fluorescência natural, e de fluorescência ou de massas para os folatos naturais<sup>42</sup>.

A maioria dos métodos utilizando CLAE que tem sido desenvolvido para a análise de folatos naturais, determinam os folatos na forma de monoglutamatos, porém não se tem um procedimento padronizado para a hidrólise dos poliglutamatos e as diferentes formas de preparo da conjugase diferem em origem, atividade, pH e produtos finais da hidrólise<sup>37</sup>. No caso do ácido fólico adicionado não é necessária a etapa de hidrólise, uma vez que ele já ocorre na forma de monoglutamato.

Vários métodos utilizando CLAE tem sido desenvolvidos para análise de ácido fólico e outros folatos em alimentos<sup>8,9,14,40,43-53</sup>.

A extração do ácido fólico a partir da matriz alimentícia é uma etapa bastante crítica para a garantia da qualidade dos resultados experimentais. A extração desta vitamina tem sido feita com solução tampão pH 8-9 seguida por digestão com  $\alpha$ -amilase<sup>8</sup>, ou inicialmente com solução de hidróxido de potássio, seguida de ácido tricloroacético e tampão fosfato pH 6,0<sup>47</sup>, ou solução tampão fosfato pH 6,0 e hidrólise com conjugase<sup>44,51</sup> ou ainda tampão fosfato pH 4,2 e digestão trienzimática<sup>52</sup>. Alguns métodos utilizam solução tampão Hepes/Ches e digestão enzimática, com adição de ascorbato e mercaptoetanol para aumentar a estabilidade dos folatos naturais<sup>9,14,45</sup>. Pietro et al.<sup>53</sup> utilizaram coluna de extração em fase sólida C18 para a etapa de extração de ácido fólico a partir de amostras de bebidas fortificadas.

Após a extração, pode-se fazer uma limpeza dos extratos utilizando extração em fase sólida, sendo que a coluna mais utilizada para esta finalidade é a coluna de extração em fase sólida fortemente aniônica (SAX)<sup>8,22,44</sup>. Alguns autores utilizam colunas de imunoafinidade<sup>9,14,45,48</sup>.

A separação do ácido fólico geralmente é realizada em fase reversa utilizando coluna C18 e eluição isocrática com pareamento de íons<sup>8</sup> ou gradiente usando como fase móvel uma mistura de acetonitrila e ácido acético<sup>40,47</sup>, ou acetonitrila e tampão fosfato<sup>9,14,22,44</sup>, ou metanol e acetato de amônio<sup>53</sup>, ou acetonitrila e tampão fosfato com pareamento de íons<sup>46</sup>. A fase móvel mais utilizada em eluição por gradiente é uma mistura de acetonitrila e tampão fosfato pH < 3. A detecção normalmente é feita na região eletromagnética do ultravioleta a 280<sup>8,52</sup> ou 290 nm<sup>9,22,44</sup>.

Alguns métodos utilizando detector de massas (CLAE-MS) têm sido descritos. Thomas et al.<sup>54</sup> desenvolveram um método para análise de ácido fólico em sucos cítricos e Pawlosky et al.<sup>49</sup> usaram esta técnica para a análise de cereais matinais fortificados com ácido fólico e de pães<sup>50</sup>. Apesar do uso desta técnica mais específica, os autores utilizam extração em fase sólida para limpeza dos extratos, antes da análise cromatográfica. Patring et al.<sup>38</sup> concluíram que a técnica CLAE-MS apresenta melhor sensibilidade e especificidade do que o detector de UV.

Embora a técnica de CLAE apresente alto potencial para análise de folatos em alimentos, verifica-se algumas limitações, como a rigorosa limpeza da amostra antes da análise. O emprego de colunas de afinidade ou de troca iônica parece promissor, mas ainda deve ser testado e avaliado por comparação com o método microbiológico<sup>7</sup>.

### Ensaio de proficiência

Muitos pesquisadores têm reportado boa correlação entre os resultados por CLAE e ensaio microbiológico, em alguns casos foi observado que os valores obtidos por CLAE são inferiores (cerca de 50%) aos do ensaio microbiológico<sup>55</sup>. Estes resultados foram similares aos observados num ensaio interlaboratorial que observou que os resultados provenientes do CLAE são cerca de 30 a 40% menores que do ensaio microbiológico<sup>56</sup>.

Num ensaio interlaboratorial usando materiais de referência de cereal matinal, peixe em pó e farinha de soja verificou-se que os coeficientes de variação para 26 laboratórios variaram de 24 a 35%. Os autores concluem que esta alta variação está relacionada a variedade de métodos utilizados, como ensaio microbiológico, CLAE-UV, CLAE-MS, bem como, diferentes técnicas de extração<sup>56</sup>.

### CONCLUSÕES

O ácido fólico (ácido pteroilglutâmico) é uma vitamina do complexo B, denominado vitamina B<sub>9</sub>. Muitos estudos têm demonstrado que o uso pré-conceptivo desta vitamina reduz os DFTN, como a espinha bífida e a anencefalia. Recomenda-se uma suplementação diária de ácido fólico de 400µg para mulheres em idade fértil. A fortificação de alimentos com ácido fólico tem sido uma maneira segura e eficiente para se alcançar estes teores desta vitamina pela alimentação.

A oficialização de um método seguro, rápido, preciso e validado é fundamental para o monitoramento de alimentos fortificados, visando a obtenção dos benefícios para a saúde da população.

### REFERÊNCIAS

1. Scrimshaw NS. La fortificación de alimentos: una estrategia nutricional indispensable. *An Venez Nutr* 2005, 18(1): 64-8.
2. Pfeiffer CM, Caudill SP, Gunter EW, Osterloh J, Sampson EJ. Biochemical indicators of B vitamin status in the US population after folic acid fortification: results from the National Health and Nutrition examination Survey 1999-2000. *Am J Clin Nutr* 2005, 82:442-50.
3. Brasil. Resolução nº 344, de 13 de dezembro de 2002. Aprova o regulamento técnico para a fortificação das farinhas de trigo e das farinhas de milho com ferro e ácido fólico, constante no anexo desta resolução. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 18 de dezembro de 2002.
4. Jastrebova J, Witthöft C, Grahn A, Svensson U, Jägerstad M. HPLC determination of folates in raw and processed beetroots. *Food Chemistry* 2003, 80(4): 579-88.
5. Lima, JA. Folatos em vegetais – influência do tipo de cultivo e do processamento. [Tese de Doutorado]. Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas/SP, 2005. p 84
6. Hoffbrand AV, Weir DG. The history of folic acid. *Br J Haematol* 2001, 113(3): 579-89.
7. Arcot J, Shrestha A. Folate: methods of analysis. *Trends in Food Science & Technology* 2005, 16: 253-66.
8. Osseyi ES, Wehling RL, Albrecht JA. Liquid chromatographic method for determining added folic acid in fortified cereal products. *J Chromatogr A* 1998, 826: 235-40.
9. Gujska E, Kuncewicz A. Determination of folate in some cereals and commercial cereal-grain products consumed in Poland using trienzyme extraction and high-performance liquid chromatography methods. *Eur Food Res Technol* 2005, 221: 208-13.
10. Johansson M, Jastrebova J, Grahn A, Jägerstad M. Separation of dietary folates by gradient reversed-phase HPLC: comparison of alternative and conventional silica-based stationary phases. *Chromatographia* 2005, 62(1/2): 33-40.
11. Poe M. Acidic dissociation constants of folic acid, dihydrofolic acid, and methotrexate. *J of Biol Chem* 1977, 252(11): 3724-8.
12. McNulty H, Pentieva K. Folate bioavailability. *Proceedings of the Nutrition Society* 2004, 63(4): 529-36.
13. Saulberlich HE, Kretsch MJ, Skala JH, Johnson HL, Taylor RC. Folate requirement and metabolism in nonpregnant women. *Am J Clin Nutr* 1987, 46: 1016-28.
14. Pfeiffer CM, Rogers LM, Bailey LB, Gregory JF. Absorption of folate from fortified cereal-grain products and of supplemental folate consumed with or without food determined by using a dual-label stable-isotope protocol. *Am J Clin Nutr* 1997, 66: 1388-97.
15. Finglas PM, Wigertz K, Vahteristo L, Witthöft C, Southon S, Froidmont-Görtz I. Standardisation of HPLC techniques for the determination of naturally-occurring folates in food. *Food Chem* 1999, 64: 245-55.
16. De Vries JW, Rader JL, Keagy PM, Hudson CA. Microbiological assay-tri-enzyme procedure for total folates in cereals and cereal foods: collaborative study. *J AOAC International* 2005, 88(1):5-15.
17. Rader JI, Weaver CM, Angyal G. Use of a microbiological assay with tri-enzyme extraction for measurement of pre-fortification levels of folates in enriched cereal-grain products. *Food Chem* 1998, 62(4): 451-65.

18. Chun J, Martin JA, Chen L, Lee J, Ye L, Eitenmiller RR. A differential assay of folic acid and total folate in foods containing enriched cereal-grain products to calculate  $\mu\text{g}$  dietary folate equivalents. *J Food Compos Anal* 2006, 19: 182-7.
19. Muskiet, FAJ. The importance of (early) folate status to primary and secondary coronary artery disease prevention. *Reprod Toxicol* 2005, 20: 403-10.
20. Neves LB, Macedo DM, Lopes AC. Homocisteína. *J Bras Patol Méd Lab* 2004, 40(5): 311-20.
21. Sachdev P. Homocisteína e transtornos psiquiátricos. *Rev Bras Psiquiatr* 2004, 26(1): 50-6.
22. Patring JDM, Jastrebova JA, Hjortmo SB, Andlid TA, Jägerstad IM. Development of a simplified method for the determination of folates in baker's yeast by HPLC with ultraviolet and fluorescence detection, *J Agric Food Chem* 2005, 53(7): 2406-11.
23. Lucock, M. Folic acid: nutritional biochemistry, molecular biology, and role in disease processes. *Mol. Genet. Metab* 2000, 71: 121-38.
24. Martinez ABO, Berruezo GR, Cava MJB, Gracia CM, Caston MJP. Estimacion de la ingesta y necesidades de enriquecimiento de folatos y ácido fólico em alimentos. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 2005, 55(1): 5-14.
25. Institute of Medicine. Dietary reference intakes for thiamin, riboflavin, niacin, vitamin B6, folate, vitamin B12, pantothenic acid, biotin and coline. Washington DC: National Academy Press; 2000.
26. Brasil, Agência Nacional de Vigilância Sanitária/ANVISA. RDC n. 269, de 22 de setembro de 2005. Aprova o regulamento técnico sobre a Ingestão Diária Recomendada (IDR) de proteína, vitaminas e minerais.
27. Santos LMP, Pereira MZ. Efeito da fortificação com ácido fólico na redução dos defeitos do tubo neural. *Cad Saúde Pública* 2007, 23(1): 17-24.
28. Buttriss, J. Strategies designed to increase awareness about folates and health, and to increase folate intake: A review. *Trends Food Sci Technol* 2005, 16: 246-52.
29. CDC, Centro para el Control y la Prevencion de Enfermedades. La prevencion de los defectos del tubo neural com ácido fólico. [http://www.cdc.gov/ncbddd/Folicacid/documents/NTDesp\\_OPS.pdf](http://www.cdc.gov/ncbddd/Folicacid/documents/NTDesp_OPS.pdf), consultado em 23/04/07.
30. Maberly GF, Stanley FJ. Mandatory fortification of flour with folic acid: an overdue public health opportunity. *J Australian* 2005, 183(7): 342-3.
31. Romano OS, Waitzman NJ, Scheffler RM, Pi RD. Folic acid fortification of grain: an economic analysis. *Am J Public Health* 1995, 85: 667-76.
32. Liberato SC, Pinheiro-Sant'ana HM. Fortification of industrialized foods with vitamins. *Rev Nutr* 2006, 19(2): 215-31.
33. Nathoo T, Holmes CP, Ostry A. An analysis of the development of Canadian food fortification policies: the case of vitamin B. *Health Promot Int* 2005, 20(4): 375-82.
34. Kondo A, Kamihira O, Gotoh M, Ozawa H, Lee TY, Lin ATL et al. Folic acid prevents neural tube defects: International comparison of awareness among obstetricians/gynecologists and urologists. *J Obstet Gynaecol Res* 2007, 33(1): 63-67.
35. Patring JDM, Jastrebova JA. Application of liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry for determination of dietary folates: Effects of buffer nature and mobile phase composition on sensitivity and selectivity. *J Chromatogr A* 2007, 1143: 72-82.
36. Arcot J, Shrestha AK, Gusanov U. Enzyme protein binding assay for determining folic acid in fortified cereal foods and stability of folic acid under different extraction conditions. *Food Control* 2002, 13: 245-252.
37. Crews H, Alink G, Andersen R, Braesco V, Holst B, Maiani G et al. A critical assessment of some biomarker approaches linked with dietary intake. *Br J Nutr* 2001, 86: S5-S35.
38. Deutsch, M.J. Vitamin and Other Nutrients: Microbiological Methods. In: Official Methods of Analysis of Association of Official Analytical Chemists. 16<sup>th</sup> edition, Maryland, 1997.
39. Goli DM, Vanderslice JT. Investigation of the conjugase treatment procedure in the microbiological assay of folate. *Food Chem* 1992, 43: 57-64.
40. Pandrangi S, LaBorde LF. Optimization of microbiological assay of folic acid and determination of folate content in spinach. *International Journal of Food Science and Technology* 2004, 39: 525-32.
41. Aiso K, Tamura T. Trienzyme treatment for food folate analysis: optimal pH and incubation time for  $\alpha$ -amylase and protease treatments. *J Nutr Sci Vitaminol* 1998, 44: 361-370.
42. Almeida-Muradian LB, Penteadó MVC. Vitamina A. In: Penteadó, MVC. (Ed) Vitaminas: aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos, Manole; 2003, cap 132, 487-524.
43. Day BP, Gregory III JF. Determination of folacin derivatives in selected foods by high-performance liquid chromatography. *J Agric Food Chem* 1981, 29: 374-7.
44. Vahteristo L, Ollilainen V, Koivistoinen PE, Varo P. Improvements in the analysis of reduced folate monoglutamates and folic acid in food by high-performance liquid chromatography. *J Agric Food Chem* 1996, 44: 477-82.
45. Konings EJM. A validated liquid chromatographic method for determining folates in vegetables, milk powder, liver, and flour. *J AOAC Int* 1999, 82(1): 119-127.

46. Breithaupt DE. Determination of folic acid by ion-pair RP-HPLC in vitamin-fortified fruit juices after solid-phase extraction. *Food Chem* 2001, 74: 521-5.
47. Catharino, RR; Godoy, HT. Otimização da determinação de ácido fólico em leites enriquecidos através da análise de superfície de resposta. *Cienc Tecnol Aliment* 2001, 21(3): 326-9.
48. Kariluoto MS, Vahteristo LT, Piironen VI. Applicability of microbiological assay and affinity chromatography purification followed by high-performance chromatography (HPLC) in studying folate in rye. *J Sci Food Agric* 2001, 81: 938-42.
49. Pawlosky RJ, Flanagan VP. A quantitative stable-isotope LC-MS method for the determination of folic acid in fortified foods. *J Agric Food Chem* 2001, 49: 1282-6.
50. Pawlosky RJ, Hertrampf E, Flanagan VP, Thomas PM. Mass spectral determinations of the folic acid content of fortified breads from Chile. *J Food Comp Anal* 2003, 16: 281-6.
51. Johansson M, Witthöff CM, Bruce A, Jägerstad M. Study of wheat breakfast rolls fortified with folic acid. *Eur J Nutr* 2002, 41: 279-86.
52. Johnston KE, Tamura T. Folate content in commercial white and whole wheat sandwich breads. *J Agric Food Chem* 2004, 52: 6338-40.
53. Pietro SP, Grande BC, Falcon SG, Gandara JS. Screening for folic acid content in vitamin-fortified beverages. *Food Control* 2006, 17: 900-4.
54. Thomas PM, Flanagan VP, Pawlosky RJ. Determination of 5-methyltetrahydrofolic acid and folic acid in citrus juices using stable isotope dilution-mass spectrometry. *J Agric Food Chem* 2003, 51: 1293-6.
55. Ginting E, Arcot J. High performance liquid chromatographic determination of naturally occurring folates during preparation. *J Agric Food Chem* 2004, 52: 7752-8.
56. Puwastien P, Pinprapai N, Judprasong K, Tamura T. International inter-laboratory analyses of food folate. *J Food Comp Anal* 2005, 18(5): 387-97.

# Matérias estranhas em erva-mate (*Ilex paraguariensis* St Hil) beneficiada no estado de Santa Catarina, Brasil

## Extraneous material in mate (*Ilex paraguariensis* St Hil) industrialized in Santa Catarina state, Brasil

RIALA6/1113

Rose Maria de Oliveira MENDES, Marinho Bastos QUADRI, Mara Gabriela Novy QUADRI\*

\*Endereço para correspondência: Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, CP 476, Campus Universitário, CEP 88040-900, Florianópolis, SC/Brasil, fone: 55-48.3721.9822, fax: 55-48.372, e-mail: mara@enq.ufsc.br

Recebido: 22/03/2007 – Aceito para publicação: 04/07/2007

### RESUMO

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.), um produto bastante consumido na região Sul do Brasil na forma de chimarrão, foi avaliada quanto à sua qualidade para o consumo. Foram feitas análises para detecção de matérias estranhas e presença de cristais de açúcar (microscopia), microbiológicas e atividade de água. Fragmentos de insetos, ácaros, e pêlos de roedor, classificados como sujidades leves, foram recuperados das amostras de erva-mate de duas regiões do estado de Santa Catarina: norte e oeste. As análises microscópicas também detectaram a presença de cristais de açúcar (sacarose) em duas amostras da região oeste, indicando fraude, pois este componente não estava declarado na lista de ingredientes da rotulagem. A análise de coliformes fecais estava de acordo com a legislação vigente e a atividade de água apresentou valores abaixo de 0,6.

**Palavras-chave.** chá, matérias estranhas, coliformes, fraude, umidade.

### ABSTRACT

The quality of Maté (*Ilex paraguariensis* St. Hil.), a highly consumed beverage in Southern region of Brazil as an especial infusion called “chimarrão”, was evaluated. Extraneous material occurrence, sugar crystals presence, microbiologic analysis, and water activity testing were performed. Insects and mites fragments, and rodents' hairs were recovered from samples from both North and West regions of Santa Catarina state. Microscopy analysis also detected sugar crystals (sucrose) in two samples from Western region, indicating fraud of the product as for sugar was not included in the ingredients list label. Fecal coliforms analysis was in accordance with Brazilian legislation (Anvisa standards), and the water activity measurements were lower than 0.6.

**Key words.** tea, extraneous material, coliforms, fraud, humidity.

## INTRODUÇÃO

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) é um produto bastante consumido na região Sul do Brasil na forma de chimarrão. Seu processo é antigo, e sistemas automatizados são empregados apenas em indústrias com grandes produções. Segundo Da Croce<sup>1</sup>, o processo de beneficiamento da erva-mate envolve três etapas:

a) branqueamento, ou sapeco, b) secagem e c) cancheamento, este último envolvendo as operações de malhação e moagem da erva. O sapeco retira a umidade superficial inativando as enzimas e evitando que as folhas se tornem escuras e de sabor desagradável. A secagem é realizada ao ar livre ou por secadores mecânicos, até as folhas ficarem quebradiças. Tanto o sapeco quanto à secagem reduzem a umidade, impedindo o desenvolvimento microbiano e auxiliando na conservação.

Quando o processo é mecanizado, o branqueamento é feito a seco. A temperatura média na entrada do sapecador é cerca de 400 °C, na saída é de 65 °C, e o tempo de residência oscila em torno de 8 minutos. A etapa de secagem, por outro lado, pode ser realizada em dois tipos de secadores mecânicos, rotativo e de esteira. O tempo de residência e a temperatura média da erva nos secadores dependem das características operacionais de cada um. No secador de esteira, o tempo médio é de 3 horas, e a temperatura varia entre 90 e 110 °C. No secador rotativo o tempo médio é de 30 minutos, sendo que na entrada do secador a temperatura média é de 350 °C e na saída de 110°C<sup>2</sup>.

No processo manual o branqueamento é realizado no carijo ou barbaquá. No carijo, processo primitivo, as chamas atuam diretamente sobre a erva, enquanto que no barbaquá, o material recebe o calor através de um canal subterrâneo, na entrada do qual é feita a fornalha. A elaboração da erva-mate pelo processo mecânico, é feita em local fechado, ao passo que o preparo manual faz-se ao ar livre. Portanto, em relação às condições higiênicas o preparo mecânico é bastante favorável, pois se processa ao abrigo do pó e sem contato das mãos ou dos pés dos trabalhadores. A rapidez do processo mecânico é, sem dúvida, uma das principais vantagens<sup>3</sup>.

No estado de Santa Catarina, na região norte localiza-se 61 % da produção de erva-mate e na região oeste 39 %. Grande parte da produção da região norte é de ervais nativos, enquanto que a produção da região oeste é de ervais cultivados<sup>4</sup>.

Durante o processamento de alimentos podem ocorrer contaminações que, em sua maioria, são de origem microbiológica, e que resultam em alterações de cor, sabor, textura e aparência, comprometendo não somente a vida de prateleira, mas também a saúde do consumidor. Tanto o sapeco quanto a secagem reduzem a atividade de água, impedindo o desenvolvimento microbiano e auxiliando na conservação.

Outros tipos de contaminação são as matérias estranhas, que normalmente são visíveis a olho nu na matéria-prima, mas que são camufladas em alimentos que foram triturados ou

moídos. Em tais produtos, o exame microscópico é especialmente importante, pois fornece informações a respeito das condições higiênicas, bem como dos ingredientes constantes da rotulagem, informando se a amostra é pura ou contém alguma mistura estranha, e ainda se esta mistura é uma impureza acidental (sujidade), ou adição intencional (fraude), visando um fim econômico.

As impurezas acidentais, ou matérias estranhas, são classificadas, de acordo com o tipo de sujidade, em pesadas e leves, sendo, que as últimas, devido a características lipofílicas, são separadas do produto por flutuação em uma mistura líquida de óleo-água. Exemplos de tais sujidades são fragmentos de insetos, insetos inteiros, pêlos de roedores, bárbulas de penas, entre outros. A fraude em alimentos com características particuladas, por outro lado, se caracteriza por adição de pulverulentos como açúcar, fubá, para aumentar o peso ou modificar o sabor do produto<sup>5</sup>.

Em condições ideais de temperatura e umidade, a presença de matéria estranha pode provocar o desenvolvimento de microorganismos que comprometem a qualidade do produto. Também podem promover o desenvolvimento de fungos que produzem micotoxinas, e que causam danos severos à saúde<sup>6</sup>.

São escassas na literatura pesquisas sobre a qualidade microscópica de erva mate destinada ao consumo de chimarrão. No presente trabalho, análises de matérias estranhas em amostras de erva-mate beneficiada no estado de Santa Catarina foram realizadas com o objetivo de comparar dois sistemas diferentes de cultivo. Foi avaliada ainda a qualidade microbiológica e atividade de água.

## MATERIAL E MÉTODOS

Oito amostras de diferentes marcas de erva-mate comercial, 4 da região oeste, e 4 da região norte do estado de Santa Catarina, foram adquiridas em supermercado de Chapecó, SC. Foram realizadas análises microbiológicas, microscópicas e de atividade de água. Foram avaliados coliformes totais e fecais, matérias estranhas (sujidades leves), fraude e atividade de água.

Os coliformes totais e fecais foram determinados em quintuplicatas conforme o Método de Análise Microbiológica para Alimentos do MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). As análises foram realizadas no laboratório de microbiologia, certificado pelo MAPA<sup>7</sup> e INMETRO<sup>8</sup>, do SENAI – Chapecó – SC.

As análises para detecção de material estranho foram realizadas em triplicatas no laboratório de microscopia do SENAI – Chapecó – SC segundo o método de flutuação para sujidades leves n° 981.18 descrito na AOAC<sup>9</sup>. As lâminas foram montadas com água glicerizada 2 % e as amostras foram observadas em microscópio modelo CX31RBSFA e estereoscópio modelo SZ-CTV - Olympus com câmara digital acoplada e software analisador de imagem (Image Pro Plus 5.0).

Para verificar a presença de cristais de açúcar (sacarose) procedeu-se à técnica de sedimentação em clorofórmio. As análises foram realizadas em duplicata. Em béquer contendo 100 mL de clorofórmio PA, foram lentamente adicionados 50 gramas de amostra. Após 10 minutos, com auxílio de uma espátula, o sobrenadante foi retirado cuidadosamente, e a parte líquida foi filtrada em funil de Büchner com papel filtro qualitativo. O papel foi seco em estufa e observado em microscópio e estereoscópio<sup>5</sup>.

A medida da atividade de água ( $A_w$ ) foi feita segundo o método de Landrock e Proctor<sup>10</sup>. Pesaram-se 3 g de amostra em copinhos plásticos, em triplicata. As amostras foram colocadas em dessecadores contendo soluções supersaturadas de sais e alojadas em ambiente a temperatura constante. Após 2 a 3 horas, as amostras foram novamente pesadas, e um gráfico da diferença de peso em função da umidade relativa dentro dos dessecadores foi obtido. Através de regressão linear da variação de peso em função da umidade relativa, foi calculada a atividade de água até peso constante

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As matérias estranhas, sujidades leves encontradas nos produtos analisados estão apresentadas na Tabela 1. A maior quantidade de sujidades relaciona-se a fragmentos de insetos e ácaros, que podem ser provenientes de infestações, antes e ou após o processamento, sugerindo falhas na adoção de Boas práticas de Fabricação.

Através da observação microscópica foram identificadas sujidades leves, conforme mostra a Figura 1. Segundo a

Resolução RDC nº 175/2003<sup>11</sup> da ANVISA, todas as amostras da região Norte estavam em desacordo com a legislação por apresentarem pelos de roedores, considerados matérias estranhas prejudiciais à saúde humana<sup>11</sup>.

Os pêlos de roedores encontrados representam um sério problema sanitário, pois os mesmos podem ser provenientes de quaisquer das etapas de produção. Podem ser provenientes do erval, onde as folhas colhidas são colocadas diretamente no chão ou mesmo por contaminação durante o transporte, processamento ou armazenamento na indústria. Sugere-se que, nos ervais, sejam utilizados panos de colheita ou ponchos com fios de ráfia, evitando, dessa maneira, a infestação da matéria prima por ácaros, pêlos de roedores e outras sujidades presentes no solo. Na época da poda, quando o volume de matéria prima a ser processado é muito grande, o controle de qualidade aliado às boas condições de higiene na indústria podem reduzir muito a contaminação<sup>12</sup>.

Os tipos de matérias estranhas encontradas no produto sugerem uma contaminação após as etapas de processamento de sapeco e secagem.

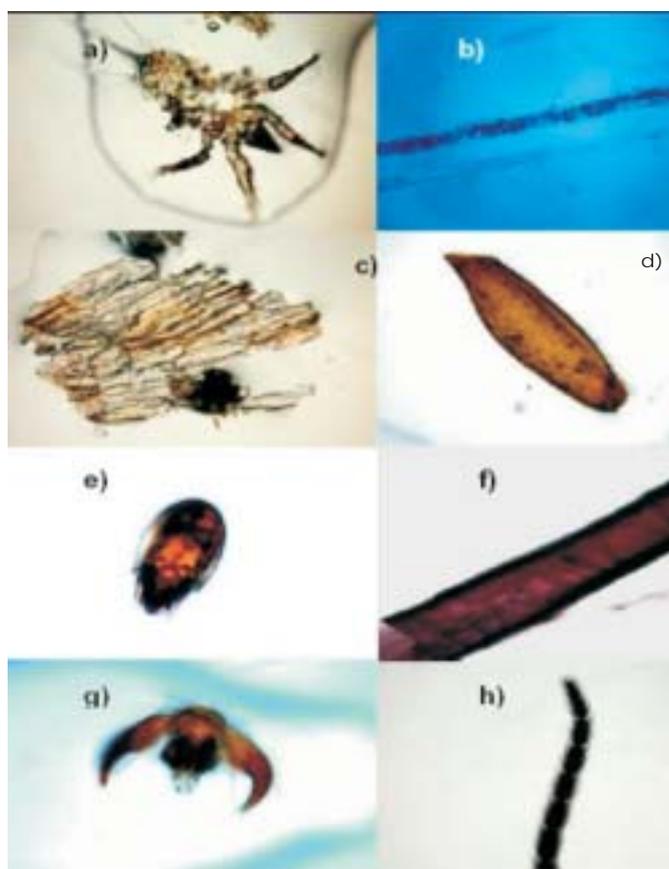
Embora, seja impossível obter uma produção de erva-mate livre de sujidades, os níveis de contaminação podem ser reduzidos com a implantação das Boas Práticas de Fabricação e de Armazenamento. O levantamento do nível higiênico torna-se importante para que os pontos críticos de contaminação por sujidades possam ser identificados a fim de fornecerem subsídios para a revisão do padrão legal, com o estabelecimento de limite máximo de tolerância para as matérias estranhas inócuas e inevitáveis, e que reflitam a realidade e qualidade do produto.

**Tabela 1.** Média de sujidades leves recuperadas nas amostras de erva-mate.

Amostras	Amostras região oeste				Amostras região norte			
	1	2	3	4	5	6	7	8
Fragmentos de insetos	39±19	22,7±3,2	31,7±3,2	31,6±4,9	31±8	60,6±12,0	57±9	35,7±5,9
Ácaros	66,3±20,4	50,3±4,5	29±5	2,7±0,6	22±5	32,6±9,9	101,3±28,4	24,3±9,0
Fragmento ácaro	12±2	0,66±0,58	4±2	8±2	25±5	13±4	15,6±2,3	7±3
Pêlo de roedor	-	-	-	-	1±0	0,66±0,58	0,33±0,57	1,33±0,58
Cabelo	0,33±0,57	-	-	-	-	0,33±0,57	-	-
Fragmento plástico	0,33±0,57	-	0,33±0,57	0,33±0,57	-	-	-	0,33±0,57

Melhorias das condições de higiene no transporte da erva-mate, beneficiamento e armazenamento, bem como a implantação de um controle integrado de pragas contribuí para melhorar a qualidade do produto. As Boas Práticas de Fabricação - BPFs, e o sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle - APPCC, foram estabelecidos na legislação através das Portarias do Ministério da Saúde nº 1428/93<sup>12</sup> e nº 326/97<sup>13</sup> da ANVISA, e das Portarias nº 40/98<sup>14</sup> e 43/98<sup>15</sup> do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. A implantação sistemática das BPFs, conforme estabelecida na legislação, garante ao consumidor maior segurança alimentar.

Através da análise microscópica também foi detectado a presença de cristais de açúcar (sacarose) nas amostras 1 e 2 provenientes da região oeste do estado de Santa Catarina. A presença de açúcar indica fraude, pois o mesmo não é declarado na lista de ingredientes da rotulagem. A utilização do açúcar diminui o sabor amargo da erva-mate e aumenta a aceitação do produto no mercado. Além disso, aumenta o peso do produto com massa que não provém da matéria prima declarada no rótulo.



Ácaro (aumento 20×); b) Pêlo de roedor (aumento 40×); c) Fragmento de asa de inseto (aumento 20×); d) Fragmento de perna inseto (aumento 20×); e) Ácaro eclodindo do ovo (aumento 20×); f) Cabelo (aumento 40×); g) Parte bucal de inseto (aumento 40×); h) Antena de inseto (aumento 20×).

**Figura 1.** Sujidades leves recuperadas em amostras de erva-mate, observadas ao microscópio, a partir de lâminas preparadas com água glicerinada a 2%.

As análises microbiológicas mostraram presença de coliformes a 35°C e a 45°C em todas as amostras analisadas. Os valores encontrados, tanto para as amostras da região Norte como para as amostras da região Oeste, variaram entre < 3,0 a 2,4 x 10<sup>2</sup> NMP/G para coliformes a 35°C e < 3,0 a 9,0 NMP/G para coliformes a 45°C. Todos os resultados encontrados para coliformes a 45 °C estavam em conformidade com a legislação para chá e produtos similares, obtidos por processamento térmico (torração e processos similares). Para estes, a legislação (RDC nº 12/2001<sup>16</sup> da ANVISA) prevê um limite de tolerância de 10<sup>3</sup> para coliformes a 45°C/g.

Alimentos desidratados geralmente apresentam A<sub>a</sub> abaixo de 0,60. Os valores de A<sub>a</sub> encontrados para as amostras confirmam os resultados microbiológicos obtidos, pois microorganismos dificilmente se desenvolvem sob baixa atividade de água. A Tabela 2 mostra os valores encontrados para A<sub>a</sub>. Estes resultados foram comparados com as normas estabelecidas pela legislação vigente, sendo que o valor do teor de umidade correspondente a estas atividades de água foi, em todos os casos, menor que 12 % em base úmida, conforme a legislação para produtos vegetais, RDC nº 272<sup>17</sup>, de 22 de setembro de 2005, da ANVISA.

**Tabela 2.** Valores da atividade de água das amostras de erva-mate analisadas.

Amostras	A <sub>a</sub>
1	0.259±0,041
2	0.477±0,043
3	0.403±0,011
4	0.572±0,035
5	0.340±0,036
6	0.315±0,071
7	0.520±0,042
8	0.329±0,057

## CONCLUSÃO

No presente trabalho foi observado que as amostras de erva-mate provenientes da região norte do estado de Santa Catarina estavam em desacordo com a legislação por apresentarem matéria estranha (pelos de roedores), a qual é prejudicial à saúde humana. Além disso, em algumas amostras foi observada a presença de fragmentos de plástico e, todas elas, apresentaram fragmentos de insetos, ácaros e cabelo, sugerindo falhas na adoção de Boas Práticas de Fabricação. Por outro lado, os baixos índices de contaminação microbiológica estão relacionados com os baixos valores da atividade de água (menores que 0,6). Também foi detectada a presença de cristais de açúcar em duas amostras da região oeste, indicando fraude no produto.

Medidas envolvendo Boas Práticas de Fabricação são necessárias para a garantia da qualidade do produto e do processo produtivo, de modo a contribuir para a segurança alimentar.

## REFERÊNCIAS

1. Da Croce DM. Cadeias produtivas de Santa Catarina: Erva-mate. Florianópolis (SC): Epagri, 2000.
2. Esmelindro MC, Toniazzo G, Waczuk A, Dariva C, Oliveira D. Caracterização Físico-Química da Erva-mate: Influência das Etapas do Processamento Industrial. *Ciênc Tecnol Aliment* 2002; 22: 199-204.
3. Mazuchowski JZ. Controle de Qualidade da Erva-mate com Vistas a Certificação. Em: Anais da II Reunião Técnica do Cone Sul e Cultura da Erva-mate. Curitiba, EMBRAPA-CNPQ, 1997: 99-120.
4. ICEPA. Instituto de Planejamento e Economia Agrícola de Santa Catarina. Síntese Anual da Agricultura de Santa Catarina: 2002-2003. Disponível em [http://www.agricultura.sc.gov.br/arquivos/sint\\_2003.pdf](http://www.agricultura.sc.gov.br/arquivos/sint_2003.pdf). Acesso em: 20/11/2005.
5. Barbieri MK, Athié I, de Paula DC, Cardozo GMBQ. Microscopia em alimentos: Identificação histológica e material estranho. 2ª ed. Campinas (SP): CIAL – ITAL, 2001.
6. Borges LR, Lazzari SMN, Lazzari FA. Análises de matérias estranhas em amostras de Erva-mate, *Ilex paraguariensis* St. Hil., provenientes de sistemas de cultivo nativo e adensado. *Rev Inst Adolfo Lutz* 2003; 62 (2): 77-82.
7. MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Sistema de Legislação Agrícola Federal – Sislegis 2006. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br>. Acesso em: 10 de junho de 2007.
8. INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial - 2006. Disponível em <http://www.inmetro.gov.br/>. Acesso em: 10 de junho de 2007.
9. AOAC - Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analyses. 7<sup>th</sup> Ed. Washington (DC). Ed. Cunniff P, 1997.
10. Landrock AH, Proctor BE. A new graphical interpolation method for obtaining humidity equilibria data, with Special reference to its role in food packing studies. *Food Technol* 1951; 5: 332-7.
11. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Aprova o regulamento técnico de avaliação de matérias macroscópicas e microscópicas prejudiciais à saúde humana em alimentos embalados. RDC nº 175, 08 de julho de 2003. Diário Oficial da União, Brasília (2004 jul 15). Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/e-legis>. Acesso em: 10 de junho de 2007.
12. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Aprova o regulamento técnico para inspeção sanitária de alimentos, as diretrizes para o estabelecimento de boas práticas de produção e de prestação de serviços na área de alimentos e o regulamento técnico para o estabelecimento de padrão de identidade e qualidade (PIQ's) para serviços e produtos na área de alimentos. Portaria nº1428 do Ministério da Saúde, 26 de novembro de 1993. Diário Oficial da União, Brasília (1993 dez 02). Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/e-legis>. Acesso em: 10 de junho de 2007.
13. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Aprova o regulamento técnico sobre condições higiênico-sanitárias e de boas práticas de fabricação para estabelecimentos produtores/industrializadores de alimentos. Portaria SVS/MS nº 326, 30 de julho de 1997. Diário Oficial da União, Brasília (1997 ago 01). Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/e-legis>. Acesso em: 10 de junho de 2007.
14. Brasil. Ministério da Saúde. Aprova o Regulamento que estabelece normas para Níveis de Dosagens Diárias de Vitaminas e Minerais em Medicamentos. Portaria SVS/MS nº 40, 13 de janeiro de 1998. Diário Oficial da União, Brasília (1998 jan 15). Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/e-legis>. Acesso em: 10 de junho de 2007.
15. Brasil. Ministério da Saúde. Dá prazo de adequação às Portarias 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40. Portaria nº 43, 14 de janeiro de 1998. Diário Oficial da União, Brasília (1995 jan 15). Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/e-legis>. Acesso em: 10 de junho de 2007.
16. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. RDC nº 12, 02 de janeiro de 2001. Diário Oficial da União, Brasília (2001 jan 10). Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/e-legis>. Acesso em: 10 de junho de 2007.
17. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Aprova o regulamento técnico para produtos de vegetais, produtos de frutas e cogumelos comestíveis. RDC nº 272, 22 setembro de 2005. Diário Oficial da União, Brasília (2005 set 23). Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/e-legis>. Acesso em: 10 de junho de 2007.

# Determinação de fenitrotiona em farinha de trigo

## Fenitrothion determination in wheat flour

RIALA6/1114

Thais V. Milanez\*, Viviane E. Nakano, Tereza A. Kussumi, Sonia B. Rocha e Heloísa H. B. Toledo

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

Recebido: 13/06/2007 – Aceito para publicação: 30/08/2007

### RESUMO

A fenitrotiona é um inseticida organofosforado de toxicidade moderada para mamíferos, usado para o controle de insetos em algumas culturas e em grãos armazenados. No Brasil, seu limite máximo de resíduo (LMR) em trigo estabelecido pela ANVISA/MS é 1,0mg/kg. Com a finalidade de verificar seus resíduos em farinha de trigo branca atendendo o Programa Paulista 2006, foram analisadas 62 amostras coletadas no período de abril a junho de 2006 pela Vigilância Sanitária do Estado de São Paulo, em vários pontos de comércio e padarias do estado. A fenitrotiona foi determinada por cromatografia em fase gasosa com detector fotométrico de chama (FPD). Foram realizados estudos de recuperação em dois níveis, 0,05 e 0,50mg/kg, cujos resultados variaram de 93% a 113% e 78% a 91%, respectivamente. O limite de detecção do método foi 0,02mg/kg e o de quantificação foi 0,05mg/kg. Os dados obtidos são inferiores ao LMR vigente para trigo de 1,0mg/kg e corroboram a importância do estabelecimento de LMR para produtos processados, neste caso, a farinha de trigo. Os LMR são a base para o cálculo do consumo diário dos pesticidas, proporcionando dados mais realistas para o cálculo da quantidade de resíduos de pesticidas realmente ingeridos por uma pessoa consumindo uma dieta que lhe é habitual (Ingestão Diária Aceitável).

**Palavras-chave.** fenitrotiona, farinha de trigo, cromatografia gasosa, Limite Máximo de Resíduo.

### ABSTRACT

Fenitrothion is an organophosphorus insecticide of moderate toxicity to mammals, which is used in agriculture to control insects on some cultures and on stored grains. ANVISA/ Brazilian Ministry of Health established the fenitrothion maximum limit residue (MLR) of 1.0mg/kg in wheat. The aim of this investigation was to verify this compound residues in white wheat flour to comply the São Paulo State Health Programme "Programa Paulista 2006". For this purpose a survey of fenitrothion residues was carried out in 62 flour samples from varied market sites and bakeries of São Paulo State, collected by Sanitary Surveillance Service from April to June 2006. Fenitrothion residues were determined by means of gas chromatography with flame photometric detection (GC-FPD). Recovery studies were performed at two different levels, 0.05 e 0.50mg/kg, and the mean recoveries on the established levels were between 93% - 113% and 78% - 91%, respectively. The limit of detection was estimated as 0.02mg/kg, and the limit of quantification was 0.05mg/kg. The data showed values of fenitrothion lower than the established MRL to wheat (1.0mg/kg), which corroborate the needs to establish MRL for processed products, such as wheat flour. MRLs are the basis for calculating the daily dietary consumption of pesticides. They also provide factual data for estimating the daily pesticide residue intake by a person that consumes its usual diet (Acceptable Daily Intake).

**Key words.** fenitrothion, wheat flour, gas chromatography, Maximum Residue Limit.

## INTRODUÇÃO

A fenitrotiona é um inseticida da classe dos organofosforados que tem sido usado na agricultura desde 1959<sup>1</sup>. Estudos em animais verificaram que este ativo é rapidamente absorvido por via oral e distribuído a vários tecidos do corpo, rapidamente metabolizado e excretado, não sendo retido no organismo por longo tempo. Incluído na Classe II<sup>1</sup>, tem toxicidade moderada apresentando valor de LD<sub>50</sub> oral para ratos e camundongos variando de 330 a 1416mg/kg peso corpóreo<sup>2</sup>. No Brasil, sua aplicação é permitida em culturas de algodão, cebola, crisântemo, maçã e soja, no controle de formigas, bem como em trigo armazenado<sup>2</sup>.

As principais áreas produtoras mundiais de trigo são China e a União Européia com mais de 100 milhões de toneladas, seguidos por EUA, Índia, Leste Europeu, Rússia e Canadá<sup>3</sup>. O Brasil produziu 4,9 milhões de toneladas nas safras de 2005-2006, o que é insuficiente para suprir o consumo interno. Somente no ano passado, o país importou 6,6 milhões de toneladas de trigo da Argentina, o que corresponde a 95% da importação nacional do produto<sup>4</sup>.

Com relação à farinha de trigo, segundo o IBGE<sup>5</sup>, o consumo per capita anual é de 5,08kg, sendo o quarto alimento mais consumido pela população brasileira e um dos principais ingredientes no preparo de diversos produtos alimentícios da população brasileira. Aproximadamente 54% da produção são destinados ao preparo de pão, 12% para massas, 11% para biscoitos, 10% para uso doméstico e outros 12% para outras aplicações.

Neste estudo, foram levantados os resíduos de fenitrotiona em amostras de farinha de trigo branca coletadas em vários pontos do comércio ou padarias do estado de São Paulo no período de abril a junho de 2006. A fenitrotiona tem sido avaliada sucessivamente desde 1969 por especialistas do JMPR (Joint FAO/WHO Meetings on Pesticide Residues), sendo o limite máximo de resíduo (LMR) de fenitrotiona em farinha de trigo recomendado na avaliação de 1988/1989 como 2mg/kg<sup>6</sup>. Esta recomendação tem sido mantida pelo Comitê do Codex Alimentarius e permanece até hoje<sup>6</sup>. No Brasil, segundo a Resolução RE n.º 165, de 29/08/2004 da Anvisa/Ministério da Saúde, o limite máximo de resíduo (LMR) estabelecido de fenitrotiona para trigo é 1,0mg/kg<sup>2</sup>. Para o produto processado, a Portaria n.º 03 da ANVISA/MS<sup>7</sup> estabelecia o limite máximo de resíduo (LMR) como “taxa igual ou inferior a que estiver fixada para o alimento fresco”. No entanto, esta Portaria foi revogada pela Resolução ANVISA/MS RDC n.º 216 de 15/12/2006<sup>8</sup>. Desta forma, atualmente a legislação brasileira não estabelece LMR para a farinha de trigo.

## MATERIAL E MÉTODO

### Material

Foram analisadas 62 amostras de farinha de trigo, sendo 25 pacotes de 1 kg, provenientes de vários pontos de

comércio destinadas ao uso doméstico e 37 amostradas em padarias. As amostras foram coletadas no período de abril a junho de 2006 pela Vigilância Sanitária do Estado de São Paulo atendendo o Programa Paulista 2006.

### Método

Baseando no método multi-resíduos<sup>9</sup>, foram pesadas 30g de farinha de trigo em frascos de 250mL com tampa de rosca. Foram adicionados 1mL de solução de clorpirifós metílico 3ng/mL (“surrougate”), e, a seguir, 30mL de acetato de etila. A extração foi efetuada em turrax por 30 segundos e subsequentemente foram adicionados 60mL de mistura diclorometano:hexano (1:1). A extração em turrax foi repetida por mais 30 segundos e com posterior centrifugação a 2700rpm por 20 minutos. Do extrato centrifugado, foi retirada uma alíquota de 5mL do sobrenadante para tubo de 10mL. Esta alíquota foi concentrada a 37°C sob fluxo de nitrogênio até quase secura completando o volume para 1mL com a mistura isoctano:tolueno (9:1). O extrato foi homogeneizado em agitador orbital por 30 segundos e a seguir centrifugado a 1000rpm por 10 minutos. Com o auxílio de pipeta Pasteur, cerca de 1mL do sobrenadante do extrato foi transferido para frasco de 2mL. A determinação foi realizada por cromatografia em fase gasosa com detector fotométrico de chama (FPD).

### Equipamento e condições cromatográficas

Cromatógrafo a gás HP6890 com FPD com filtro de fósforo; coluna capilar 14% fenilcianopropil 86% dimetilpolisiloxano (DB 1701), dimensões 30m x 0,25mm x 0,25µm de espessura de filme; temperatura inicial do forno: 80°C; rampa de aquecimento: 80°C-130°C (10°C/min); 130°C-240°C (4°C/min), 240°C (17,5min); temperatura do injetor: 250°C; volume de injeção: 2µL; injeção: splitless; gás: nitrogênio, fluxo: 1mL/min; temperatura do detector: 250°C. Aquisição dos dados: software HPChem. Tempo de retenção da fenitrotiona: 26,9min.

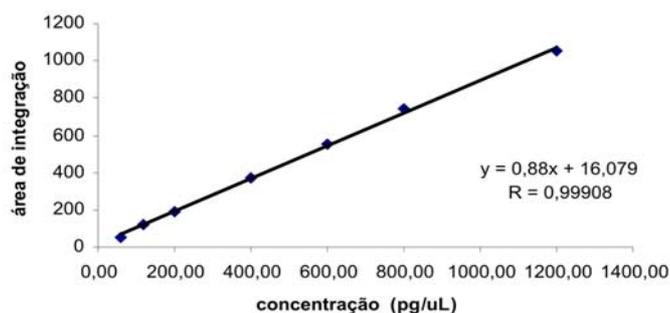
### Validação

Foram realizados estudos de recuperação em dois níveis de concentração, 0,05 e 0,50mg/kg em seis replicatas para cada nível e injetados em duplicatas. Essas concentrações foram usadas nos cálculos dos limites de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), desvio padrão relativo (DPR, repetitividade) e recuperação (exatidão) para o método estudado utilizando-se o método da padronização externa para quantificação da fenitrotiona.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A fenitrotiona foi quantificada utilizando-se o método da padronização externa. A curva analítica, indicada na Figura 1, realizada com matriz, foi linear na faixa de concentração de 60 a 1200pg/µL, equivalente a 0,036 a 0,720mg/kg de

fenitrotiona na amostra, de acordo com os cálculos de análise de variância (e cálculo dos resíduos) e aplicação do Teste F. O coeficiente de correlação da curva analítica foi de 0,99908.



**Figura 1.** Curva analítica de fenitrotiona em farinha de trigo.

Os valores obtidos nos estudos de recuperação em dois níveis de concentração, 0,05 e 0,50mg/kg., descritos na Tabela 1, estão na faixa de recuperação de 70 a 120%, de acordo com o recomendado pelo Codex Alimentarius<sup>10</sup>.

**Tabela 1.** Dados de recuperação em farinha de trigo fortificada com fenitrotiona nas concentrações de 0,05 e 0,50mg/kg.

Concentração (mg/kg)	Concentração recuperada (mg/kg)	Desvio padrão	Recuperação % <sup>a</sup>	Média final %	Desvio padrão relativo (%)
0,050	0,046	0,004	93	101	8
	0,055		109		
	0,055		93		
	0,056		113		
	0,051		102		
	0,050		100		
0,50	0,46	0,02	91	88	6
	0,45		90		
	0,39		78		
	0,45		91		
	0,44		89		
	0,45		91		

A repetitividade do método (DPR), obtida a partir de 6 réplicas para cada, foi de 8% para a concentração de 0,050mg/kg e de 6% para 0,50mg/kg (Tabela 1). Estes valores estão de acordo com o preconizado por Horwitz et al.<sup>11</sup>segundo o qual o DPR intralaboratorial esperado para determinações em nível de mg/kg deve ser no máximo de 16% e também com o estabelecido pelo Codex Alimentarius<sup>10</sup> que é de até 20%.

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) do método foram calculados a partir das concentrações recuperadas conforme as recomendações estabelecidas pela Associação Grupo de Analistas de Resíduos de Pesticidas<sup>12</sup>. De acordo com estas recomendações um método é aceitável quando o limite de quantificação testado (LQ proposto) for

maior ou igual ao limite de quantificação estatístico (LQ estatístico), sendo este considerado como 10 vezes o valor obtido do desvio padrão das concentrações recuperadas (mg/kg) do nível 0,05mg/kg. Neste caso:

$$\text{LQ estatístico} = 10 \times \text{DP} = 10 \times 0,004 = 0,04$$

$$\text{LQ proposto} = 0,05 \text{ mg/kg}$$

Portanto, LQ proposto (0,05) > LQ estatístico (0,04), sendo 0,05mg/kg estabelecido como limite de quantificação (LQ) do método.

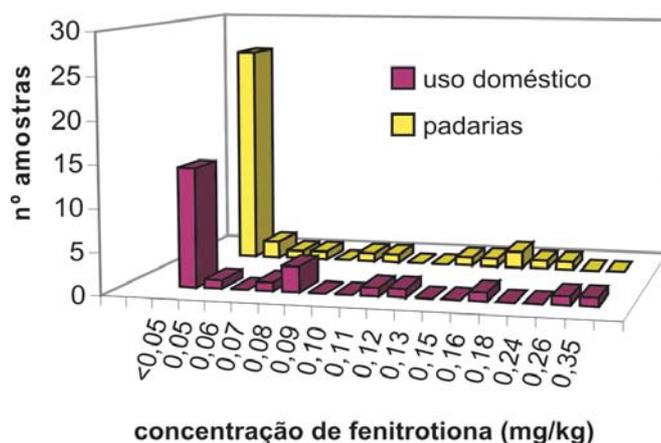
O valor de LD estatístico foi calculado como três vezes o desvio padrão das concentrações recuperadas. Como o LD instrumental é maior que o LD estatístico, então, o valor considerado como limite de detecção do método foi o LD instrumental, 0,02mg/kg:

$$\text{LD estatístico} = 3 \times \text{DP} = 3 \times 0,004 = 0,01$$

$$\text{LD instrumental (menor quantidade cuja relação sinal/ruído fosse 3 vezes)} = 0,02 \text{ mg/kg}$$

Das 37 amostras analisadas obtidas de padarias, 32,4% (12 amostras) estavam acima do LQ (0,05mg/kg), variando de 0,05 a  $0,18 \pm 0,04$ mg/kg, enquanto para as 25 amostras de uso doméstico este valor atingiu 40,0% (10 amostras), variando de 0,05 a  $0,35 \pm 0,07$ mg/kg. A incerteza do método foi calculada como incerteza do tipo A considerando 95% de confiança.

Os resultados de todas as amostras analisadas estão indicados na Figura 2, cuja concentração mediana calculada está abaixo de 0,05mg/kg. Pode-se observar que as amostras provenientes de padarias apresentaram uma menor incidência de fenitrotiona.



**Figura 2.** Resultados dos resíduos de fenitrotiona encontrados nas amostras de farinha de trigo analisadas.

Produtos alimentícios submetidos a várias etapas de processamento como: trituração, lavagem, moagem e refino, frequentemente tem os seus valores de resíduos menores do que apresentam seus produtos de origem (não

processados)<sup>13</sup>. Alguns estudos têm sido conduzidos para determinar e explicar a redução da concentração da fenitrotiona em várias etapas do processamento dos grãos de trigo até o preparo do pão. Segundo o JMPR<sup>13</sup> grande parte da fenitrotiona fica depositada na película do grão que é removida com o farelo no processo de moagem. O mesmo foi observado por Javier<sup>14</sup> que estudou a degradação do ativo nos grãos de trigo e em alguns de seus produtos processados. Observou que a fenitrotiona possui um valor de pressão de vapor de  $1,8 \times 10^{-2}$  Pa que a torna mais volátil e conseqüentemente ocasiona maiores perdas no processamento. A redução da concentração de resíduos de fenitrotiona do trigo pode chegar a 78% até obtenção da farinha de trigo branca e 91% até o preparo do pão<sup>13</sup>. Uygun et al.<sup>15</sup> obtiveram resultados próximos destes; os autores verificaram que do trigo até o preparo de pão branco a redução dos teores deste pesticida atingiu 92%.

No Brasil alguns estudos foram realizados com relação à presença de fenitrotiona em farinha de trigo. Firmino et al.<sup>16</sup> determinaram resíduos de pesticidas em 27 amostras de farinha de trigo e detectaram a presença do ativo em seis delas (22,2%), que variaram de 0,07-0,40mg/kg. No período de janeiro/2003 a maio/2004, Caetano et al.<sup>17</sup> analisaram 46 amostras e encontraram fenitrotiona em 26 delas (56,5%), com concentrações variando de 0,02-0,20mg/kg.

Os valores de fenitrotiona obtidos neste trabalho, cuja mediana está abaixo de 0,05mg/kg, estão de acordo com os estudos levantados e com a recomendação do Comitê do Codex Alimentarius<sup>6</sup> de LMR 2mg/kg para farinha de trigo branca. A legislação brasileira prevê LMR para fenitrotiona em trigo, mas, como visto, resíduos deste pesticida também podem ser encontrados nos produtos derivados. Uma vez que no processamento do trigo pode ocorrer alteração nos níveis de concentração do ativo e que o Brasil necessita importar farinha de trigo para suprir a demanda nacional, torna-se importante o estabelecimento de LMRs específicos para os diversos produtos processados do trigo e com isso garantir a qualidade dos alimentos que o país consome.

## CONCLUSÃO

Os níveis de fenitrotiona obtidos nesta pesquisa são muito inferiores ao valor do LMR vigente para trigo, 1,0mg/kg, e corroboram a importância do estabelecimento de LMR específico para farinha de trigo. Os valores de LMR são a base para o cálculo do consumo diário dos pesticidas, proporcionando dados mais realistas para o cálculo da quantidade de resíduos de pesticidas realmente ingeridos por uma pessoa consumindo uma dieta que lhe é habitual (Ingestão Diária Aceitável).

Estes resultados ressaltam a importância do estabelecimento dos LMRs para produtos processados.

## REFERÊNCIAS

1. World Health Organization. Sekizawa J, Eto M, Miyamoto J, Matsuo M. Environmental Health criteria 133. Fenitrothion. International Programme on Chemical Safety. Published under the joint sponsorship of the United Nations Environment Programme, the International Labour Organisation, and the World Health Organization. World Health Organization Geneva, 1992. <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc133.htm>. Acesso em 20/03/2007.
2. Agência Nacional de Vigilância Sanitária/Ministério da Saúde <http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/monografias/f05.pdf>. Acesso em 21/02/2007.
3. Trigo-Brasil. Série Histórica da área plantada. Safras 1976/77 a 2006/07. [www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/TrigoSerieHist.xls](http://www.conab.gov.br/conabweb/download/safra/TrigoSerieHist.xls). Acesso em 20/03/2007.
4. Limma Junior. Paraná: Trigo segue indefinido nos Campos Gerais (PR) (16/04/07) [http://www.paginarural.com.br/noticias\\_detalhes.asp?subcategoriaid=12&id=65950](http://www.paginarural.com.br/noticias_detalhes.asp?subcategoriaid=12&id=65950). Acesso em 13/06/07.
5. IBGE <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2002/pof2002.pdf> acessado em 22/03/07.
6. Fenitrothion (037). [www.fao.org/ag/agp/agpp/pesticid/JMPR/download/89/fentrotion.pdf](http://www.fao.org/ag/agp/agpp/pesticid/JMPR/download/89/fentrotion.pdf). Acesso em 05/06/07.
7. Agência Nacional de Vigilância Sanitária/Ministério da Saúde, Portaria nº03, item 1.5.4 de 16/01/1992.
8. Resolução ANVISA/MS RDC nº 216 de 15/12/2006 D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 18 de dezembro de 2006.
9. Inspectorate of Health Protection. Analytical methods for pesticide residues in food stuffs. Part I – Multiresidue Method. 6 ed. The Hague/ Rijswijk, The Netherlands: Ministry of Public Health, Welfare and Sports; 1996.
10. *Codex Alimentarius*. Pesticide Residues in Food. Methods of analysis and sampling. Volume 2A. 2 ed., part 1, Roma; 2000.
11. Horwitz W, Kamps LR, Boyer KW. Quality assurance in the analysis of foods for trace constituents. *J Assoc Off Anal Chem*. 1980; 63(6): 1344-54.
12. Toledo HHB et al. Manual de Procedimentos, Estudo dos Resíduos com Plantas. Parte A. Associação GARP; 2002.
13. Holland PT, Hamilton D, Ohlin B, Skidmore MW. Effects of storage and processing on pesticide residues in plant products. 1994; *Pure & Appl Chem* 63: 335-56.
14. Vásquez-Castro JA. Resíduos de fenitrotion e esfenvalerato em grãos de milho e trigo, em alguns de seus produtos processados e sua ação residual sobre

- Sitophilos oryzae* (L.,1763), *Sitophilos zeamas* Motsch.,1855 (Coleóptera: Curculionidae) e *Rhyzopertha dominica* (Fabr.,1792) (Coleóptera: Bostrichidae). 2006; Piracicaba:ESALQ Tese doutorado. 214p.
15. Uygun U, Koxsel H, Atlin A. Residue levels of malathion and its metabolites and fenitrothion in post-harvest treated wheat during storage, milling and baking. 2005; Food Chem 92:643-7.
  16. Firmino A, Baptista GC, Trevizan LRP. Monitoramento de Resíduos de Pesticidas em Farinha de Trigo. Rev Bras Toxicol. 2003; 16(supl1): 34.
  17. Caetano AC, Baptista GC, Trevizan LRP, Cerri F, Jaquier AM. Monitoramento de Resíduos de Pesticidas em Farinha de Trigo. In: XIV Encontro Nacional de Analistas de Alimentos. 2005; Goiânia-GO, CT/RS-12, 128.

# Método de digestão parcial de feijão cru (*Phaseolus vulgaris*) por hidrólise ácida para a determinação simultânea de nutrientes inorgânicos por ICP OES: validação e aplicação

A partial digestion method of raw bean (*Phaseolus vulgaris*) by acid hydrolysis for simultaneously determining inorganic nutrients by means of ICP OES: validation and application

RIALA6/1115

Isaura A. OKADA<sup>1\*</sup>, Maria C. DURAN<sup>2</sup>, Marcia L. BUZZO<sup>2</sup>, Sérgio DOVIDAUSKAS<sup>1</sup>, Alice M. SAKUMA<sup>2</sup>, Odair ZENEBO<sup>2</sup>

<sup>1\*</sup>Endereço para correspondência: Instituto Adolfo Lutz, Laboratório I de Ribeirão Preto, R. Minas, 877 CEP 14085-410, Ribeirão Preto/ SP, e-mail: isaura@ial.sp.gov.br

<sup>2</sup>Instituto Adolfo Lutz, Laboratório Central, Divisão de Bromatologia e Química. Av. Dr. Arnaldo, 355 CEP 01246-902, São Paulo/ SP  
Recebido: 15/01/2007 – Aceito para publicação: 08/08/2007

## RESUMO

Neste trabalho foi validada a técnica de digestão por via úmida (hidrólise com HCl) de feijão (*Phaseolus vulgaris*), para efetuar a determinação simultânea dos nutrientes inorgânicos Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P e Zn, por espectrometria de emissão óptica com plasma de argônio indutivamente acoplado (ICP OES). Essa técnica simples, relativamente rápida e com características satisfatórias de desempenho, foi utilizada na preparação de 40 amostras de feijão cru comercializadas no estado de São Paulo, Brasil. Após a determinação das concentrações dos nutrientes inorgânicos por ICP OES, os teores obtidos (em mg/100g de feijão) de Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P e Zn foram, respectivamente, de 120±20; 0,8±0,1; 6,0±0,9; 1370±80; 170±10; 1,5±0,4; 1,4±0,4; 350±50; 2,6±0,3. Esses teores mostraram-se satisfatoriamente concordantes com as informações de seis tabelas de composição de alimentos, com a exceção do teor de sódio que apresentou-se significativamente menor. Os resultados também foram usados para estimar a contribuição do consumo de feijão na Ingestão Diária Recomendada (IDR) dos nutrientes investigados, constatando-se que o feijão pode contribuir significativamente principalmente nas IDRs do Cu, Mg, Mn, P e Fe.

**Palavras-chave.** feijão, nutrientes inorgânicos, método de digestão, ICP OES, tabelas de composição de alimentos, Ingestão Diária Recomendada.

## ABSTRACT

In this investigation a wet digestion technique (HCl hydrolysis) of raw bean (*Phaseolus vulgaris*) was validated in order to perform the simultaneous determination of inorganic nutrients Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, and Zn by means of inductively coupled argon plasma optical emission spectrometry (ICP OES). This simple, relatively rapid, and with satisfactory performance characteristics technique was employed for analyzing 40 raw bean marketed in São Paulo state (Brazil). After determining inorganic nutrients by emission spectrometry, the obtained concentrations of Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, and Zn contents (in mg/100g bean) were 120±20; 0.8±0.1; 6.0±0.9; 1370±80; 170±10; 1.5±0.4; 1.4±0.4; 350±50; and 2.6±0.3, respectively. These inorganic nutrients contents are in agreement with the information from six food composition tables, except of Na that showed a significantly lower value. The results were also used to estimate the bean consumption contribution in Recommended Daily Intakes (RDI) for the investigated nutrients, and it was noted that bean can significantly contribute in Cu, Mg, Mn, P, Fe, and Zn RDIs.

**Key words.** bean, inorganic nutrients, digestion method, ICP OES, food composition tables, Recommended Daily Intake.

## INTRODUÇÃO

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) é um legume com uma ampla adaptação edafoclimática, embora tanto o solo quanto o clima possam influenciar a sua produção. No Brasil, dois tipos são geralmente cultivados: o que ocorre em arbustos cerrados e o que cresce como trepadeira. As vagens, longas e achatadas ou arredondadas, possuem 13 centímetros ou mais. A semente madura pode apresentar várias cores: branca, preta, marrom, etc<sup>1,2</sup>. A possibilidade de seu cultivo em diversos ecossistemas tropicais e temperados, em monocultivo ou consorciados aos mais variados arranjos de plantas, favorece a diversificação da produção no país, permitindo que o feijão constitua-se em importante componente da alimentação básica da maioria da população brasileira. Em 2001, o consumo médio de feijão no Brasil foi de aproximadamente 14,9kg por habitante/ano, correspondendo a cerca de 41g por habitante/dia. Considerando a diversidade fisiográfica do país e a adaptação do feijoeiro a diversas condições de clima e solo, é possível explorar a cultura em três épocas diferentes no mesmo ano: a safra “das águas”, cuja semeadura é feita de setembro a novembro, com predominância na região sul; a safra “da seca” ou “safrinha”, com plantio de janeiro a março, abrangendo a maioria dos estados produtores; e a safra “de outono-inverno” realizada de abril a julho, nas regiões centro-oeste e sudeste<sup>2</sup>.

Em termos nutricionais, o feijão é considerado uma boa fonte de proteínas (cerca de 20% em peso), glicídios (60% em peso), fibras (19% em peso) e de alguns nutrientes inorgânicos (ferro, potássio, zinco, magnésio, cobre e cálcio), apresentando um baixo teor de lipídios (1% em peso). Quando cozido, o feijão é uma das melhores fontes vegetais de tiamina, piridoxina, niacina e ácido fólico<sup>3-10</sup>. Contudo, deve ser ressaltado que tanto a qualidade como a composição do feijão são influenciadas por diversos fatores: fertilidade do solo onde foi cultivado, espaçamento entre as plantas, irrigação, maturidade e variedade<sup>1</sup>; além disso, fatores intraluminais podem afetar a biodisponibilidade de nutrientes inorgânicos<sup>3,11</sup>.

Em particular, a determinação dos teores dos nutrientes inorgânicos em alimentos é realizada principalmente por métodos baseados em espectroscopia atômica, especialmente a espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS) e a espectrometria de emissão ótica com plasma de argônio indutivamente acoplado (ICP OES)<sup>12,13</sup>. Estas técnicas requerem uma destruição prévia parcial ou total da matéria orgânica da amostra<sup>13,14</sup>; embora a destruição total da matéria orgânica por via seca seja largamente utilizada<sup>15</sup>, o tempo relativamente longo necessário para a sua realização tem conduzido a pesquisas em métodos por via úmida (destruição parcial) que sejam mais rápidos. Tais métodos envolvem a ação de ácidos e oxidantes e a utilização de várias formas de energia como, por exemplo, a térmica, o ultra-som e radiações (infravermelho, ultravioleta e microondas)<sup>13,14,16-19</sup>.

Um outro aspecto importante relacionado à análise de alimentos, diz respeito às compilações de dados experimentais

que originam as denominadas tabelas de composição de alimentos, importantes ferramentas em estudos epidemiológicos que investigam a relação entre dieta e saúde, além de fornecerem informações nutricionais básicas para uma dieta balanceada. Tendo-se em vista que os teores dos nutrientes nos alimentos dependem de diversos fatores, tais como os inerentes a cada alimento em particular (como espécie, variedade e maturidade), os ambientais (como temperatura, quantidade de chuvas e solo, quando do cultivo) e os de processamento (como tempo de armazenagem, métodos de preparação e preservação), a preparação de tais tabelas deve ser muito cuidadosa. A importância deste cuidado aumenta se considerarmos que o conteúdo de nutrientes de alguns alimentos é também afetado por reformulações, pelo uso de aditivos e de fortificações, além de depender consideravelmente do modo de preparação do alimento para o consumo. Deve ser ainda observado que a base dos dados para a construção das tabelas de composição dos alimentos é essencialmente experimental e, portanto, dependente da amostragem do alimento, da preparação da amostra para análise, do método analítico empregado na análise e do tratamento estatístico aplicado aos resultados obtidos nas análises<sup>20-22</sup>. Portanto, uma tabela de composição de alimentos deve trazer não somente os teores dos diversos componentes encontrados nos diferentes alimentos, mas também todas as informações relevantes relacionadas a cada teor declarado.

Assim, considerando (i) que o feijão é um importante componente na alimentação básica da população brasileira; (ii) que existe uma tendência pelo desenvolvimento de métodos de preparação de amostras que não consumam um tempo demasiado longo; e (iii) que tabelas de composição de alimentos são importantes ferramentas para a Saúde Pública, este trabalho procurou estabelecer um método analítico relativamente rápido e simples para a preparação de amostras de feijão cru por via úmida visando à determinação de nutrientes inorgânicos por ICP OES. A partir deste método, 40 amostras de feijão cru comercializadas no Estado de São Paulo foram analisadas determinando-se os teores de Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P e Zn. Estes teores foram então comparados com as informações apresentadas em 6 tabelas de composição de alimentos e também com os obtidos por via seca (método recomendado pela Association of Official Analytical Chemists<sup>15</sup>). Finalmente, estimou-se a contribuição do consumo de feijão para as IDR dos nutrientes inorgânicos investigados, tomando-se como base o consumo médio diário de feijão pela população brasileira.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material

Quarenta amostras de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*), variedade Carioca, cruas, de várias marcas e lotes foram coletadas pelas equipes de Vigilância Sanitária no comércio de 39 cidades do estado de São Paulo, Brasil. As amostras foram homogeneizadas na própria embalagem, não

sofrendo qualquer pré-tratamento ou processamento antes da destruição da matéria orgânica.

Os ácidos clorídrico e nítrico utilizados, marca Merck, foram de grau analítico. Foram utilizadas soluções-padrão de referência, marca Spex CertPrep®, de 10.000mg.L<sup>-1</sup>, para os elementos Ca, Fe, K, Mg, P e Zn, enquanto que para os elementos Cu e Mn as soluções-padrão de referência foram de 1.000mg.L<sup>-1</sup>. A água empregada nos procedimentos foi previamente destilada e desionizada em um sistema Milli-Q (Millipore Corp.), apresentando resistividade igual a 18,2MΩ/cm.

Todas as vidrarias usadas foram previamente descontaminadas por meio de imersão em solução de ácido nítrico a 50% (v/v) por 24 horas, seguida de enxágüe com água destilada e desionizada.

Para a determinação dos nutrientes inorgânicos foi empregado um espectrômetro de emissão ótica com plasma de argônio indutivamente acoplado ICPOES, marca Perkin Elmer, modelo Optima 3000 DV. As condições experimentais usadas foram: potência de rádio-frequência: 1350 W; fluxo de amostra: 1,0mL/min; fluxo de plasma: 15L/min; fluxo de nebulizador: 0,85L/min; gás auxiliar (argônio): 0,5L/min.

## Método

Digestão das amostras de feijão cru (via úmida): foram pesados, em triplicata, 2,0g de amostra de feijão em frascos tipo Erlenmeyer. As amostras não sofreram qualquer pré-tratamento como, por exemplo, trituração ou liofilização. A cada frasco foram adicionados 5mL de solução aquosa de HCl a 50% (v/v), cobrindo-os a seguir com filme de PVC (cloreto de polivinila) e deixando-os em repouso durante a noite. Foram preparados dois brancos dos reagentes. As amostras e os brancos foram então aquecidos sobre placa aquecedora por 3 horas a 75°C, com agitação ocasional. A seguir, as soluções foram filtradas em papel Whatman 40, e cada filtrado foi recolhido diretamente em balão volumétrico de 25mL, completando-se o volume com água destilada e desionizada.

Digestão das amostras de feijão cru (via seca)<sup>15</sup>: pesou-se aproximadamente 2,0g das amostras de feijão, em cápsula de porcelana e em triplicata; incinerou-se inicialmente em bico

de Bunsen e em seguida em forno mufla com uma rampa de aquecimento de 150°C até atingir 450°C, mantendo-se esta temperatura por 4 horas. Após resfriamento, adicionou-se 1mL de ácido nítrico concentrado (“ashing aid”) e deixou-se até à secura sobre chapa aquecedora. Retornou-se à mufla à 450°C por 2 horas. Repetiu-se, em média, cinco vezes este procedimento de adição de ácido nítrico e mufla até a obtenção de cinzas de cor branca ou sem pontos pretos, isto é, até toda a matéria orgânica ser destruída. As cinzas foram dissolvidas em 2,5mL de ácido clorídrico concentrado e a solução resultante foi transferida quantitativamente para balão volumétrico de 25mL com auxílio de água, completando-se o volume.

Quantificação dos nutrientes inorgânicos: as quantificações de Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P e Zn foram realizadas por ICPOES. As concentrações das soluções-padrão multielementar utilizadas para a construção das curvas de calibração foram preparadas em HCl 1M e encontram-se na Tabela 1.

Validação do método de digestão por via úmida: o método analítico proposto, envolvendo a digestão parcial com ácido clorídrico, foi validado seguindo as orientações do documento sobre validação de métodos de ensaios químicos DOQ-CGCRE-008 do Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial<sup>23</sup> (INMETRO). Por meio da espectroscopia de emissão ótica, os seguintes parâmetros de validação foram avaliados: linearidade, sensibilidade, seletividade, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão e precisão.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Validação do método

A partir das soluções-padrão descritas na Tabela 1, verificou-se a linearidade das faixas de trabalho através da construção das curvas de calibração para cada elemento em seu respectivo comprimento de onda ( $\lambda$ ) de emissão. Os valores dos coeficientes de correlação e das sensibilidades encontram-

**Tabela 1.** Concentrações das soluções-padrão multielementar para construção das curvas de calibração utilizadas na quantificação dos nutrientes inorgânicos nas amostras de feijão por ICP OES.

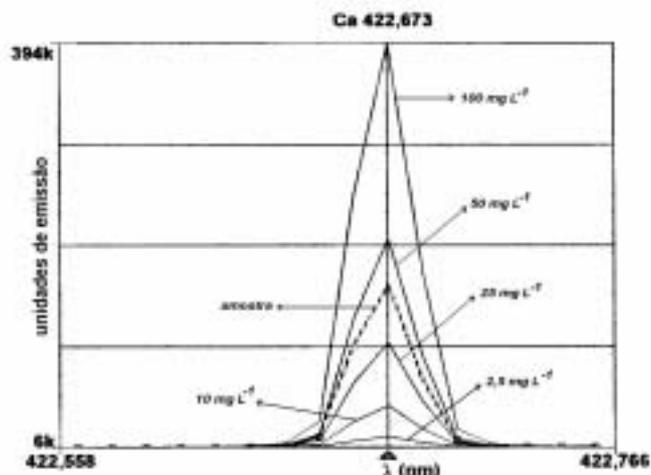
Elemento	Padrão 1(mg.L <sup>-1</sup> )	Padrão 2(mg.L <sup>-1</sup> )	Padrão 3(mg.L <sup>-1</sup> )	Padrão 4(mg.L <sup>-1</sup> )	Padrão 5(mg.L <sup>-1</sup> )
Ca	2,50	10,0	25,0	50,0	100
Cu	0,125	0,500	1,25	2,50	5,00
Fe	0,250	1,00	2,50	5,00	10,0
K	2,50	10,0	25,0	50,0	100
Mg	0,625	2,50	6,25	12,5	25,0
Mn	0,0125	0,0500	0,125	0,250	0,500
Na	2,50	10,0	25,0	50,0	100
P	2,50	10,0	25,0	50,0	100
Zn	0,250	1,00	2,50	5,00	10,0

se na Tabela 2. Pode-se observar que todos os valores obtidos para os coeficientes de correlação são iguais a 0,9999, ou seja, estão muito próximos de 1, o que implica na linearidade das curvas de calibração para todos os elementos estudados nas faixas de concentrações investigadas. De acordo com o INMETRO, recomenda-se um valor superior a 0,90 para que seja satisfeita a condição de linearidade<sup>23</sup>. Além disso, a Tabela 2 informa que a técnica apresenta maior sensibilidade para os elementos manganês, cobre e magnésio, sendo relativamente menos sensível para o elemento fósforo.

Os limites de detecção e de quantificação foram obtidos a partir de 10 preparações independentes das soluções correspondentes à menor concentração de cada elemento das curvas de calibração<sup>23,24</sup>. Os valores resultantes encontram-se na Tabela 2.

Para verificar a seletividade do método, foram traçados os espectros das amostras e padrões, nas regiões dos comprimentos de onda de emissão para cada elemento. Pôde-se observar que os perfis dos picos de emissão dos analitos das soluções das amostras de feijão são idênticos aos respectivos perfis dos picos das soluções-padrão de cada elemento, indicando que não ocorreram interferências espectrais ou de matriz na determinação dos elementos estudados. A Figura 1 apresenta um exemplo do perfil dos picos de emissão para o elemento cálcio.

Para a avaliação da exatidão foi utilizado o método de adição de padrões tanto para o método por via seca como para o método proposto: em 21 replicatas de uma amostra de feijão



**Figura 1.** Espectros de emissão das soluções-padrão (linhas preenchidas) e de uma das soluções das amostras de feijão (linha tracejada) na região próxima ao  $\lambda$  de emissão do cálcio (422,673nm).

foram realizadas adições de padrões em 3 concentrações diferentes de cada um dos 9 nutrientes investigados, sendo 7 réplicas em cada nível de concentração (nível baixo, nível médio e nível alto). Na Tabela 3 pode ser observado que as porcentagens de recuperação obtidas encontram-se dentro da faixa aceitável de 70 a 110%<sup>25</sup>, o que evidencia que o método

**Tabela 2.** Valores de coeficiente de correlação, sensibilidade, limite de detecção e limite de quantificação relacionados às curvas de calibração para cada nutriente determinado em seu respectivo comprimento de onda.

Nutriente	$\lambda$ (nm)	Coefficiente de correlação	Sensibilidade (L.mg <sup>-1</sup> )	Limite de detecção (mg.L <sup>-1</sup> )	Limite de quantificação (mg.L <sup>-1</sup> )
Cálcio	422,673	0,9999	5300	0,210	0,690
Cobre	324,754	0,9999	130000	0,008	0,025
Ferro	238,204	0,9999	47000	0,015	0,055
Potássio	766,491	0,9999	1400	0,220	0,730
Magnésio	280,270	0,9999	116000	0,110	0,360
Manganês	257,610	0,9999	317000	0,00006	0,002
Sódio	589,592	0,9999	2700	0,210	0,700
Fósforo	214,914	0,9999	130	0,360	1,200
Zinco	213,856	0,9999	5800	0,040	0,140

**Tabela 3.** Porcentagens de recuperação obtidas para amostra de feijão, com adições de três concentrações diferentes de cada nutriente, por via seca e por via úmida.

Nutriente	Adição 1			Adição 2			Adição 3		
	Conc. (mg.L <sup>-1</sup> )	% rec seca	% rec úmida	Conc. (mg.L <sup>-1</sup> )	% rec seca	% rec úmida	Conc. (mg.L <sup>-1</sup> )	% rec seca	% rec úmida
Ca	4	101	89	40	98	87	80	99	95
Cr	0,04	96	84	0,4	88	84	0,8	88	89
Cu	0,2	102	91	2	97	87	4	89	94
Fe	0,4	100	95	4	100	90	8	95	95
K	4	88	100	40	105	97	80	105	99
Mg	1	88	98	10	109	95	20	103	97
Mn	0,02	80	100	0,2	103	94	0,4	97	95
Na	4	108	107	40	110	85	80	98	93
P	4	86	100	40	109	96	80	103	97
Zn	0,4	98	97	4	96	85	8	97	91

Conc.= concentração; rec=recuperação.

proposto apresenta aceitável exatidão além de não exibir diferença significativa em relação ao método por via seca.

Sete análises da amostra sem adição de padrões foram realizadas para estudo de repetitividade<sup>26</sup>, utilizando-se mesmo procedimento de medição, analista, equipamento e laboratório, além de repetições em curto espaço de tempo. A precisão pôde ser avaliada a partir dos dados gerados por meio do cálculo das estimativas de desvios-padrão de repetitividade ( $S_r$ ), do coeficientes de variação (CV) e dos limites de repetitividade ( $r$ ) para um nível de confiança de 95%<sup>23</sup>. Como pode ser observado na Tabela 4, todos os valores calculados para os limites de repetitividade ( $r = 2,8S_r$ ) de cada nutriente apresentam-se precisos, isto é, as diferenças entre as réplicas são menores que  $r$ . No caso do sódio em particular, embora  $S_r$  apresente-se aparentemente elevado (em torno de 20%), devem ser considerados dois fatores principais: primeiro, a relativamente baixa concentração deste nutriente no feijão conduz a uma diminuição na precisão<sup>27</sup>; segundo, sódio é um elemento comumente presente formando compostos que, em sua grande maioria, são solúveis em meio aquoso portanto, sódio é bastante disponível e poderá acarretar contaminações nas amostras comprometendo não somente a exatidão, mas também a precisão, principalmente a baixas concentrações ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ).

#### Comparação entre os teores obtidos para os nutrientes inorgânicos nas amostras de feijão e os respectivos valores declarados em tabelas de composição de alimentos

Usando-se o método de preparação de amostras por hidrólise com HCl (sem qualquer pré-tratamento como, por exemplo, trituração ou liofilização), foram analisadas quarenta amostras de feijão comum (*Phaseolus vulgaris*, variedade Carioca), cru, comercializadas no estado de São Paulo (Brasil). A Tabela 5 mostra a estatística descritiva para os nove nutrientes analisados, observando-se que as concentrações determinadas de cada nutriente nas quarenta amostras apresentaram distribuições normais.

Na Tabela 6 são apresentados os teores médios dos nutrientes inorgânicos obtidos neste estudo junto aos valores declarados em 6 tabelas de composição de alimentos, sendo duas nacionais (Philippi<sup>8</sup> e NEPA<sup>28</sup>), e quatro internacionais (SOUCI<sup>29</sup>, CIQUAL<sup>30</sup>, McCance<sup>31</sup> e USDA<sup>32</sup>).

De modo geral, pode-se observar que os teores obtidos para os elementos analisados à exceção do sódio, são comparáveis aos valores declarados pelas compilações apresentadas. No caso do sódio, mesmo considerando que dados sobre a composição dos alimentos possam variar conforme fatores inerentes ao cultivo e de processamento, além de serem afetados pela amostragem, pela preparação da amostra, pelo método analítico empregado na determinação e até pelo tratamento estatístico dos dados experimentais obtidos<sup>20-22</sup>, é grande a divergência observada no conteúdo de sódio. Contudo, a similaridade entre os resultados obtidos para os nutrientes inorgânicos no presente estudo e aqueles constatados na compilação nacional do NEPA<sup>28</sup> também deve ser ressaltada.

**Tabela 4.** Coeficiente de variação (CV), limite de repetitividade ( $r$ ) e concentrações médias dos nutrientes das 7 replicatas de uma amostra de feijão analisadas pelo método proposto sob condições de repetitividade.

Resultados	Concentração ( $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )								
	Ca	Cu	Fe	K	Mg	Mn	Na	P	Zn
Média	960	7,15	49,8	10650	1640	11,1	22	3025	22,3
$S_r$	70	0,13	1,2	310	40	0,4	5	55	0,9
CV	7,3	2,0	2,4	2,9	2,4	3,6	23	1,8	4,0
$r$	196	0,36	3,4	870	110	1,1	15,0	150	2,5

**Tabela 5.** Estatística descritiva para os nutrientes inorgânicos analisados em 40 amostras de feijão comercializadas no Estado de São Paulo, Brasil.

Resultados	Concentração ( $\text{mg}\cdot 100\text{g}^{-1}$ )								
	Ca	Cu	Fe	K	Mg	Mn	Na	P	Zn
Média	120	0,8	6,0	1370	170	1,5	1,4	350	2,6
Desvio padrão	20	0,1	0,9	80	10	0,4	0,4	50	0,3
Mediana	110	0,8	5,8	1380	170	1,4	1,4	350	2,6
Valor mínimo	60	0,6	4,5	1180	150	0,9	0,8	130	2,2
Valor máximo	180	1,1	7,9	1560	190	2,7	2,5	480	3,6

**Tabela 6.** Comparação entre os teores de nutrientes inorgânicos em feijão cru declarados em tabelas de composição de alimentos e os resultados obtidos neste estudo.

Nutriente inorgânico (mg.100g <sup>-1</sup> )									
Ca	Cu	Fe	K	Mg	Mn	Na	P	Zn	Fonte
120	0,8	6,0	1370	170	1,5	1,4	350	2,6	Este trabalho
83	0,7	6,7	1359	138	1,11	12	406	2,8	Philippi <sup>8</sup>
123	0,79	8,0	1352	210	-	< 0,4	385	2,9	NEPA <sup>28</sup>
197	-	7	1770	-	-	570	420	-	Souci et al <sup>29</sup>
165	-	7	1450	180	-	15	350	-	Favier et al <sup>30</sup>
81	0,75	7,6	1170	140	1,3	16	410	3,2	McCance <sup>31</sup>
143	0,958	8,20	1406	140	1,021	24	407	2,79	USDA <sup>32</sup>

### Contribuição do consumo de feijão às IDR dos nutrientes inorgânicos investigados

A Tabela 7 exhibe as IDR para os nove nutrientes investigados juntamente com as respectivas contribuições do consumo médio de feijão pela população de acordo com dados da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA)<sup>2</sup> que situou-se, em 2001, em torno de 14,9kg/habitante/ano ou, aproximadamente, 40,8g/habitante/dia. Como pode ser observado na Tabela 7, o feijão comum é uma boa fonte de vários nutrientes inorgânicos: Cu, Mg, Mn, P, Fe, Zn, por apresentarem porcentagens maiores que 15% da IDR de referência, sendo menos importante como fonte de Ca e K, mas uma inexpressiva fonte de Na.

**Tabela 7.** Contribuição do consumo médio de feijão pela população brasileira, à Ingestão Diária Recomendada (IDR) de 9 nutrientes inorgânicos.

Nutriente	IDR adultos (mg)	Contribuição do feijão à IDR (em %), por consumo médio de 40,8 g/habitante/dia
Ca	1000	4,9
Cu	0,90	36
Fe	14	17
K	4700	12
Mg	260	27
Mn	2,3	27
Na	1500	0,038
P	700	20
Zn	7	15

### CONCLUSÕES

A digestão de amostras de feijão comum cru por hidrólise com HCl, visando a determinação dos nutrientes inorgânicos Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P e Zn, por espectrometria de emissão

óptica com plasma de argônio indutivamente acoplado, apresentou parâmetros de validação satisfatórios, exibindo ainda simplicidade e relativa rapidez, permitindo a análise multielementar e simultânea de um número relativamente grande de amostras.

Com relação à comparação dos resultados obtidos com os declarados nas tabelas de composição de alimentos, verificou-se que, à exceção do sódio, os valores são comparáveis entre si.

Finalmente, em comparação ao que foi afirmado anteriormente, pode ser confirmado que o feijão comum comercializado no estado de São Paulo é uma boa fonte dos nutrientes: Cu, Mg, Mn, P, Fe e Zn. Contudo, a contribuição do Ca e K à IDR revelou-se menos importante, enquanto que para o elemento Na revelou-se inexpressiva.

### REFERÊNCIAS

1. Adsule RN, Desphande SS, Sathe SK. French bean. In: Salunkhe DK, Kadan SS, editors. Handbook of Vegetable Science and Technology/Production, Composition, Storage, and Processing. New York: Marcel Dekker Inc.; 1998. p. 457-69.
2. EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária: Sistemas de produção do feijoeiro. Disponível em <http://www.cnpaf.embrapa.br> - Acesso em 31/07/2006.
3. Anderson JW, Smith BM, Washnock CS. Cardiovascular and renal benefits of dry bean and soybean intake. *Am J Clin Nutr* 1999; 70 (3): 464S-474S.
4. Barampama Z, Simard RE. Nutrient composition, protein quality and antinutritional factors of some varieties of dry beans (*Phaseolus vulgaris*) grown in Burundi. *Food Chem* 1993;47: 159-67.
5. Charley H, Weaver C. Foods - A Scientific Approach. 3<sup>rd</sup> ed. Merrill Prentice Hall; 1998.
6. Meiners CR, Derise NL, Lau HC, Crews MG, Ritchey SJ, Murphy EW. The content of nine mineral elements

- in raw and cooked mature dry legumes. *J Agric Food Chem* 1976; 24(6): 1126-30.
7. Oliveira LFA. Efeito da ingestão da mistura de arroz e feijão na biodisponibilidade de Fe e Ca [Mestrado]. Viçosa, Minas gerais: Universidade Federal de Viçosa, 1997.
  8. Philippi ST. Tabela de Composição de Alimentos: Suporte Para Decisão Nutricional. Brasília: ANVISA, FINATEC/NUT-UnB; 2002.
  9. Sathe SK, Desphande SS, Reddy NR. Dry beans of *Phaseolus*: a review. Part 2. Chemical composition: carbohydrates, fiber, minerals, vitamins and lipids. *CRC Crit Rev Food Sci Nutr* 1984; 21: 41-93.
  10. Sgarbieri VC, Antunes PL, Almeida LD. Nutritional evaluation of four varieties of dry beans. *J Food Sci* 1979;44: 1306-8.
  11. Moura NC, Canniatti-Brazaca SG. Avaliação da disponibilidade de ferro de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) em comparação com carne bovina. *Ciênc Tecnol Aliment* 2006; 26(2): 270-6.
  12. Miller-Ihli NJ. Trace element determinations in foods and biological samples using inductively coupled plasma atomic emission spectrometry and flame atomic absorption spectrometry. *J Agric Food Chem* 1996; 44: 2675-9.
  13. Instituto Adolfo Lutz. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. 4ª ed. Brasília: Ministério da Saúde/Agência Nacional de Vigilância Sanitária; 2005.
  14. Oliveira E. Sample preparation for atomic spectroscopy: evolution and future trends. *J Braz Chem Soc* 2003; 14 (2): 174-82.
  15. AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC International - Method 985.01. 16th ed. Gaithersburg: Association of Official Analytical Chemists; 1995.
  16. Cabanis MT, Cassanas G, Cabanis JC, Brun S. Comparison of four methods for digesting food samples for determination of trace levels of cadmium by flameless atomic absorption spectrophotometry. *J Assoc Off Anal Chem* 1988; 71(5): 1033-7.
  17. Gawalko EJ, Nowicki TW, Babb J, Tkachuk R. Comparison of closed-vessel and focused open-vessel microwave dissolution for determination of cadmium, copper, lead, and selenium in wheat, wheat products, corn bran, and rice flour by transverse-heated graphite furnace atomic absorption spectrometry. *JAOAC Int* 1997; 80(2): 379-87.
  18. Kira CS, Maio FD, Maihara VA. Comparison of partial digestion procedures for determination of Ca, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, and Zn in milk by inductively coupled plasma-optical emission spectrometry. *JAOAC Int* 2004; 87(1): 151-6.
  19. Sun DH, Waters JK, Mawhinney TP. Determination of thirteen common elements in food samples by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry: comparison of five digestion methods. *JAOAC Int* 2000; 83(5): 1218-24.
  20. Makhlof J, Zee J, Tremblay N, Bélanger A, Michaud MH, Gosselin A. Some nutritional characteristics of beans, sweet corn and peas (raw, canned and frozen) produced in the Province of Quebec. *Food Res Int* 1995; 28 (3): 253-9.
  21. Palmero MR, Bargalló AIC, Sabater CL, Boronat CT, Urgell MR. Assesment of dietary nutrient intakes: analysed vs calculated values. *Food Chem* 1998; 61(1/2): 215-21.
  22. Sika M, Terrab A, Swan PB, Hegarty PV. Composition of selected moroccan cereals and legumes: comparison with the FAO table for use in Africa. *J Food Comp Anal* 1995; 8: 62-70.
  23. INMETRO. Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. Disponível em <http://www.inmetro.gov.br/credenciamento/laboratorios/calibensaios.asp>. São Paulo: Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial; 2003.
  24. EURACHEM. The fitness for purpose of analytical methods: a laboratory guide to method validation and related topics. Disponível em <http://www.eurachem.ul.pt/guides/valid.pdf>. Budapest: EURACHEM, 2003.
  25. SANCO. European Commission - Guidance document on residue analytical methods; 2000.
  26. INMETRO. Vocabulário Internacional de Termos Fundamentais e Gerais de Metrologia. 2ª ed. Brasília: Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial/SENAI/DN; 2000.
  27. Skoog DA, West DM, Holler FJ, Crouch SR. Fundamentals of Analytical Chemistry. 8th ed. Belmont: Thomson Learning Inc.; 2004.
  28. NEPA. Tabela Brasileira de Composição de Alimentos - TACO, versão 1. Disponível em <http://www.unicamp.br/nepa/taco/tabela.php>. Campinas: Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP); 2006.
  29. Souci SW, Fachmann W, Kraut H. Food Composition and Nutrition Tables. 5th ed. Stuttgart: Medpharm Scientific Publishers; 1994.
  30. Favier J-C, Ireland-Ripert J, Toque C, Feinberg M. Repertório Geral dos Alimentos, Tabela de Composição. 2ª ed. São Paulo: Editora Roca Ltda; 1999.
  31. McCance RA, Widdowson's EM. The Composition of Foods. 6th ed. Londres: The Royal Society of Chemistry and Ministry of Agriculture, Fisheries and Food; 2002.
  32. USDA. USDA nutrient database for standard reference. Disponível em <http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp>. Beltsville: United States Department of Agriculture; 2005.

# Níveis de retinol em iogurtes naturais comercializados em supermercados de Natal/RN.

## Retinol concentrations in natural yogurt on sale in supermarkets located in Natal, RN.

RIALA6/1116

Juliana Karla Garcia RIBEIRO<sup>1</sup>, Fernanda Barros SOARES<sup>1</sup>, Danielle Soares BEZERRA<sup>2</sup>, Roberto DIMENSTEIN<sup>\*3</sup>

\*Endereço para correspondência: Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Av. Senador Salgado Filho 3000 CEP 59072-970 Natal/RN, telefone: 55 (0\*\*84) 3215-3416 ramal 212, fax 55 (0\*\*84) 32119208; e-mail: robertod@ufrnet.br

<sup>1</sup>Graduanda do curso de Nutrição da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal /RN, Brasil.

<sup>2</sup>Nutricionista e Mestranda em Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal /RN, Brasil.

<sup>3</sup>Professor adjunto, Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal /RN, Brasil.

Recebido: 23/04/2007 – Aceito para publicação: 14/06/2007

### RESUMO

Iogurte é o produto obtido pela fermentação de leite integral, desnatado ou padronizado por meio da ação do *Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*. Por ser um produto lácteo, o iogurte é considerado como boa fonte de vitamina A. Esta vitamina é essencial para muitos processos biológicos, como a diferenciação celular, a visão, a integridade do sistema imunológico e a manutenção de epitélios. Esse trabalho teve como objetivo verificar a concentração de retinol em iogurtes naturais de diferentes marcas comercializados em supermercados de Natal/RN. Foram selecionadas aleatoriamente para o estudo, quatro marcas de iogurte natural integral e a determinação do retinol foi realizada por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Os valores das concentrações médias de retinol nas amostras das marcas A, B, C, e D foram  $47.6 \pm 5.9$ ;  $31.0 \pm 3.3$ ;  $65.1 \pm 13.7$  e  $50.8 \pm 10.9$  ug/100g, respectivamente. Os valores encontrados apresentaram grande variação e a diferença entre o menor e maior valor de aproximadamente 110%. Todas as marcas estudadas apresentaram amostras com níveis de retinol próximos ou acima da concentração de retinol do leite integral relatada na literatura brasileira, o que confirma que o iogurte natural é uma boa fonte nutricional de vitamina A.

**Palavras-chave.** retinol, iogurte, CLAE.

### ABSTRACT

Yogurt is a product derived from the whole, skimmed, or standardized milk fermentation by the action of *Lactobacillus delbrueckii ssp bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*. As a lactic product, yogurt is considered to be a good source of vitamin A. This vitamin is essential for many biological processes such as cellular differentiation, visual cycle, immune system integrity, and epithelial maintenance. The objective of the present study was to verify the retinol concentration in natural yogurt from different brands marketed in major supermarkets of Natal, RN. Four brands of natural whole yogurt were randomly selected, and retinol concentration was determined in these samples by means of High Performance Liquid Chromatography. The average values of retinol concentrations in A, B, C, and D natural yogurt samples were  $47.6 \pm 5.9$ ;  $31.0 \pm 3.3$ ;  $65.1 \pm 13.7$ , and  $50.8 \pm 10.9$  ug/100g, respectively. Remarkable variations on retinol concentration values were found, and the range between the least and the major value was 110%. The yogurt samples from all analyzed brands presented retinol levels close to or above those concentrations found in whole milk, confirming that natural yogurt is a good nutritional source of vitamin A.

**Key word.** retinol, yogurt, HPLC

## INTRODUÇÃO

Os produtos lácteos estão presentes na dieta alimentar humana desde a antiguidade, quando a fermentação era utilizada como forma de preservar os nutrientes do leite da deterioração causada por microrganismos. Entretanto nas últimas décadas houve um incremento no setor de laticínios por conta do desenvolvimento da tecnologia e uma maior aceitabilidade do consumidor que tem buscado adquirir produtos com características funcionais e de alto valor nutritivo<sup>1</sup>.

Um dos produtos lácteos mais conhecidos é o iogurte, cuja fabricação no Brasil, nos últimos 20 anos, cresceu de maneira considerável, registrando atualmente uma produção média de 400 mil toneladas por ano, o que representa 76% do total de laticínios<sup>2</sup>.

O iogurte é definido pela legislação brasileira como “o produto obtido pela fermentação láctica através da ação do *Lactobacillus delbrueckii* ssp *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* sobre o leite integral, desnatado ou padronizado<sup>3</sup>”. As culturas de bactérias lácticas são utilizadas para aumentar a vida-de-prateleira do leite, devido à formação de componentes metabólicos como ácido láctico, ácido propiônico, diacetil e substâncias antagonísticas que exercem efeito inibitório nas bactérias Gram-negativas responsáveis pela deterioração do produto<sup>4,5,6</sup>.

O iogurte é um produto amplamente recomendado, pois além da sua importância econômica, possui boas características sensoriais, probióticas e nutricionais<sup>7</sup>. É um alimento de fácil assimilação pelo organismo, principalmente da lactose e de proteínas<sup>8</sup>. Durante a fermentação, a proteína, a gordura e a lactose do leite sofrem hidrólise parcial, tornando o produto, facilmente digerível, sendo considerado um agente regulador das funções digestivas<sup>7,9,10,11</sup>.

Por ser bastante consumido por idosos, crianças e pessoas doentes, a qualidade higiênica deste alimento deve estar constantemente controlada<sup>12</sup>. O leite, empregado no processamento do iogurte deve ser de boa procedência e qualidade, pois é responsável pelo seu valor nutricional<sup>9,11,13</sup>, uma vez que os produtos lácteos fermentados, geralmente contêm a mesma quantidade de nutrientes do leite do qual é obtido<sup>14</sup>.

O iogurte fabricado a partir do leite de vaca possui composição semelhante, tendo em média 3,5-3,7% de lipídios; 3,7% de proteínas e 4,8% de lactose<sup>15</sup>. Entretanto, se reconhece que existam algumas diferenças devido às mudanças ocorridas na fermentação sobre a lactose<sup>11</sup>.

Embora o leite seja um alimento que se destaca pela sua composição vitamínica<sup>16,17</sup>, no iogurte, os teores de vitaminas podem aumentar ou diminuir, de acordo com o metabolismo das bactérias lácticas<sup>18,19,20</sup>, podendo, ainda, devido ao processamento, estarem reduzidos, quando comparados ao alimento de origem<sup>21</sup>.

Os dados sobre as vitaminas não são uniformes e variam segundo a fonte consultada<sup>18,19,20</sup>.

Uma das principais vitaminas lipossolúveis encontradas no leite é a vitamina A (VA). De acordo com o Iom<sup>22</sup>, vitamina A é a expressão genérica usada para descrever o retinol e todos os carotenóides dietéticos que têm atividade biológica de retinol todo trans. A VA natural é um álcool (retinol) isoprenóide, lipossolúvel e insaturado, encontrado em alimentos de origem animal<sup>23</sup>. Usualmente apresenta-se na forma de ésteres de retinil de cadeia longa, sendo encontrada em maior concentração no fígado e rim, leites integrais e seus derivados, peixes e gema de ovos<sup>24</sup>. As formas metabolicamente ativas, segundo Iom<sup>22</sup>, incluem os correspondentes: aldeído (retinal) e ácido (ácido retinóico).

Para a caracterização humana da necessidade diária recomendada de vitamina A é utilizada a definição propriamente dita: Ingestão Dietética Recomendada (DRI), como a ingestão dietética necessária para suprir as necessidades em 97 a 98% dos indivíduos saudáveis<sup>22</sup>.

Uma vez que o iogurte é um produto lácteo, este é considerado uma ótima fonte de vitamina A<sup>25</sup>. Segundo Philippi<sup>26</sup> a quantidade deste micronutriente no iogurte natural, sem adição de qualquer outro ingrediente, é de 30µg/100ml, o que corresponde a uma média de 6,0% da recomendação diária para crianças.

Os benefícios de um adequado estado nutricional de VA sobre a saúde humana podem ser atribuídos aos efeitos da participação deste micronutriente em diversos mecanismos biológicos, como a reprodução, a visão normal e a manutenção do sistema imune<sup>27</sup>, sendo de especial importância durante o crescimento e desenvolvimento<sup>28</sup>. Já é reconhecido que um adequado estado nutricional de VA pode diminuir a severidade dos quadros infecciosos<sup>29,30</sup>, enquanto a deficiência pode aumentá-la<sup>31</sup>, devido a prejuízos no sistema imunológico<sup>32</sup>.

Considerando-se a crescente importância que o iogurte vem assumindo no mercado nacional e sabendo-se da relevância dos produtos lácteos, como boas fontes nutricionais de vitamina A, bem como, que a literatura brasileira é escassa em trabalhos que verifiquem os níveis de retinol no iogurte, torna-se necessário o desenvolvimento de pesquisas que avaliem a qualidade nutricional destes produtos consumidos frequentemente pela população brasileira.

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo verificar a concentração de retinol em diferentes marcas de iogurtes naturais comercializados em supermercados da cidade do Natal/RN.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Coleta

Para o presente estudo, foram selecionadas aleatoriamente, 4 marcas de iogurtes naturais sem adição de outros ingredientes ou aromas, como frutas, mel ou chocolate e excluídos os iogurtes desnatados. Seis unidades de cada marca (n=24), oriundas de lotes de fabricação diferentes,

foram coletadas em supermercados de Natal/RN e acondicionadas em caixas de material isotérmico contendo cubos de gelo e transportadas imediatamente para o Laboratório de Bioquímica da Nutrição do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Posteriormente, cada amostra foi devidamente identificada por letras e procedeu-se a abertura e mistura das unidades de mesma marca, bem como, foi efetuada a homogeneização em recipiente apropriado. Observou-se a aparência do produto e, assepticamente, retirou-se 6 alíquotas de 1g de cada produto para análise.

### Extração e determinação do Retinol

O retinol foi extraído segundo Giuliano<sup>33</sup>, adaptado às condições laboratoriais e o extrato hexânico evaporado sob atmosfera de nitrogênio, em banho-maria a 37°C. As amostras foram ressuspensas em 1,0mL de metanol em grau de pureza para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e agitadas por um minuto. A concentração de retinol das amostras foi determinada por CLAE em Cromatógrafo LC-10 AD Shimadzu, acoplado a um Detector SPD-10 A Shimadzu UV-VIS e Integrador Chromatopac C-R6A Shimadzu com uma coluna LC Shim-pack CLC-ODS(M) 4,6mm x 25cm.

O cromatograma evoluiu nas seguintes condições: fase móvel metanol 100% e fluxo 1,0mL/min e a identificação e quantificação do retinol nas amostras foram estabelecidas por comparação com o tempo de retenção e a área do respectivo padrão, em comprimento de onda de 325nm (Figura 1 e Figura 2).

A concentração do padrão foi confirmada pelo coeficiente de extinção específico ( $\epsilon$  1%, 1cm = 1780) em etanol absoluto e comprimento de onda de 325nm<sup>34</sup>.

A exatidão do método foi avaliada através do teste de recuperação da extração, obtendo-se 95% de recuperação do retinol acetato (padrão interno) adicionado às amostras. A precisão foi avaliada pelo teste de reprodutibilidade, em que triplicatas de uma mesma amostra de iogurte foram aferidas para retinol durante 3 dias seguidos. Os valores encontrados apresentaram variação inferior a 1 desvio padrão.

A curva padrão foi realizada com padrão referência retinol todo *trans* (Sigma) em diferentes concentrações, variando de 2 a 32ng/20 $\mu$ L. Os limites de detecção e quantificação foram baseados na linearidade da curva do padrão, obtendo-se valores de 0,1 $\mu$ g/mL e 2 $\mu$ g/mL, respectivamente.

Os valores de retinol foram expressos em média e desvio padrão, e, para testar as diferenças entre as médias dos dados numéricos paramétricos, foi utilizado o teste de Turkey. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

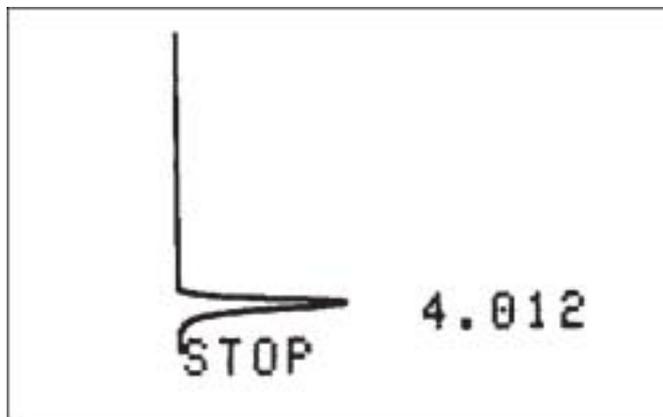


Figura 1. Cromatógrafo do padrão de retinol (4ng/20 $\mu$ L) e tempo de retenção 4,0 min.

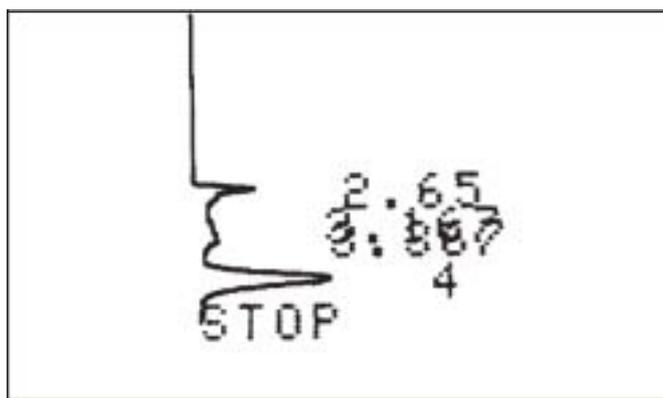
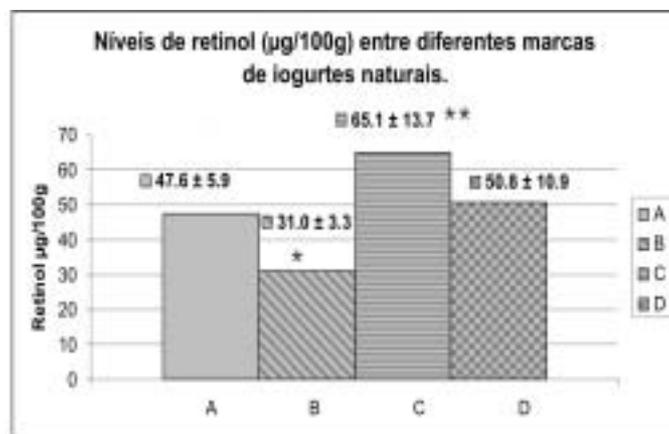


Figura 2. Cromatógrafo de amostra de iogurte, tempo de retenção 4,0 min

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na identificação de retinol, foi verificado que as concentrações médias deste micronutriente, nas amostras de iogurte natural das marcas A, B, C, e D, apresentadas na Figura 3, foram: 47,6 $\pm$ 5,9; 31,0 $\pm$ 3,3; 65,1 $\pm$ 13,7 e 50,8 $\pm$ 10,9 $\mu$ g/100g, respectivamente. A concentração de retinol do iogurte natural da marca C, quando comparado às marcas A e B, mostrou-se significativamente maior. Enquanto que a marca B apresentou o menor nível de retinol dentre as marcas analisadas.

Apesar de os iogurtes aqui estudados terem sido adquiridos e analisados numa mesma época, os valores encontrados, entre as marcas estudadas, apresentaram variação expressiva, sendo de 110% a diferença entre o menor e maior valor. Entretanto, as variações no teor do composto analisado entre as diferentes marcas, podem ser explicadas em função da alimentação, manejo e raça dos animais produtores do leite com o qual os iogurtes foram fabricados, uma vez que, segundo Neirotti, Oliveira<sup>15</sup>, a composição do leite de vaca pode variar com estes parâmetros.



\* Média significativamente diferente de A, C e D ( $p < 0,05$ )

\*\* Média significativamente diferente de A e B ( $p < 0,05$ )

**Figura 3.** Comparação dos níveis de retinol ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ ) entre diferentes marcas de iogurtes naturais, comercializados na cidade do Natal/RN.

Sabe-se, também, que durante o período de comercialização do iogurte, pode ocorrer uma diminuição dos valores de pH, relacionada ao tempo e à temperatura de armazenamento e incubação (fermentação), refletindo em uma maior acidez. Para Davis<sup>35</sup>, esse aumento da acidez também pode ocorrer conforme o balanço microbiológico entre as colônias de bactérias lácticas utilizadas na fabricação do produto. Tais aspectos poderiam resultar num comprometimento do retinol nas demais marcas em comparação a marca C, visto que este micronutriente, segundo Machlin<sup>36</sup> é um álcool sensível à oxidação na presença de luz, instável ao calor e ao meio ácido.

As concentrações mais elevadas encontradas neste estudo podem também estar relacionadas ao acréscimo de leite em pó integral, que é intencionalmente utilizado para o aumento dos sólidos lácteos no produto final, concordando com Deeth; Tamime<sup>21</sup>. Suas afirmações apontam que os produtos variam consideravelmente em relação à composição, aroma e textura, de acordo com a natureza dos microrganismos, do tipo de leite e do processo usado na fabricação.

Philipp, em sua tabela de composição de alimentos, relata uma concentração de  $30\mu\text{g}/\text{dL}$  para o iogurte natural, porém, uma vez que o dado foi obtido a partir de referências bibliográficas, pode não representar a realidade dos produtos industrializados brasileiros<sup>26</sup>.

Em pesquisa realizada por Torres et al.<sup>37</sup> na cidade de São Paulo, onde foi avaliado o teor em vitamina A de alguns alimentos, foram encontrados no iogurte natural,  $11,4\mu\text{g}$  de equivalente de retinol/100g de alimento analisado; níveis bem abaixo dos verificados no presente estudo, porém podemos atribuir este valor reduzido à metodologia utilizada (Carr-Price), diferente da realizada neste estudo<sup>33</sup>.

Assim, dentre as marcas de iogurtes aqui analisadas, apenas uma teve concentração de retinol semelhante à relatada na literatura<sup>26</sup> ao passo que as demais tiveram níveis acima desta concentração, portanto, apesar das diferenças terem sido estatisticamente significativas, os níveis de retinol nas marcas de iogurtes, estudadas, encontram-se dentro da normalidade e adequados ao consumo em relação à vitamina estudada.

## REFERÊNCIAS

1. Oliveira VM. Formulação de bebida láctea com diferentes concentrações de soro de queijo, enriquecida com ferro: caracterização físico-química, análises bacteriológicas e sensoriais. [Dissertação de Mestrado]. Rio de Janeiro, RJ: Universidade Federal Fluminense, 2006.
2. Bolini HMA, Moraes P. Tese mostra que análise sensorial incrementaria produção de iogurte. J Unicamp, ed. 253, de 24-30 de maio 2004: 11.
3. Brasil. Ministério da Saúde. Decreto de Leis, Decreto nº 2.224 de 4 de junho de 1997. Diário Oficial da União, Brasília 5 de junho de 1997, Seç. I, p. 11555 (altera dispositivos do Dec. nº 30.691 de 29 de março de 1952.).
4. Martins JFP, Luchese RH. Determinação da compatibilidade de crescimento associativo entre cepas de *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*. Rev Inst Latic Candido Tostes 1988; 43 (256): 11-3.
5. Vedamuthu ER. The yogurt story - past, present and future. Part. VI. Dairy, Food Envir Sanit. 1991; 11(9): 513-4.
6. Vosniakos F et al. Effect of 131 I on lactic acid microflora of yoghurt. Dairy, Food Envir Sanit. 1991; 8(11): 433-5.
7. Veisseyre R. Lactologia Técnica. Composición, recogida, tratamiento y transformación de la leche. Ed. Acribia, Zaragoza (España) 1988: 288-91.
8. Brandão SCC. Tecnologia da produção industrial de iogurte. Leite & Derivados 1995; 4 (25): 24-38.
9. Alais CH. Ciência de la leche. Principios de Técnica Lechera. Ed. Revertè. Trad. D.A.L. GODINA, Barcelona (España) 1985: 763-7.
10. Çon AH, et al. Effets of different fruits and storage periods on microbiological qualities of fruit flavored yogurt produced in Turkey. J Food Prot 1996; 59(4): 402-6.
11. Manzanares A. Lácteos de alto consumo en Latinoamérica. Tecnologia Láctea Latinoamericana 1996; 5:31-9.
12. Salinas RJ. Higiene quality of commercial yoghurts. Madrid: Alimentaria 1986; 178: 27-30.

13. Porter JWG. Leche y productos lácteos. Trad. J.L.B. ESCALADA, Ed. Acribia, Zaragoza (España) 1981: 71-4.
14. Rasic LLJ, Kurmann JA. Nutritive and health values of dairy foods containing bifidobacteria. In: Rasic LLJ, Kurmann JA. *Bifidobacteria and their role*. Basel: Birkhäuser Verlag 1993: 81-101.
15. Neirotti E, Oliveira AJ. Produção de iogurte pelo emprego de culturas lácticas mistas. *Bol SBCTA* 1988; 22 (½): 1-16.
16. Ainsworth P. Chemistry in the kitchen: milk and milk products. *J Nutr Food Sci*. London 1996; (2): 27-30.
17. Indyk HE, Lawrence R, Broda D. The micronutrient content of bovine whole milk powder: influence of pasture feeding and season. *Food Chem Barking*. 1993; 46: 389-96.
18. Gurgel MSCCA, Oliveira AJ, Camargo R. *Microbiologia do iogurte*. Piracicaba: ESALQ, Depto. de Ciência e Tecnologia de Alimentos 1992: 23.
19. Salado GA, Andrade MO de. Processamento e qualidade nutricional do iogurte. *Boletim Cultural* 1989; 7: 1-35.
20. Tamime AY, Robinson RK. *Yogurt: science and technology*. Oxford: Pergamon press 1985: 431.
21. Deeth HC, Tamime AY. Yogurt: nutritive and therapeutic aspects. *J Food Prot* 1981; 44 (1): 58-96.
22. IOM (Institute of Medicine). Vitamin A. In: Food and Nutrition Board. IOM (Institute of Medicine). *Dietary references intake for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium and zinc*. Washington (DC): National Academy Press. 2001: 82-161.
23. Chagas MHC, Campos FACS, et al. Teratogenia da vitamina A. *Rev Bras Saúde Mater Infant*, July-sept 2003; 3: 247-52.
24. Vieira PAB, Lacerda E, Benzecry EH, Gomes MCS, Costa VM. *Tabela para Avaliação de Consumo Alimentar em Medidas Caseiras*. 4ª ed. Rio de Janeiro: Atheneu; 2001.
25. Monte CMG, Giugliani ERJ. Recomendações para alimentação complementar da criança em aleitamento materno. *J Pediatr*, nov 2004; 80 (5), supl: s131- 41.
26. Philippi ST. *Tabela de Composição de alimentos*. 2ª ed. São Paulo: Coronário: 2002.
27. Penteadó MVC. *Vitaminas: aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos*. São Paulo: Manole; 2003.
28. Ramalho A R, Anjos LA dos. Hipovitaminose A em recém nascidos em duas maternidades públicas do Rio de Janeiro, Brasil. *Cad Saúde Pública*. Rio de Janeiro, oct/dec 1998; 14 (4).
29. McLaren DS, Frigg M. *Manual de ver y vivir sobre los trastornos por deficiencia de vitamina A (VADD)*. Washington (DC): OPS; 1999.
30. Stoltzfus RJ, Underwood BA. Breast-milk vitamin A as an indicator of the vitamin A status of women and infants. *Bull World Health Organ* 1995; 73: 703-11.
31. Christian P, West JRKP, Khatry SK, Katz J, Shrestha SR, Kimbrough-Pradhan E, Leclercq SC, Pokhrel RP. Night blindness of pregnancy in rural Nepal - nutritional and health risks. *Int J Epidemiol* 1998; 27: 231-7.
32. Sapin V, Alexandre MC, Chaïb S, Bournazeau JA, Sauvant P, Borel P, Jacquetin B, Grolier P, Lémery D, Dastugue B, Azaïs-braesco V. Effect of vitamin A status at the end of term pregnancy on the saturation of retinol binding protein with retinol. *Am J Clin Nutr* 2000; 71: 537-43.
33. Giuliano AR, Neilson EM, Kelly BE, Canfield LM. Simultaneous quantitation and separation of carotenoids and retinol in human milk by high-performance liquid chromatography. *Methods Enzymol* 1992; 213: 391-9.
34. Nierenberg DW, Nann SL. A method for determining concentrations of retinol, tocopherol, and five carotenoids in human plasma and tissue samples. *Am J Clin Nutr* 1992; 56: 417-26.
35. Davis JG. Laboratory control of yogurt. *Dairy Industries*; 35(3): 139-44, 170.
36. Machlin LJ. (ed). *Handbook of vitamins*. Marcel Dekker, Inc. 1990: 1-57.
37. Torres EAFS, Okani ET, Roviello A, Guariero EH, Campos NC. Teor em vitamina A, de alguns alimentos distribuídos na cidade de São Paulo. *Hig Aliment* 1998; 12(54): 58-61.

# Características físico-químicas do leite pasteurizado tipo C e leite Ultra Alta Temperatura comercializados na cidade do Rio de Janeiro

Physical- chemical features of pasteurized and Ultra High Temperature milk marketed in the city of Rio de Janeiro

RIALA6/1117

Pedro de M. ARRUDA<sup>1</sup>, Adriano G. da CRUZ<sup>2\*</sup>, Sidney S. ZOELLNER<sup>1</sup>, Ramon SILVA<sup>1</sup>, Michael M.

SOARES<sup>1</sup>, Vanessa S. FERNANDES<sup>1</sup>, Ana Paula G. L. K. GALVÃO<sup>3</sup>

\* Endereço para correspondência: Curso de Farmácia, Universidade Estácio de Sá, RJ, Rua do Bispo, 83 Rio Comprido, Rio de Janeiro/RJ CEP: 20261-063.email: food@globo.com

<sup>1</sup> Graduação em Farmácia, Universidade Estácio de Sá, Campus Rebouças, RJ

<sup>2</sup> Engenheiro Químico, Professor do Curso de Farmácia, Universidade Estácio de Sá, RJ, Doutorando em Tecnologia de Alimentos, FEA/UNICAMP

<sup>3</sup> Farmacêutica Industrial, Professor do Curso de Farmácia da Universidade Estácio de Sá, RJ

Recebido: 31/01/2007 – Aceito para publicação: 21/05/2007

## RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi avaliar as características físico-químicas, dos leites pasteurizados tipo C e Ultra Alta Temperatura (UHT) integral comercializados na cidade do Rio de Janeiro. Foram realizadas as análises de acidez titulável, densidade, gordura, sólidos totais e sólidos não gordurosos em 200 amostras, distribuídas igualmente por leite pasteurizado tipo C integral (100) e leite UHT integral (100). Em ambos os produtos, com exceção dos sólidos totais em que 100% das amostras estavam em conformidade, todas as amostras se apresentaram não-conformes com pelo menos um dos parâmetros analisados com relação a legislação vigente. Os dados sugerem a necessidade de controle da qualidade de matéria-prima por parte dos laticínios, além de um monitoramento constante pelos Órgãos fiscalizadores, para garantir produtos de melhor qualidade para o consumidor.

**Palavras-chave.** leite pasteurizado, leite UHT, identidade, qualidade, legislação.

## ABSTRACT

The aim of this investigation was to evaluate the physical and chemical features of 100 pasteurized C milk and 100 Ultra High Temperature (UHT) whole milk samples marketed in Rio de Janeiro city, Brazil. It was performed analyses of titratable acidity, density, fat, and total solids and total non-fat solid contents in all of 200 milk samples. Excepting the total solids content in both milk products, which was 100% in accordance with the Brazilian Legislation, all of the analyzed samples were in unconformity for at least one of other physic-chemical parameters according to above cited legislation. These data imply in establishing quality control strategies, and a continuous monitoring by the Sanitary Surveillance to guarantee improved milk quality for consumers.

**Key words.** pasteurized milk, UHT milk, identity, quality.

## INTRODUÇÃO

O leite é um dos alimentos mais completos existentes, sendo composto por elementos nutritivos como proteínas, vitaminas, carboidratos, gorduras e sais minerais<sup>1</sup>. Dessa forma, tem seu consumo recomendado na dieta de todas as faixas etárias, devido à presença de seus constituintes nutritivos e energéticos estarem de forma assimilável, o tornando, ao lado do leite humano, um dos alimentos mais indicados ao combate da subnutrição protéica de lactentes, que é principal responsável pelo elevado índice de mortalidade infantil na Ásia, África e América Latina<sup>2</sup>.

A preocupação com a autenticidade dos alimentos tornou-se um problema global, sendo cada vez mais importante detectar a introdução no mercado de produtos fraudulentamente rotulados e de produtos de qualidade inferior, quer por razões econômicas, quer por razões de saúde pública<sup>3</sup>. Dessa forma torna-se necessário a fiscalização contínua para verificar se os produtos atendem as especificações estabelecidas, para que não nenhum tipo de dano ao consumidor.

O objetivo deste trabalho é avaliar as características físico-químicas do leite pasteurizado tipo C e Ultra Alta Temperatura (UHT) integral comercializados na cidade do Rio de Janeiro.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Amostragem

Foram utilizadas 10 diferentes marcas de leite pasteurizado tipo C integral (denominados A, B, C, D, E, F, G, H, I, J) e leite UHT integral (denominados L, M, N, O, P, Q, R, S, T, U), respectivamente, sendo 10 amostras de mesmo lote para cada marca, perfazendo um total de 100 amostras de UHT e 100 amostras de pasteurizado tipo C. As amostras foram adquiridas na cidade do Rio de Janeiro no período de março a junho de 2005 e provenientes de unidades industriais localizadas no estado do Rio de Janeiro, Minas Gerais, Rio Grande do Sul e São Paulo.

As análises foram realizadas no laboratório de Biociências e Alimentos da Universidade Estácio de Sá, Rio de Janeiro, localizado no bairro do Rio Comprido. Antes da realização dos ensaios, as amostras de leite UHT foram mantidas em temperatura ambiente e as amostras de leite pasteurizado sob refrigeração.

### Procedimento Analítico

As amostras de leite foram submetidas a análises de acidez titulável, densidade, gordura, sólidos totais (ST), sólidos não-gordurosos (SNG), sendo estas efetuadas em triplicata. Todos os ensaios foram executados de acordo com as metodologias preconizadas na Legislação Brasileira, a saber,

Instrução Normativa nº68, de 12 de dezembro de 2006, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento<sup>4</sup>.

### Análise Estatística

Foram realizadas medidas de estatística descritiva para cada marca de leite pasteurizado e leite UHT, a saber: média, desvio padrão e frequência de amostras conformes e não-conformes para cada parâmetro analisado em relação ao estipulado pela legislação vigente<sup>5,6</sup>. Adicionalmente, para verificação de diferenças significativas entre as amostras foram realizadas as análises de Variância (ANOVA) e o teste de Tukey. Probabilidades  $p < 0,05$  foram consideradas significativas.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das análises físico-químicas das amostras de leite pasteurizado tipo C e leite UHT, comercializados na cidade do Rio de Janeiro, estão apresentados na tabela 1. Para o leite pasteurizado tipo C, acidez titulável variou de 1,730 (marca A) a 1,245 % g/mL ácido láctico (marca H), sendo registradas variações significativas nas marcas E, F, G e H em relação às outras marcas e diferentes entre si também ( $p < 0,05$ ) enquanto para densidade os valores variaram de 1,0360 (marca J) a 1,0369 g/mL (marca I) sem diferença significativa entre as amostras ( $p > 0,05$ ). Para gordura observaram-se valores de 2,8 (marca F) a 3,7% (marca H), sendo que o teor da marca F foi significativamente menor em relação às outras marcas ( $p < 0,05$ ); para sólidos totais, os valores variaram de 12,0% (marca F) a 13,7% (marca I), sendo as marcas J e F significativamente maiores que as outras ( $p < 0,05$ ). Para os sólidos não-gordurosos, não foi observada diferença significativa entre as amostras, sendo os extremos observados entre 9,02 (marca G) e 10,45 (marca C). Para o leite UHT integral, a acidez titulável variou de 1,192 – (marca R) a 1,790 % g/mL ácido láctico (marca P), sendo a marca R apresentando valor significativamente menor ( $p < 0,05$ ) enquanto para densidade os valores variaram de 1,0380 (marca P) a 1,0341 g/mL (marca U) sendo observadas variações significativas nas marcas P e U em relação às demais marcas ( $p < 0,05$ ). Para gordura observou-se valor de 2,7 (marca Q) a 3,6% (marca M), sendo a marca Q significativamente menor em relação às outras marcas ( $p < 0,05$ ); para sólidos totais, valores variaram de 12,2 (marca Q) a 13,6% (marca M), sendo também as marcas U e Q significativamente maiores que às outras ( $p < 0,05$ ) e para sólidos não gordurosos foi observada diferença significativa entre as amostras nas marcas P e U ( $p < 0,05$ ), sendo os extremos também observados para esse parâmetro entre as marcas 9,0 (marca P) e 10,5% (marca U).

**Tabela 1.** Resultados de análises físico-químicas do leite pasteurizado tipo C e leite UHT, comercializado na cidade do Rio de Janeiro.

		Análises Físico-Químicas									
		Leite Pasteurizado tipo C					Leite UHT				
Marcas		Acidez (% ac.lac.)	D (g/mL)	ST (%)	G (%)	ESD (%)	Acidez (% ac.lac.)	D (g/mL)	ST (%)	G (%)	ESD (%)
A	L	1,730 <sup>a</sup> (0,02)	1,0361 <sup>a</sup> (0,0000)	12,6 <sup>a</sup> (0,28)	3,1 <sup>a</sup> (0,20)	9,2 <sup>a</sup> (0,23)	1,729 <sup>a</sup> (0,07)	1,0359 <sup>a</sup> (0,0001)	12,8 <sup>a</sup> (0,37)	3,0 <sup>a</sup> (0,21)	9,8 <sup>a</sup> (0,26)
B	M	1,723 <sup>b</sup> (0,05)	1,0364 <sup>a</sup> (0,0002)	13,4 <sup>a</sup> (0,38)	3,0 <sup>a</sup> (0,17)	10,2 <sup>a</sup> (0,10)	1,470 <sup>a</sup> (0,05)	1,0369 <sup>a</sup> (0,0003)	13,6 <sup>a</sup> (0,36)	3,4 <sup>a</sup> (0,25)	10,17 <sup>a</sup> (0,08)
C	N	1,688 <sup>a</sup> (0,04)	1,0362 <sup>a</sup> (0,0003)	13,1 <sup>a</sup> (0,17)	3,0 <sup>a</sup> (0,12)	10,5 <sup>a</sup> (0,08)	1,548 <sup>a</sup> (0,03)	1,0369 <sup>a</sup> (0,0003)	13,1 <sup>a</sup> (0,15)	3,0 <sup>a</sup> (0,11)	10,09 <sup>a</sup> (0,08)
D	O	1,602 <sup>a</sup> (0,03)	1,0367 <sup>a</sup> (0,0004)	13,2 <sup>a</sup> (0,21)	3,3 <sup>a</sup> (0,16)	10,2 <sup>a</sup> (0,16)	1,548 <sup>a</sup> (0,05)	1,0365 <sup>a</sup> (0,0005)	13,3 <sup>a</sup> (0,21)	3,3 <sup>a</sup> (0,13)	10,04 <sup>a</sup> (0,14)
E	P	1,700 <sup>b</sup> (0,04)	1,0364 <sup>b</sup> (0,0004)	13,6 <sup>a</sup> (0,27)	3,5 <sup>a</sup> (0,21)	10,0 <sup>a</sup> (0,02)	1,790 <sup>a</sup> (0,08)	1,0380 <sup>b</sup> (0,0002)	13,5 <sup>a</sup> (0,25)	3,1 <sup>a</sup> (0,26)	10,37 <sup>a</sup> (0,04)
F	Q	1,563 <sup>b</sup> (0,12)	1,0363 <sup>a</sup> (0,0006)	12,0 <sup>b</sup> (0,60)	2,8 <sup>b</sup> (0,34)	9,6 <sup>b</sup> (0,18)	1,597 <sup>a</sup> (0,12)	1,0352 <sup>a</sup> (0,0006)	12,2 <sup>b</sup> (0,44)	2,7 <sup>b</sup> (0,34)	9,59 <sup>b</sup> (0,17)
G	R	1,193 <sup>c</sup> (0,01)	1,0361 <sup>a</sup> (0,0001)	13,3 <sup>a</sup> (0,27)	3,1 <sup>a</sup> (0,21)	9,0 <sup>a</sup> (0,19)	1,192 <sup>b</sup> (0,06)	1,0359 <sup>a</sup> (0,0003)	13,2 <sup>a</sup> (0,22)	3,3 <sup>a</sup> (0,22)	9,89 <sup>a</sup> (0,09)
H	S	1,245 <sup>c</sup> (0,09)	1,0362 <sup>a</sup> (0,0004)	13,5 <sup>a</sup> (0,20)	3,7 <sup>a</sup> (0,13)	10,1 <sup>a</sup> (0,10)	1,734 <sup>a</sup> (0,08)	1,0367 <sup>a</sup> (0,0004)	13,5 <sup>a</sup> (0,24)	3,4 <sup>a</sup> (0,17)	10,10 <sup>a</sup> (0,13)
I	T	1,745 <sup>a</sup> (0,04)	1,0369 <sup>a</sup> (0,0002)	13,7 <sup>a</sup> (0,03)	3,0 <sup>a</sup> (0,10)	10,2 <sup>a</sup> (0,01)	1,650 <sup>a</sup> (0,05)	1,0370 <sup>a</sup> (0,0003)	13,2 <sup>a</sup> (0,07)	3,1 <sup>a</sup> (0,09)	10,10 <sup>a</sup> (0,01)
J	U	1,702 <sup>a</sup> (0,07)	1,0360 <sup>a</sup> (0,0001)	12,4 <sup>b</sup> (0,28)	3,2 <sup>a</sup> (0,40)	9,3 <sup>b</sup> (0,07)	1,528 <sup>a</sup> (0,06)	1,0341 <sup>b</sup> (0,0003)	12,4 <sup>b</sup> (0,24)	3,0 <sup>a</sup> (0,42)	9,40 <sup>b</sup> (0,07)

\*Resultados médios de análises realizadas em triplicata, com desvio padrão entre parênteses. ac. lac: ácido láctico, D=densidade, G=gordura, ST=sólidos totais; ESG=sólidos não gordurosos. Letras diferentes na mesma coluna denotam significância estatística pelo teste de Turkey ( $p < 0,05$ ).

O teste de acidez titulável detecta o aumento da concentração de ácido láctico, que é formado pela fermentação dos açúcares do leite. Outros componentes acídicos do leite podem interferir na acidez, entre eles destacam-se citratos, fosfatos e proteínas. Assim, a análise do leite pode apresentar resultados individuais variados, em função da presença destes componentes, e não do ácido láctico<sup>7</sup>. Os valores médios encontrados, tanto para as amostras de leite pasteurizado tipo C, quanto para as amostras de leite UHT, estavam abaixo dos padrões estipulados pela legislação, que estipula uma variação de 0,14 a 0,18g ácido láctico/ 100mL para ambos os tipos de leite, podendo então sugerir suspeita de adição de neutralizantes ou substâncias alcalinas<sup>8</sup>.

A variação da densidade do leite é decorrente da presença de vários componentes, diluídos ou não na água, os quais apresentam densidades variáveis, sendo esses responsáveis por constituir o leite. De todos, a gordura é o elemento que possui densidade menor do que a da água, já os demais componentes apresentam densidade acima de 1.0 o que pode indicar, nesse caso, que valores abaixo desse nível podem significar adição de água, diluição do leite. No caso dos resultados encontrados acima dos padrões normais,

pode sugerir uma provável fraude por desnate do produto, teor baixo de gordura<sup>7</sup>.

A gordura é o componente do leite que possui maior variabilidade. Sendo o teor de fibra da dieta da vaca ou a relação volumoso/concentrado, que mais interfere no percentual de gordura. Com isso, o teor de fibra da dieta, ou a relação volumoso/concentrado, é diretamente proporcional ao teor de gordura do leite. Assim, quanto maior o teor de fibra da dieta, maior o teor de gordura do leite, devido à variação de ácidos graxos voláteis produzidos no rúmen, em função da diferença da dieta, isso levando em conta a matéria-prima que é o leite cru<sup>8</sup>.

Essas variações em relação ao teor de gordura sugerem que a etapa de padronização do leite não está sendo executada de forma correta pelas indústrias, por desgaste do equipamento ou ainda por sua operação deficiente, refletindo que são necessárias melhorias nos programas de Boas Práticas de Fabricação, na medida em que o controle dos parâmetros operacionais é um item obrigatório em sistemas de qualidade na indústria de alimentos.

Os resultados encontrados neste estudo também sugerem que não ocorreu variação do teor de proteína do leite, uma vez

que a variação do teor de proteína está ligada diretamente com a variação dos sólidos não gordurosos, o que torna importante este teste para avaliar o rendimento industrial do produto utilizado como matéria-prima<sup>8</sup>.

A Tabela 2 apresenta o nível de conformidade das amostras em relação aos padrões estabelecidos pela legislação vigente<sup>5</sup> para as análises de acidez titulável (% ácido láctico), densidade, gordura e sólidos não gordurosos para o leite pasteurizado tipo C e Ultra Alta Temperatura integral.

As análises do leite pasteurizado tipo C obtiveram resultados de 20% de amostras abaixo dos padrões aceitáveis para o teste de acidez titulável, assim como no teste de densidade 100% das amostras estavam não-conformes. Com relação ao teor de gordura, o percentual de não-conformidade foi de 70%, já para sólidos não gordurosos (ESD) todas as amostras apresentaram-se em conformidade. Para o leite UHT, apenas 10% das amostras para o teste de acidez titulável ficaram fora dos padrões estabelecidos; já para teste de densidade, os percentuais de não-conformidades totalizaram 90%. Quanto ao teor de gordura, 10% das amostras estavam fora das especificações, e com relação ao teste de extrato seco desengordurado, 100% das amostras estavam conforme. Não são mencionados padrões mínimos para sólidos totais preconizados pela legislação brasileira<sup>5,6</sup>.

Os resultados encontrados neste trabalho são semelhantes aos estudos realizados em distintas regiões do Brasil, o que justifica que a não conformidade destes parâmetros físico-químicos torna-se um problema de âmbito nacional.

Albuquerque et al<sup>9</sup> analisaram o leite pasteurizado tipo C comercializado em Belo Horizonte (MG), e observaram que para as análises de acidez titulável 46,66% estavam fora dos padrões, todas as amostras analisadas para a densidade estavam conforme. Quanto ao teor de gordura, 3,33% estavam abaixo dos padrões preconizados. Com relação ao teor de sólidos não-gordurosos, todas as amostras analisadas encontraram-se conforme.

Lamaita et al<sup>10</sup> observaram em relação ao leite pasteurizado tipo C beneficiado em Minas Gerais, que 37,5% das análises de acidez titulável encontravam-se fora dos padrões estabelecidos; quanto ao teor de gordura e de sólidos não

gordurosos, 5% das amostras estavam fora das normas preconizadas.

Oliveira et al<sup>11</sup> observaram que 2,65% das amostras de um dos laticínios analisados estavam em relação ao teor de gordura, abaixo dos limites permitidos pela legislação, em seu estudo de leite UHT comercializado na cidade de Belém (PA).

Lima, Oliveira e Xavier<sup>12</sup> analisaram leite pasteurizado tipo C comercializado no município de Betim (MG), obtendo 42,9% das amostras analisadas em relação à acidez titulável fora dos padrões estabelecidos pela legislação, 26,2% das amostras de densidade e de teor de gordura em desacordo com a legislação e para sólidos não gordurosos, 71,6% das amostras analisadas estavam não-conformes.

Ruela et al<sup>13</sup>, avaliaram o leite pasteurizado tipo C e UHT comercializados em Minas Gerais (MG) e encontraram no teste de acidez titulável, para o leite pasteurizado tipo C 11% e UAT 13% das amostras fora do especificado; e com relação ao teor de gordura 2,6% das amostras de leite UAT encontra-se em desacordo com a legislação. Já para o parâmetro sólido não-gordurosos, foi constatado que 13% das amostras de leite UAT estavam fora dos padrões preconizados.

Garrido et al<sup>14</sup> avaliaram leite pasteurizado proveniente de mini e micro-usinas de beneficiamento da região de Ribeirão Preto (SP), verificando que 15,5% das amostras do leite pasteurizado tipo C estavam fora dos padrões sugeridos pela legislação.

## CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho são similares a diversos estudos envolvendo a qualidade do leite pasteurizado tipo C e UHT integral realizados em diversas regiões no Brasil, o que sugere que o problema de identidade destes produtos é uma questão nacional, indicando a necessidade das indústrias em controlarem a qualidade da matéria-prima e o processamento industrial. Reforça, ainda a necessidade de execução de um monitoramento constante pelos Órgãos fiscalizadores no sentido de oferecer um produto dentro dos padrões especificados pela legislação.

**Tabela 2.** Adequação das amostras a Instrução Normativa n.51 de 18/09/2002.

Parâmetros*	Leite Pasteurizado Tipo C		Leite UHT	
	Conformes	Não-Conformes	Conformes	Não-Conformes
Acidez titulável	80%	20%	90%	10%
Densidade	0%	100%	10%	90%
Gordura	30%	70%	90%	10%
ESG	100%	0%	0%	100%

\* ESG = sólidos não gordurosos

## REFERENCIAS

1. Rodrigues GS et al. Análise de Produtos Lácteos realizados no Laboratório de Análises de Alimentos e Águas da Faculdade de Farmácia e Bioquímica/UFJF em 2003. *Rev Inst Lat Cândido Tostes* 2004, 59 (339): 167-170.
2. Ávila CR, Gallo CR Pesquisa de *Salmonella spp.* em leite cru, leite pasteurizado tipo c e queijo “minas frescal” comercializado no município de Piracicaba – SP. *Sci Agríc* 1996, 53(1):159 –163.
3. Veloso ACA et al. Detecção de adulterações em produtos alimentares contendo leite e/ou proteínas lácteas. *Quim Nova* 2002, 25(4): 609-15.
4. Brasil, Instrução Normativa nº 68 de 12 de dezembro de 2006 da Secretaria de Defesa Agropecuária. Do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Poder Executivo, Brasília, DF, 2006.
5. Brasil, Instrução Normativa nº 51 de 18 de setembro de 2002 da Secretaria de Defesa Agropecuária. Do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Poder Executivo, Brasília, DF, 2002.
6. Brasil, Portaria Nº 146, de 07 de março de 1996 da Secretaria de Defesa Agropecuária. Do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Poder Executivo, Brasília, DF, 1996.
7. Speer E. *Lactologia Industrial*. 2ª ed. Zaragoza (Espanha): Acribia; 1991.
8. Oliveira CAF, Fonseca LFL., Germano PML. Aspectos relacionados à produção, que influenciam a qualidade do leite. *Hig Aliment* 1999; 13(62): 10-6.
9. Albuquerque L et al. Avaliação da Qualidade Físico-Química de Leite Pasteurizado Tipo C Comercializado em Belo Horizonte – MG. Resumos do 22º Congresso Nacional de Laticínios. Juiz de Fora: Empresa Mineira de Pesquisa Agropecuária. 2005.
10. Lamaita HC et al. Segurança Alimentar de Leite Pasteurizado Tipo C Beneficiado em Minas Gerais Avaliado por parâmetros microbiológicos e físico-químicos *Rev Inst Lat Cândido Tostes* 2002; 57(327): 297-83.
11. Oliveira MSF, Silva IQ, Waughon TGM, Pinto SV. Análises Físico-Químicas em Leite UHT Comercializados na Cidade de Belém (PA). Resumos do 20º Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Curitiba: Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2006.
12. Lima FG, Oliveira AMG, Xavier E. Qualidade Microbiológica e Físico-Química do Leite Tipo “C” Pasteurizado, Comercializado no Município de Betim, MG. Resumos do 19º Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Recife: Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2004.
13. Ruela ICA et al. Avaliação Físico-Química do Leite Pasteurizado e UAT Comercializados em Minas Gerais. XIX Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Resumos do 19º Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Recife: Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2004.
14. Garrido NS et al. Avaliação da Qualidade Físico-Química e Microbiológica do Leite Pasteurizado Proveniente de Mini e Micro-Usinas de Beneficiamento da Região de Ribeirão Preto (SP). *Rev Inst Adolfo Lutz* 2001;60 (1): 141-6.

# Composição do leite de éguas da raça Mangalarga Marchador

## Composition of Mangalarga Marchador mare milk

RIALA6/1118

Alline de Paula REIS<sup>\*</sup>, Albenones José de MESQUITA<sup>2</sup>, Carlos Henrique Gonçalves MOREIRA<sup>1</sup>, Edmê Aparecida Fleury CURADO<sup>1</sup>, Ediane Batista da SILVA<sup>1</sup>, Edmar Soares NICOLAU<sup>2</sup>

\* Endereço para correspondência: Alameda Contorno, Chácara Planície, Jardim Pompéia Goiânia/ Goiás, CEP 74690-020, telefone: (62)3205-1235, email: allinepr@ yahoo.fr.

<sup>1</sup> Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás, Goiânia/ Goiás.

<sup>2</sup> Centro de Pesquisa em Alimentos Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária, Departamento de Medicina Veterinária.

UFG - Campus II - Escola de Veterinária.

Recebido: 18/08/2006 – Aceito para publicação: 18/04/2007

Este artigo é parte da dissertação de mestrado da primeira autora apresentado à Escola de Veterinária/Universidade Federal de Goiás, Goiânia/Goiás.

### RESUMO

O objetivo deste estudo foi determinar a composição do leite de éguas da raça Mangalarga Marchador, com a finalidade de que estes dados possam contribuir para o estudo da aplicação deste leite na alimentação humana. Foram utilizadas 31 éguas oriundas de quatro haras localizados no estado de Goiás, heterogêneas quanto ao manejo e nutrição. As éguas se apresentavam entre 15 e 120 dias de lactação. As 225 amostras coletadas foram analisadas em triplicata quanto à concentração de proteína, gordura, lactose e extrato seco total (EST) por meio de técnica de infravermelho médio. Houve diferença significativa entre as amostras de leite de éguas de diferentes haras para a proteína, gordura e extrato seco total ( $p < 0,05$ ). A lactose não diferiu entre os leites de éguas de diferentes haras ( $p < 0,05$ ) sugerindo a baixa influência da alimentação sobre este parâmetro. As concentrações médias de proteína (2%) e lactose (6,57%) foram semelhantes, a de gordura (0,63%) inferior e o EST (10,37%), intermediário aos demais valores encontrados na literatura. O leite de éguas Mangalarga Marchador apresenta composição semelhante ao leite de outras raças equínas. A alimentação, o manejo e o comportamento fisiológico de cada animal podem ter influenciado nestes resultados.

**Palavras-chave.** composição do leite, égua, infravermelho médio, Mangalarga Marchador, qualidade nutricional.

### ABSTRACT

The aim of the present investigation was to determine the composition of Mangalarga Marchador mare milk, in order to make rise of these data to assess the potentiality of this lactic product to be suitable for human consumption. Thirty- one mares from four stud-farms located in Goiás state were used. These stud-farms were heterogeneous regarding to animal handling, management, and nutrition systems; and the mares were at 15 to 120 days of lactation. The total of 225 collected milk samples were analyzed in triplicate for determining the concentrations of protein, fat, lactose and total solids (TS) by means of mid infrared ray technique. Significant differences in protein, fat and TS concentrations ( $p < 0.05$ ) in mare milks from four stud-farms were observed, however no difference in lactose contents were found among milks samples from mares raised in different stud-farms ( $p < 0.05$ ). These findings suggest that there is a low influence of nutrition on this mare milk sugar. Comparing to the values reported in other studies, the average concentration found in the present investigation for protein (2%) and sugar (6.57%) were similar; fat (0.63%) was lower, and TS (10.37%) was in an intermediate concentration. These contents variations in mares milk samples composition might be influenced by food, animal handling and management system, and by the physiologic response of each animal.

**Key words.** Mangalarga Marchador, mare, milk composition, mid infrared ray, nutritional quality.

## INTRODUÇÃO

Estudos sobre a composição do leite de éguas têm demonstrado sua grande semelhança ao leite humano<sup>1</sup>. Em países como França e Alemanha, este produto tem sido preconizado como sucedâneo do leite materno na alimentação de recém-nascidos e pré-maturos<sup>1,2</sup>. Pesquisas russas apresentaram resultados animadores quanto à sua utilização como alimento funcional em enfermidades como hepatopatias e úlceras gástricas<sup>3,4</sup>. Estudo realizado na Itália<sup>5</sup> demonstrou que apenas 4% das crianças alérgicas ao leite bovino, apresentam-se alérgicas ao leite equino.

No Brasil, são realizados poucos estudos sobre a qualidade do leite equino e os mesmos estão principalmente voltados à nutrição do potro<sup>6</sup> ou à sanidade da glândula mamária<sup>7,8</sup>. Entretanto, a égua é boa produtora de leite, produzindo o equivalente a 2,8 - 3% do peso vivo por dia e a comercialização deste produto, de forma racional e higiênica, pode representar um incremento na receita dos haras brasileiros, além de contribuir de forma positiva ao tratamento de doenças em humanos, como já acontece na Europa<sup>9</sup>.

Para viabilizar a comercialização, bem como melhorar a exploração zootécnica do leite equino no Brasil, torna-se necessário conhecer suas características básicas, principalmente em rebanhos formados por raças genuinamente brasileiras, uma vez que estas são predominantes no plantel nacional<sup>10</sup>.

Os principais componentes do leite são: água, proteína, gordura e lactose. As concentrações de proteína, gordura e lactose são utilizadas para determinar a sua composição, juntamente com o Extrato Seco Total (EST), que representa todos os componentes sólidos deste produto e traduz a concentração real dos componentes do leite, eliminando a influência do teor de água<sup>11</sup>.

Estes parâmetros básicos para a avaliação da qualidade do leite podem variar sob influência de diversos fatores fisiológicos como idade, paridade, peso vivo das lactantes, dieta, estágio da lactação e condições ambientais<sup>6</sup>. A presença de patologias, sendo a mastite<sup>12</sup> a mais importante, constitui outra importante fonte de alteração de sua qualidade.

Em condições normais, a proteína do leite é sintetizada na glândula mamária a partir de compostos presentes no sangue, principalmente aminoácidos<sup>13</sup>. O perfil protéico do leite equino é desejado na alimentação humana devido à estrutura das micelas, que o torna fisiologicamente mais digerível do que o leite bovino<sup>14,15</sup>. Além disso, o baixo teor de proteínas no leite equino evita a sobrecarga renal de solutos, principalmente em crianças<sup>5</sup>.

Os açúcares do leite equino são representados essencialmente pela lactose e, em menores quantidades, outros sacarídeos<sup>16</sup>. A elevada concentração de lactose no leite equino aumenta a sua palatabilidade e estimula a absorção intestinal de cálcio, o que pode representar um fator favorável à calcificação dos ossos durante os primeiros meses de vida do potro e de crianças<sup>5</sup>. Além disso, a lactose contém o fator

*bifidus* que melhora a qualidade da flora intestinal e provoca a morte de microrganismos patogênicos no intestino<sup>5</sup>. Não foram encontrados dados na literatura sobre os efeitos da lactose do leite equino em indivíduos intolerantes à lactose do leite bovino.

Em relação ao teor lipídico, o leite equino apresenta características vantajosas para a alimentação humana. Entre essas, pode-se destacar a baixa concentração de gordura e sua excelente qualidade, com alto nível de ácidos graxos poliinsaturados e baixa concentração de colesterol<sup>17</sup>.

Existem vários métodos de análise dos compostos lácteos e um dos mais usados atualmente é o método do infravermelho médio. Este método se baseia na absorção diferencial de ondas infravermelhas pelos diferentes componentes do leite sendo que a alíquota colhida pelo equipamento passa por um sistema óptico que mede a energia absorvida em um comprimento de onda específico da região infravermelha.

A análise dos componentes básicos do leite pelo método do infravermelho médio apresenta vantagens em relação aos métodos tradicionais devido à alta precisão centesimal relacionada a uma leitura eletrônica altamente sensível às variações de comprimento de onda<sup>18</sup> e por descartar a subjetividade da leitura humana. Além disso, este método permite mais agilidade na avaliação das amostras, uma vez que os equipamentos podem realizar até 300 análises por hora<sup>18</sup>. Outra vantagem desse método é a possibilidade de se realizar todas as análises com pequena quantidade de amostra<sup>18</sup>. Esta característica é especialmente importante na análise do leite de éguas onde, devido à baixa capacidade de armazenamento do úbere, em média 2L<sup>19</sup>, o volume obtido por ordenha pode mesmo ser insuficiente para a realização das análises básicas pelos métodos tradicionais.

Considerados os aspectos mencionados, o objetivo deste trabalho foi determinar a composição do leite de éguas da raça Mangalarga Marchador (proteína, gordura, lactose e EST) no estado de Goiás, utilizando o Método do Infravermelho Médio.

## MATERIAL E MÉTODOS

Utilizaram-se 31 éguas da raça Mangalarga Marchador com idades variando entre três e dezenove anos escolhidas aleatoriamente em quatro diferentes haras, localizados em um raio de até 120 km de distância de Goiânia, Goiás. Foram colhidas 225 amostras obtidas entre o décimo quinto e o centésimo vigésimo dias de lactação, no período compreendido entre os meses de outubro de 2004 e fevereiro de 2005.

Os quatro haras eram heterogêneos quanto ao sistema de manejo e nutrição. O haras 1 possuía menor área e pior infra-estrutura, sendo que a alimentação de suas éguas baseava-se em forrageira de baixa qualidade. O haras 2 era muito bem estruturado e suas éguas eram criadas em

sistema extensivo, no entanto, com forrageira de excelente qualidade. Os haras 3 e 4 possuíam estruturas intermediárias e sistemas de manejo e alimentação diferentes. O haras 3 utilizava forrageiras de qualidade mediana e fornecia diariamente, no piquete, concentrado com 13% de proteína. O haras 4 utilizava forrageira de qualidade mediana a insatisfatória e fornecia milho aos seus animais diariamente, pela manhã, em estábulo.

Foram utilizadas seis éguas oriundas do haras 1, nove do haras 2 e oito éguas dos haras 3 e 4 respectivamente. Todos os haras ofereciam condições satisfatórias para a obtenção do leite de forma higiênica. Foi esquematizado um rodízio para que houvesse sempre três éguas separadas dos potros permitindo, assim, que toda ordenha fosse realizada entre duas e três horas após a apartação.

A higienização dos tetos das éguas foi realizada a cada ordenha em duas fases: na primeira, utilizava-se gaze embebida em álcool 70°GL, principalmente entre os tetos; na segunda, utilizava-se papel-toalha também embebido em álcool 70°GL, nas regiões laterais da glândula mamária e nos tetos. As mãos dos ordenhadores foram cuidadosamente lavadas com água e detergente neutro, secadas e posteriormente higienizadas com *spray* de álcool 70°GL, seguido de secagem com papel toalha também embebido em álcool 70°GL, a cada nova ordenha.

Após desprezar os primeiros jatos e realizar a ordenha completa, a amostra foi transferida para frasco de vidro ambar, com capacidade para um litro. Neste recipiente, era feita a homogeneização do leite por agitação suave. Imediatamente após a homogeneização era separada uma amostra de 45mL em frasco plástico contendo um comprimido conservante de bronopol (2-bromo-2-nitropropano-1,3-diol na concentração de 8 mg de bronopol)<sup>20</sup>. Todas as amostras eram identificadas, acondicionadas em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável e transportadas aos laboratórios do Centro de Pesquisa em Alimentos da Escola de Veterinária - UFG

(CPA/EV/UFG), onde foram analisadas. Previamente à análise das amostras, o aparelho era calibrado com leite bovino, uma vez que o aparelho não possui opção específica para análise de leite eqüino.

As amostras foram testadas em triplicata e foram determinados os parâmetros: gordura, proteína, lactose e EST pelo método do infravermelho médio<sup>21</sup>. Para estas análises utilizavam-se as amostras de 45mL de leite armazenado em frasco contendo o 8mg do conservante bronopol (2-bromo-2-nitropropano-1,3-diol) (Bronopol, D&F Control Systems, Dublin, USA)<sup>20</sup>, mantidas sob refrigeração por um período de até dois dias, após o qual eram retiradas do refrigerador, mantidas em temperatura ambiente e posteriormente aquecidas em banho-maria à temperatura de 40°C, durante 15 minutos, de onde eram encaminhadas ao Milkoscan 4000 (Foss Electric A/S. Hillerod, Denmark).

Para a análise estatística, foi realizada a média das três leituras obtidas em cada amostra para determinar o valor da mesma. Em seguida, os dados foram submetidos à análise de variância pelo Teste F e os resultados entre haras foram comparados pelo teste de Duncan com significância de 1% e 5%<sup>22</sup>.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo, foram inicialmente comparadas as variações dos resultados encontradas para cada componente do leite equino (proteína, gordura, lactose e EST) entre os quatro haras (Tabela 1). Os resultados encontrados foram interpretados em relação ao manejo e alimentação dos animais observados durante o estudo. Posteriormente, os dados foram reunidos em uma tabela de médias gerais (Tabela 2) para discutir os resultados encontrados neste estudo para os parâmetros de composição do leite de éguas da raça Mangalarga Marchador em relação aos resultados encontrados na literatura.

**Tabela 1.** Análise de variância dos teores de proteína (PRO), gordura (GOR), lactose (LAC) e extrato seco total (EST) encontrados no leite de éguas, de quatro diferentes haras do estado de Goiás, no período de outubro de 2004 a fevereiro de 2005.

Haras	VARIÁVEIS			
	PRO %	GOR %	LAC %	EST %
1	1,87 <sup>a</sup>	0,59 <sup>ab</sup>	6,59 <sup>a</sup>	10,22 <sup>a</sup>
2	2,08 <sup>b</sup>	0,66 <sup>ab</sup>	6,48 <sup>a</sup>	10,37 <sup>b</sup>
3	2,09 <sup>b</sup>	0,54 <sup>b</sup>	6,60 <sup>a</sup>	10,39 <sup>b</sup>
4	1,91 <sup>a</sup>	0,69 <sup>a</sup>	6,62 <sup>a</sup>	10,42 <sup>b</sup>

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si. (P<0,05)

Haras 1: 40 amostras; Haras 2: 69 amostras; Haras 3: 60 amostras; Haras 4: 56 amostras

**Tabela 2.** Concentração de proteína (PRO), gordura (GOR), lactose (LAC) e extrato seco total (EST) do leite de éguas Mangalarga Marchador, ordenhadas entre os meses de outubro de 2004 e fevereiro de 2005 no estado de Goiás.

<b>Quadrado Médio</b>					
<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>PRO %</b>	<b>GOR %</b>	<b>LAC %</b>	<b>EST %</b>
<b>Haras</b>	3	0,753**	0,317**	0,320**	0,457*
<b>Resíduo</b>	253	0,085	0,117	0,610	0,164
<b>CV (%)</b>		14,570	54,380	3,760	3,900
<b>X<sub>G</sub></b>		2,000	0,630	6,570	10,370

FV: Fonte de variação; GL: Grau de liberdade; CV: Coeficiente de variação; X<sub>G</sub>: Média geral de 225 observações; \* e \*\*: Significativos a 5% e 1% respectivamente.

Como pode ser observado na Tabela 1, o leite proveniente dos Haras 1 e 4 apresentou concentração de proteína significativamente inferior às dos demais haras (P<0,05). No Haras 1, este fato pode ser explicado pela alimentação à base de forrageira, corroborando com a afirmação de que a alimentação baseada somente em pastagem pode resultar em redução da concentração de proteína no leite<sup>26</sup>.

Alimentação e estágio da lactação podem ter influenciado a média da proteína encontrada no Haras 4, pois a complementação da pastagem através do fornecimento diário de milho pode ter fornecido um incremento de energia suficiente para provocar o aumento do volume de leite produzido sem aumento proporcional da quantidade de proteína secretada, determinando o que é conhecido por efeito de diluição<sup>(23,24,26)</sup>. Além disso, algumas de suas éguas começaram a ser ordenhadas a partir de 30 dias de lactação. Segundo<sup>27,28</sup> o estágio da lactação é o fator que mais influencia na concentração de proteína do leite equino, pois o teor de proteína diminui rapidamente até a segunda semana de lactação e em seguida continua decrescendo de forma mais lenta até o final do segundo mês.

A comparação da concentração de gordura entre os haras (Tabela 1), evidenciou que o leite proveniente do haras 3 apresentou a menor concentração (0,54%) (P<0,05). O haras 4 apresentou o maior teor de gordura no leite (0,69%), sendo significativamente diferente (P<0,05) do Haras 3. A ligeira elevação do teor de gordura no haras 4 sugere a influência de características individuais na concentração de gordura<sup>17</sup>, uma vez que neste haras havia uma égua, cuja média de gordura no leite foi constantemente alta no decorrer do experimento.

Verifica-se na Tabela 1 que a lactose apresentou comportamento semelhante entre os quatro haras estudados (P<0,05), o que sugere a pouca interferência da alimentação sobre esta variável<sup>24</sup>.

O haras 1 apresentou o menor teor de EST e foi significativamente diferente (P<0,05) dos demais haras para este parâmetro (Tabela 1). Este resultado pode ser

compreendido pela combinação dos resultados encontrados para os outros componentes do leite proveniente deste haras.

A reunião dos dados na Tabela 2 nos permitiu observar as médias gerais de cada componente do leite equino encontradas neste estudo. A média da concentração de proteína observada (2,00%) se assemelhou aos resultados de Morais<sup>1</sup> (1,43 a 2,20%); Santos<sup>6</sup> (1,48 a 2,40%); Ulrey<sup>16</sup> (2,00 a 3,10%) e Oftedal<sup>29</sup> (1,83 a 2,84%). Esta proximidade aos valores encontrados na literatura mostra que a proteína apresenta um comportamento semelhante no leite das diversas raças já estudadas.

O baixo teor de proteínas no leite equino é desejável na alimentação humana, principalmente de crianças, pois evita a sobrecarga renal de solutos<sup>5</sup>. O teor de proteína encontrado no leite de éguas Mangalarga Marchador permite afirmar que o leite desta raça equina também pode ser utilizado na alimentação humana em casos onde é necessário um alimento de baixo teor protéico.

A concentração média de gordura neste estudo, 0,63%, (Tabela 2) foi inferior aos valores encontrados por Ulrey<sup>16</sup> (1,30 a 2,00%) e Oftedal<sup>29</sup> (1,19 a 1,78%). Entretanto, está próxima aos valores encontrados por Morais<sup>1</sup> (0,10 a 1,10%) e Santos<sup>6</sup> (0,86 à 1,07%). Esta amplitude de resultados entre diferentes estudos é amparada pelas observações de alguns autores<sup>23,30</sup> sobre a influência de diferentes fatores como alimentação, ambiente e fatores individuais inerentes a respostas fisiológicas de cada animal na concentração de gordura no leite equino.

A constante busca do consumidor contemporâneo por alimentos com baixo teor de gordura e a baixa concentração desta no leite equino, além da excelente qualidade da mesma, relacionada ao alto teor de ácidos graxos poliinsaturados e baixa concentração de colesterol<sup>9</sup>, o torna extremamente desejável à alimentação humana<sup>1,31,32</sup>. De acordo com os resultados encontrados no presente estudo, o leite de éguas Mangalarga Marchador se enquadra

no perfil de alimento procurado por este consumidor por apresentar baixa concentração de gordura.

A média de 6,57% de lactose, como observado na Tabela 2, confirma a elevada concentração deste açúcar no leite equino e está próxima aos valores encontrados por Morais<sup>1</sup> (7,5%); Ulrey<sup>16</sup> (6,6%) e Oftedal<sup>29</sup> (6,91%). As variações entre os diversos estudos podem estar relacionadas aos efeitos de raça e às diferentes metodologias empregadas.

O EST médio no presente estudo foi de 10,37% (Tabela 2), este resultado está de acordo com o valor médio encontrado por Pagan<sup>24</sup> (10,4%), mas superior ao encontrado por Oftedal<sup>29</sup> (9,63%) e inferior ao valor encontrado por Morais<sup>1</sup> (10,99%). Como o EST é resultante da soma de todos os sólidos do leite, seu valor pode ser influenciado pelos mesmos fatores que influenciam as concentrações de proteína, gordura, lactose e cinzas.

Os resultados encontrados neste trabalho sugerem a viabilidade da utilização do leite de éguas Mangalarga Marchador para alimentação humana. No entanto, seria apropriada a realização de mais estudos, com vistas a obter maior representatividade e também, para avaliar a influência de raças e, principalmente, dos diferentes sistemas de manejo e alimentação, na composição do leite de equino no Brasil.

## CONCLUSÃO

Os teores médios de proteína, gordura, lactose e EST do leite de éguas da raça Mangalarga Marchador foram 2,00%; 0,63%; 6,57% e 10,37%, respectivamente.

Alimentação, manejo e a resposta fisiológica de cada animal, podem influenciar as variáveis de composição do leite de éguas. Entretanto, estudos direcionados devem ser realizados a fim de determinar o efeito de cada variável na composição do leite equino.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e ao CPA/EV – Centro de Pesquisa em Alimentos da Escola de Veterinária pelo apoio financeiro e científico a este estudo.

## REFERENCIAS

1. Morais MT, Simone EM, Romano LA. Estudo da composição do leite de égua e comparação com o leite de mulher. *Hig Aliment* 1999; 13 (64): 62-71.
2. Malacarne M, Martuzzi F, Summer A, Mariani P. Protein and fat composition of mare's milk: some nutritional remarks with reference to human and cow's milk. *Int Dairy J* 2002; 12:869-77.
3. Sharmanov TSH, Kadyrova RKH, Salkhanov BA. Effectiveness of peptic ulcer diet therapy using rations containing whole mare's and camel's milk. *Voprosy Pitaniia* 1981; 3:10-4.
4. Sharmanov TSH, Zhangabylov AK, Zhaksylykova RD. Mechanism of the therapeutic action of whole mare's and camel's milk in chronic hepatitis. *Voprosy Pitaniia* 1982; 1:17-23.
5. Businco LG, Lucenti P, Lucaroni F, Pini C, Di Felice G, Iacovacci P, et al. Allergenicity of mare's milk in children with cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105 (5): 1031-4.
6. Santos EM, Almeida FQ, Vieira AA, Pinto LFB, Corassa A, Pimentel RRM, et al. Lactação em éguas da raça Mangalarga Marchador: produção e composição do leite e ganho de peso dos potros lactentes. *Rev Bras Zootec* 2005; 34 (2):627-34.
7. Cordeiro LAV, Langoni H, Prestes NC. Glândula mamária de éguas: mensuração do pH, teste de whiteside e análise microbiológica do leite. *Veterinária e Zootecnia* 1998; 10:79-87.
8. Prestes NC, Langoni H, Cordeiro LAV. Estudo do leite de éguas sadias ou portadoras de mastite subclínica, pelo teste de Whiteside, análise microbiológica e contagem de células somáticas. *Braz J Vet Res An Sci* 1999; 36:3-8.
9. Defrance AL. Matéria: Tel un bain de Cléopâtre. *Journal en direct - city university of London* [serial online] 2005. Available from: <http://www.salondagriculture2005>. Acesso em 16/01/ 2006.
10. Guerra P. EQUINOS: Brasil possui terceiro maior rebanho mundial de cavalos. *Informativo Técnico Revista GLEBA* [serial online] 2003 Set. Available from: <http://www.cna.org.br/Gleba03/Set/ArtigoCavalo.htm>. Acesso em 15/03/2006.
11. Amiot J. *Ciencia y Tecnología de la leche: principios y aplicaciones*. Zaragoza: Acribia; 1991.
12. Kitchen BJ. Review of progress of dairy science; bovine mastitis: milk compositional changes and related diagnostic tests. *J Dairy Res* 1981; 48: 167-72.
13. Carvalho MP. Gordura e Proteína: como definir seus níveis na composição do leite. *Rev Balde Branco* [serial online] 1999; 419 screens]. Available from: <http://www.baldebranco.com.br>. Acesso em: 01/07/2005.
14. Solaroli G, Pagliarini E, Peri C. Composition and nutritional quality of mare's milk. *Ital. J Food Sci* 1993; 5: 3-10.
15. Egito AS, Girardet JM, Miclo L, Mollé D, Humbert G, Gaillard JL. Susceptibility of equine k - and b - caseins to hydrolysis by chymosin. *Int Dairy J* 2001; 11: 885-93.
16. Ullrey DE, Struthers RD, Hendricks DG, Brent BE. Composition of mare's milk. *J Anim Sci* 1996; 25(1): 217-22.
17. Küçükçetin A, Yaygina H, Hinrichs J, Kulozik U. Adaptation of bovine milk towards mares' milk

- composition by means of membrane technology for koumiss manufacture. *Int Dairy J* 2003; 13 (12): 945-51.
18. Foss electric A/S (DK). Integrated milk testing. Reference manual. Hillerod: The Company; 2000.
  19. Doreau M, Boulot S, Barlet JP, Patureau-Mirand P. Yield and composition of milk from lactating mares: effect of lactation stage and individual differences. *J Dairy Res*, 1990 57: 449-54.
  20. Chemical Land 21. 2-Bromo-2-Nitro-1,3-Propanediol. [online] 2005 . Available from: <http://www.chemicalland21.com/arokorhi/specialtychem/perchem/BRONOPOL.htm> . Acesso em 12/06/2007.
  21. International Dairy Federation [IDF]. 2000. Whole milk - Determination of milkfat, protein & lactose content — Guide for the operation of mid-infra-red instruments. IDF Standard 141C. International Dairy Federation, Brussels, Belgium.
  22. Centeno AJ. Curso de estatística aplicada à biologia.Goiânia (GO): CEGRAF; 1990.
  23. Doreau M, Boulot S. Methods of measurement of milk yield and composition in nursing mares: A review. *Le Lait* 1989; 69: 159-61.
  24. Pagan JD, Hintz HF. Composition of milk from pony mares fed various levels of digestible energy. *Cornell Vet* 1986; 76: 139-48.
  25. Smolders EAA, Van der Veen NG, van Polanen A. Composition of horse milk during the suckling period. *Livestock Production Science* 1990; 25 (1-2): 163-71.
  26. Mariani P, Summer A, Martuzzi F, Formaggioni P, Sabbioni A, Catalano AL. Physicochemical properties, gross composition, energy value and nitrogen fractions of Haflinger nursing mare milk throughout 6 lactation months. *Animal Research* 2001; 50: 415-25.
  27. Cicardi G. Capillary electrophoresis (CE) applied to analysis of mare's milk. *Milchwissenschaft* 2002; 57 (9/10): 515-7.
  28. Csapo J, Stefler J, Martin TG, Makray S, Csapo-Kiss Z. Composition of mares' colostrum and milk. Fat content, fatty acid composition and vitamin content. *Int Dairy J* 1995; 5:393-402.
  29. Oftedal OT, Hintz HF, Schryver HF. Lactation in the horse: Milk composition and intake by foals. *J Nutr* 1983; 113 (10): 2096-106.
  30. Davison KE, Potter GD, Greene LW, Evans JW, McMullan WC. Lactation and reproductive performance of mares fed added dietary fat during late gestation and early lactation. In: *Equine Nutrition Physiology Society. Proceedings of the 10<sup>th</sup> Equine Nutrition Physiology Symposium. USA: Equine Nutrition Physiology Society, 1987: 87-92.*
  31. Koletzko B, Rodriguez-Palmero M. Polyunsaturated fatty acids in human milk and their role in early infant development. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 1999; 4: 269-84.
  32. Jenness R. The composition of human milk. *Semin Perinatol* 1979; 3 (3): 225-39.

# Características físico-químicas do leite de cabra comercializado no estado da Paraíba, Brasil

## Physic-chemical characteristics of goat milk marketed in Paraíba state, Brazil

RIALA6/1119

Roberto Germano COSTA<sup>1\*</sup>, Edvaldo Mesquita BELTRÃO FILHO<sup>2</sup>, Rita de Cássia Ramos do Egypto QUEIROGA<sup>3</sup>, Ariosvaldo Nunes de MEDEIROS<sup>4</sup>, Celso José Bruno de OLIVEIRA<sup>4</sup>, Ingrid Conceição Dantas GUERRA<sup>5</sup>

\* Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Departamento de Agropecuária, CFT/UFPB. Rua Alfredo Bandeira, 327 Centro, Solânea/PB. CEP 58225-000, fone/fax: (83) 3367-1200 r. 246 e-mail: betogermano@hotmail.com.

<sup>2</sup> PDIZ/CCA/UFPB/Areia. e-mail: edvaldobeltraofilho@hotmail.com

<sup>3</sup> Departamento de Nutrição, CCS/UFPB

<sup>4</sup> Departamento de Zootecnia, UFPB/DZ/PDIZ

<sup>5</sup> Graduanda em Nutrição, Bolsista PIBIC/UFPB

Recebido: 27/04/2007 – Aceito para publicação: 30/07/2007

### RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar as características físico-químicas do leite de cabra integral e pasteurizado comercializado no estado da Paraíba. O total de 24 amostras de leite de seis marcas produtoras foi coletado de estabelecimentos comerciais da cidade de João Pessoa (PB), em diferentes períodos. Entre as amostras de leite das seis marcas comerciais, as amostras de cinco marcas apresentaram-se fora dos padrões estabelecidos pela legislação vigente. Não houve diferenças significativas apenas para as variáveis lactose e cinzas entre as marcas comerciais analisadas ( $P > 0,05$ ). Os parâmetros com maior variação foram lipídios (1,67 a 3,57%) e sólidos não gordurosos (7,61 a 10,01%). Adicionalmente, foi detectada a atividade da lactoperoxidase em apenas 66,66% das amostras analisadas, e somente três marcas apresentaram 100% das amostras de leite positivas para essa enzima. Por outro lado, as três demais marcas apresentaram 75, 25 e 0% de amostras positivas para lactoperoxidase. Há, portanto, necessidade de adequação do processamento do leite de cabra produzido no estado da Paraíba, principalmente no que se refere à pasteurização, para que o alimento atinja os padrões requeridos pela legislação. A maior homogeneidade do leite de cabra quanto às suas propriedades físico-químicas é fundamental para garantir aceitabilidade do produto por uma classe consumidora cada vez mais exigente e promover a expansão da caprinocultura leiteira do estado da Paraíba.

**Palavras-chave.** leite de cabra, qualidade físico-química, pasteurização, lactoperoxidase, legislação.

### ABSTRACT

The present study aimed to evaluate the physic-chemical characteristics of integral and pasteurized goat milk marketed in Paraíba state, Brazil. Goat milk samples ( $n=24$ ) from six diverse trade brands were obtained from commercial establishments located in João Pessoa, Paraíba, Brazil at different periods. Five milk brands presented milk samples which were not in accordance to the Brazilian legislation quality standards. All variables, except lactose and ashes ( $P > 0,05$ ), were significantly different among the analyzed trade marks. The parameters with highest variation were fat (1.67 to 3.57%) and non-fat solids (7.61 to 10.01%). Lactoperoxidase activity was adequate in 66.66% of analyzed samples only; and three commercial milk brands only showed 100% of positive samples for this enzyme. On the other hand, the other three brands showed positive enzyme activity in 25%, 0%, and 75% of analyzed samples, respectively. Therefore, the goat milk processing in Paraíba must be adjusted, focusing mainly to pasteurisation procedure, so that the standards recommended by legislation were attained. The most homogeneity of goat milk produced in Paraíba concerning its physic-chemical properties is crucial to increase the acceptability of this product by consumers, who are more and more demanding, and for promoting the goat milk production expanding in the Paraíba state.

**Key words.** goat milk, physic-chemical quality, pasteurization, lactoperoxide, legislation.

## INTRODUÇÃO

A produção de leite de cabra no Brasil e no Mundo vem crescendo a partir da década de 70, com aumento médio anual bem superior ao crescimento do rebanho caprino<sup>1</sup>.

Em alguns países, a capricocultura leiteira apresenta uma melhor organização com aplicação de técnicas e processos aplicados à matéria-prima promovendo sua exploração econômica, através do melhoramento animal, bem como os consumidores ampliaram sua aceitação, principalmente as crianças e idosos, atraídos por características nutricionais próprias e hipoalergenicidade dos produtos lácteos de origem caprina. Há, dessa forma, um mercado crescente para o consumo de derivados de leite caprino com elevado valor agregado, como por exemplo queijos finos.

No Brasil, observa-se nas regiões Sudeste e Nordeste a criação e ampliação de unidades produtivas para produção de leite de cabra e seus derivados incentivadas pela iniciativa privada, por ações institucionais de pesquisa ou governamentais, através da criação de associações com aplicação de assistência técnica. Este fato é relevante para a região semi-árida, tendo em vista que os produtos oriundos da caprinocultura são fundamentais para suprir as necessidades alimentares da população nordestina, além de gerar renda através da comercialização do leite e derivados. Dessa forma, o conhecimento da composição do leite caprino é importante, considerando sua variabilidade natural, para subsidiar seu aproveitamento através de processos tecnológicos aplicados no beneficiamento. Conseqüentemente, pode-se promover a melhoria da qualidade dos produtos como mecanismo impulsionador da aceitabilidade dos mesmos, promovendo o fortalecimento da caprinocultura leiteira no Nordeste. A precariedade da tecnologia aplicada no Brasil, assim como a não aplicação de padrões de controle de qualidade para o leite de cabra e seus derivados, tem se constituído como os principais entraves à agroindústria especializada em produtos lácteos de caprinos. A expansão deste setor está fortemente vinculada à melhoria da estrutura de comercialização e à aplicação de tecnologia adequada aos padrões de qualidade exigidos<sup>1,2</sup>.

A obtenção, seguida do acondicionamento e processamento do leite, deve ser foco de cuidados determinados pela legislação para se evitar alteração de sua qualidade nutricional, microbiológica e sensorial. Apesar do nível tecnológico de alguns laticínios, diversos problemas associados à produção do leite ainda persistem, depreciando a qualidade da matéria-prima e tornando o produto impróprio para o consumo humano<sup>3</sup>.

Outro aspecto a ser considerado são os diversos fatores que interferem na composição do leite de cabra, dentre os quais destacam-se a raça, a alimentação dos animais, o período de lactação, a estação do ano, a idade do animal bem como sua fisiologia. Procedimentos inadequados no processamento do leite, intencionais ou não, também podem alterar a composição do leite gerando produtos fora dos padrões de qualidade estabelecidos pela legislação.

Considerando a escassez de trabalhos sobre a qualidade do leite caprino, assim como a necessidade de informações sobre sua adequação com os padrões de qualidade e identidade, exigidos pela legislação específica do Ministério da Agricultura, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a qualidade físico-química do leite de cabra comercializado no Estado da Paraíba.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Amostragem

Foram analisadas amostras de leite de cabra pasteurizado integral congelado pertencentes a seis marcas comerciais produzidas no Estado da Paraíba. Para cada marca comercial foram coletadas quatro amostras por período (quinzena), durante os meses de novembro e dezembro de 2006. As amostras foram adquiridas em estabelecimentos comerciais da cidade de João Pessoa, Paraíba, refletindo assim a qualidade do produto disponível aos consumidores, uma vez que as marcas analisadas originam-se de mini-usinas de diversas micro-regiões do Estado da Paraíba.

Informações sobre variáveis associadas à obtenção da matéria-prima, como local das empresas pesquisadas, tipo do serviço de inspeção, sistema de produção e perfil racial do rebanho também foram colhidas e estão apresentadas na Tabela 1.

**Tabela 1.** Local de produção, tipo de processamento, tipo de inspeção e tipo racial do rebanho das marcas comerciais analisadas.

Marca	Local de Produção	Tipo de Processamento	Tipo Inspeção	Tipo Racial do Rebanho
1	Alagoa Grande	Pasteurização Lenta	S.I.E.	Anglo Nubiana
2	Caturité	Pasteurização Rápida	S.I.F.	SRD
3	Bananeiras	Pasteurização Lenta	S.I.E.	Saanen
4	Alagoinha	Pasteurização Lenta	S.I.E.	Saanen
5	Mulungú	Pasteurização Lenta	S.I.E.	Pardo Alpina
6	Santa Terezinha	Pasteurização Rápida	S.I.E.	Saanen

SRD: sem raça definida; SIE: Serviço de Inspeção Estadual; SIF: Serviço de Inspeção Federal.

As amostras foram colhidas assepticamente e transportadas ao laboratório em recipientes isotérmicos. As análises físico-químicas foram realizadas dentro das 24 horas pós-colheita a partir de 500 mL de leite obtidos após o descongelamento.

#### Análises físico-químicas

As análises foram realizadas no Laboratório de Bromatologia do Departamento de Nutrição da Universidade Federal da Paraíba. A determinação de proteína foi realizada segundo o método de Micro-Kjedahl<sup>4</sup>. Para a determinação do extrato seco total, procedeu-se secagem da amostra em estufa estabilizada a 105°C, até obtenção de peso constante<sup>4</sup>; O teor de lipídio foi determinado utilizando-se o lacto-butirômetro de Gerber<sup>5</sup>. A quantificação de lactose (g/100g) foi realizada utilizando-se metodologia de Fehling<sup>5</sup>. A densidade foi determinada diretamente utilizando-se termolactodensímetro a 15 °C<sup>5</sup>. Foram determinadas também a acidez titulável em graus Dornic (°D)<sup>5</sup>, cinzas por incineração a 550-570°C<sup>5</sup>, lactoperoxidase através de solução alcoólica de guaiacol a 1%<sup>5</sup> e extrato seco desengordurado, obtido pela subtração do teor de gordura do extrato seco total<sup>6</sup>.

#### Análise dos dados

Os resultados obtidos nas análises físico-químicas foram comparados com os valores de referência estabelecidos pela legislação<sup>7</sup>, e também com os encontrados na literatura. Todos os dados foram transcritos para meio digital para um banco de dados e analisados em um Delineamento Inteiramente Casualizado, com o auxílio do programa estatístico SAS. As médias foram comparadas pelo teste de Duncan, para o nível de 5% de probabilidade.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 2 constam os valores médios observados para as determinações físico-químicas das amostras de leite de cabra comercializado no Estado da Paraíba, bem como os valores de referência estabelecidos pela legislação<sup>7</sup>.

**Tabela 2.** Valores médios determinados para as marcas comerciais de leite de cabra para extrato seco total, lipídios, Sólidos não-gordurosos, acidez, lactose, proteínas, cinzas, densidade e valores determinados pela legislação.

Marca	EST(%)	LIPID(%)	SNG(%)	ACD(°D)	LACT (%)	PROT(%)	CINZ(%)	DENS(g/ cm <sup>3</sup> )
1	13,68a	3,57a	10,01a	16,24a	4,76	3,37a	0,73	1.031,55a
2	9,43b	1,67c	7,76b	13,11b	4,73	3,06ab	0,65	1.029,90ab
3	10,31b	2,70b	7,61b	13,84b	4,66	3,31ab	0,67	1.030,82ab
4	10,28b	2,45b	7,83b	11,81b	4,66	2,90ab	0,69	1.029,40ab
5	11,10b	2,13bc	8,96ab	13,20b	4,61	2,88b	0,70	1.030,57ab
6	10,65b	2,27bc	8,38ab	12,84b	4,53	3,12ab	0,68	1.028,45b
LEG	-	3,0	8,2	13 a 18	4,30	2,8	0,70	1.028 -1.034

Nas colunas, médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Duncan, a 5% de probabilidade.

EST – extrato seco total, LIPID – lipídios, SNG – sólidos não gordurosos, ACD – acidez, LACT – lactose, PROT – proteínas, CINZ – cinzas, DENS – densidade, LEG – legislação.

A variação dos constituintes físico-químicos do leite de cabra pode decorrer de vários fatores como raça, alimentação, estágio de lactação, época do ano, clima, entre outros. Com base na legislação vigente<sup>7</sup>, cinco marcas comerciais (83%) apresentaram-se inadequadas quanto ao teor de lipídios, três marcas (50%) para sólidos não gordurosos; duas marcas (33%) para acidez e quatro marcas (66%) quanto ao teor de cinzas. Para todos esses parâmetros, foram encontrados valores inferiores àqueles estabelecidos na legislação. Apenas a marca comercial 1 apresentou-se de acordo com a legislação vigente para a composição físico-química do leite de cabra.

Os constituintes do leite de cabras que apresentaram valores dentro dos requisitos mínimos estabelecidos pela legislação foram lactose, proteína e densidade. Porém, houve variação significativa ( $P < 0,05$ ) entre as marcas comerciais. Esses resultados não corroboram com estudo anterior<sup>8</sup> sobre a qualidade do leite de cabra pasteurizado congelado comercializado na região de Ribeirão Preto – SP, onde os parâmetros lactose, proteína e densidade encontraram-se abaixo dos requisitos mínimos determinados pela legislação em 73,1, 15,4 e 7,7 % das amostras analisadas, respectivamente.

Os resultados encontrados para lactose relativos à marca 1, proveniente de animais da raça Anglo Nubiana, e à marca 5 - raça Pardo Alemã, foram de 4,76 e 4,61%, respectivamente. Esses resultados foram superiores aos encontrados anteriormente por Ferreira e Queiroga<sup>9</sup>, ao analisarem leite de cabras das raças Anglo Nubiana e Parda Alemã, no Curimatáu Paraíba durante 195 dias de lactação, encontrando valores médios de 3,94; 4,00 %, respectivamente.

Para o teor de lipídios e extrato seco total, observou-se que a marca 1, cujo leite é originado de animais da raça Anglo Nubiana, foi superior à demais marcas ( $P < 0,05$ ). A gordura do leite é o fator que mais sofre influência da alimentação, em que variáveis intrínsecas ao sistema de produção podem ter um impacto na composição do leite. Adicionalmente, o elevado teor de fibra das forragens de micro-regiões semi-áridas utilizadas nas dietas dos animais também pode afetar esse constituinte do leite<sup>10</sup>.

Segundo a legislação vigente, são admitidos valores de gordura inferiores a 2,9% para a variedade de leite integral mediante comprovação de que o teor médio de gordura do determinado rebanho não atinja esse nível. De fato, pesquisas demonstram que os teores de lipídeos e proteína são os principais constituintes que sofrem influência do perfil racial. Queiroga<sup>11</sup> e Brito<sup>12</sup> observaram diferenças significativas na composição química entre raças e grupos raciais. Prasad e Sengar<sup>13</sup> obtiveram resultados similares, estudando animais mestiços da raça Saanen, animais da raça Barbari com diversos cruzamentos.

No presente estudo, a variação para lipídios do leite de cabra foi de 1,67 a 3,57%, confirmando valores abaixo de 2,0% para leite de cabra integral. Estes valores baixos de lipídios no leite de cabra não podem ser atribuídos ao desnatamento do leite, tendo em vista que a gordura do leite de cabra não tem valor comercial. Prata et al.<sup>14</sup>, pesquisando o leite de cabras na região sudeste do Brasil, verificaram que a gordura foi o componente que demonstrou maior variação, de 1,70 a 5,70%. Na literatura, há uma carência acentuada de estudos sobre o teor de lipídios em leite de cabra de diferentes genótipos, o que dificulta uma análise mais profunda dos resultados.

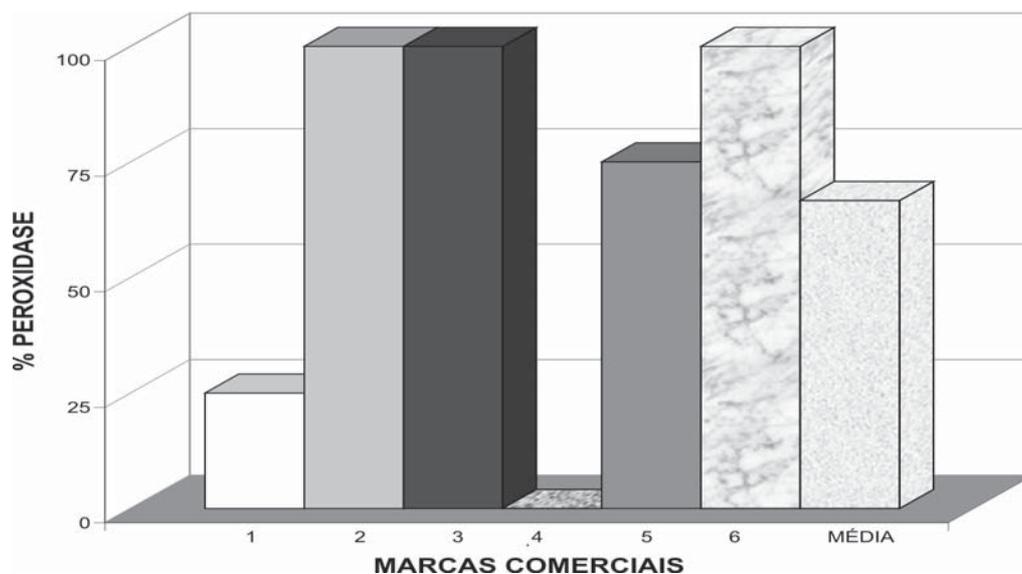
Os valores de proteína, lactose, lipídios e extrato seco total apresentaram-se condizentes com aqueles descritos em investigações prévias sobre o leite de cabra da raça Anglo Nubiana, confirmando que o leite desses animais apresentou maior concentração de nutrientes. Bueno et al.<sup>15</sup>, pesquisando a composição do leite de cabras da raça Anglo Nubiana verificaram valores de 3,2 %; 4,8 %; 5,3 % para proteína, lipídios e lactose, respectivamente. Também, Sung et al.<sup>16</sup> analisando o leite desta raça verificaram teores de 4,1%; 4,5%; 4,2%; e 13,6% para proteínas, lipídios, lactose e extrato seco total, respectivamente. Estes mesmos autores analisando o leite

de animais da raça Saanen encontraram valores médios de 3,0%; 2,7% e 11,5% para proteínas, lipídios e extrato seco total.

A acidez observada variou de 11,81 a 16,24°D, observando-se uma variação significativa ( $P < 0,05$ ) entre as marcas comerciais analisadas, sendo a marca 1 superior às demais. Segundo a legislação, os valores para acidez do leite de cabra estão padronizados entre 13 e 18°D. Desta forma, as marcas 4 (11,81°D) e 6 (12,84°D) apresentaram-se em desacordo com a legislação, fato este também observado por Oliveira et al.<sup>8</sup>. Esses autores encontraram valores para acidez variando de 10 a 18°D, com 15,4% das amostras de leite de cabra pasteurizado inferior do limite mínimo exigido pela legislação. Jenness<sup>17</sup> ressalva que o leite de cabras apresenta-se mais ácido que o de vaca, devido às diferenças entre os grupos carboxílicos das duas espécies, podendo o leite de cabra variar de 11 a 18°D. Segundo Queiroga<sup>18</sup>, este índice também é utilizado como indicador do estado de conservação do leite em função da relação entre disponibilidade de lactose e produção de ácido láctico por ação microbiana que acarreta no aumento da acidez e diminuição no teor de lactose.

Pereira et al<sup>19</sup> avaliando a qualidade química e física do leite de cabra distribuído no Programa Social “Pacto Novo Cariri” no Estado da Paraíba, encontraram valores médios de 16°D para acidez do leite em 21 municípios pesquisados. Ao contrário do presente estudo, não foram encontradas amostras fora dos padrões da legislação.

A porcentagem de amostras positivas para lactoperoxidase é apresentada na Figura 1. Como a enzima é sensível a temperaturas de pasteurização que excedam 80°C, deve estar presente no leite pasteurizado, onde o resultado negativo indica a aplicação de calor excessivo no processo de pasteurização, o que traz prejuízos com a desnaturação de alguns nutrientes, principalmente vitaminas e proteínas<sup>20</sup>.



**Figura 1.** Percentuais determinados para lactoperoxidase nas marcas comerciais de leite de cabras do estado da Paraíba e média geral entre as marcas.

As marcas 2, 3 e 6 apresentaram resultado positivo para 100% das amostras analisadas. No entanto, as marcas 1, 4 e 5 apresentaram apenas 25%, 0% e 75% das amostras com resultados positivo, respectivamente. Considerando a média obtida de 66,7% este valor está próximo dos encontrados por Zocche et al.<sup>21</sup>, onde 70% das amostras de leite pasteurizado produzido na região oeste do Estado do Paraná apresentaram-se positivas para lactoperoxidase. Já Serafim et al.<sup>22</sup> encontraram apenas 7,8% para leite tipo "C" e Lima et al.<sup>23</sup>, para este mesmo tipo de leite, encontraram valores de 50,9%. Por outro lado, Garrido et al.<sup>24</sup>, analisando o leite comercializado em Ribeirão Preto (SP), encontraram apenas 5,1% das amostras com resultado negativo para a lactoperoxidase.

O elevado número de amostras de leite apresentando ausência de atividade de lactoperoxidase, observado em alguns estudos, refletem um aquecimento prolongado do leite no processo de pasteurização, que em alguns casos é intencional, pretendendo-se desta forma reduzir uma elevada carga microbiana do leite. Por outro lado, pode ser acidental, decorrente de processos de pasteurização aplicados incorretamente. De qualquer forma, o superaquecimento do leite pasteurizado mascara sua qualidade microbiológica podendo ainda alterar seus constituintes físicos, químicos e organolépticos<sup>25</sup>.

### CONCLUSÕES

O leite de cabra comercializado no estado da Paraíba apresentou variação significativa na sua composição físico-química, com 83,3% das marcas comerciais fora dos padrões determinados pela Legislação.

Melhorias no controle do processo de pasteurização do leite de cabra devem ser implementadas, principalmente, referentes ao controle da temperatura de pasteurização, visando evitar alterações que comprometam sua qualidade tecnológica.

### REFERÊNCIAS

1. Cordeiro PRC. O desenvolvimento econômico da caprinocultura leiteira. *Rev Cons Fed Med Vet* 1998; 4(13): 28-30.
2. Simplicio AA, Wander A. Organização e Gestão da Unidade Produtiva na Caprinocultura. In: Anais do 5rd Congresso Pernambucano de Medicina Veterinária – Seminário Nordestino de Caprinocultura. Recife: 2003.
3. Freitas JA, Oliveira JP, Sumbo FD. Características físico-químicas e microbiológicas do leite fluido exposto ao consumo na cidade de Belém, Pará. *Rev Hig Aliment* 2002. 16(10):89-96.
4. AOAC. Association of Official Analytical Chemists. *Official Methods of Analysis*, 16 ed., 4 rev, 1998. 2v.
5. Instituto Adolfo Lutz. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos químicos e físico-químicos para análise de alimentos. São Paulo (SP): IMESP, 1985.
6. Brasil. Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Animal - métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes. II – métodos físicos e químicos, Brasília: LANARA, 1981. p.XIV 1-22.
7. Brasil. Instrução Normativa nº 37 de 8 de novembro de 2000 do Ministério da Agricultura. Regulamento Técnico de Produção, identidade e qualidade do leite de cabra. *Diário Oficial da União*. Disponível no site: [www.agricultura.gov.br/das/dipoa/legislacaoespecifica\\_leited.htm](http://www.agricultura.gov.br/das/dipoa/legislacaoespecifica_leited.htm). Acesso em 13 de dezembro de 2006.
8. Oliveira MA, Favaro RMD, Okada MM, Abe LT, Iha MH. Qualidade físico-química e microbiológica do leite de cabra pasteurizado e Ultra Alta Temperatura, comercializado na região de Ribeirão Preto-SP. *Rev Inst Adolfo Lutz* 2005; 64(1):104-9.
9. Ferreira MCC, Queiroga RCRE. Composição do leite de cabras puras no Curimatau Paraibano durante o período de lactação. *Rev Inst Cândido Tostes* 2003; 58(330): 21-6.
10. Morgan F, Massouras T, Barbosa M, Roseiro L, Ravasco F, Kandarakis I, Bonnin V et al. Characteristics of goat milk collected from small and medium enterprises in Greece, Portugal and France. *Small Rumin Res* 2003; 47: 39–49.
11. Queiroga RCRE. Características físicas, químicas e condições higiênicosanitárias do leite de cabras mestiças no Brejo paraibano [Dissertação de Mestrado]. João Pessoa, Paraíba: Universidade Federal da Paraíba, 1995. 84 pp.
12. Brito, CO. Influência do período de lactação nos constituintes químicos e físicos e na produção do leite de cabras puras e mestiças da raça Murciana Granadina [Dissertação de Mestrado]. João Pessoa, Paraíba. Universidade Federal da Paraíba, 1999. 72pp.
13. Prasad H, Sengar OPS. Milk yield and composition of the Barbari goat breed and its cross with Jamunapari, Beetal and Black Bengal. *Small Rumin Res* 2002; 45: 79-83.
14. Prata LF, Ribeiro AC, Rezende KT. Composição, perfil nitrogenado e características do leite caprino (Saanen). Região Sudeste. *Ciênc Tecnol Aliment* 1998; 18(4): 429-32.
15. Bueno MS, Gadini CH, Lara MAC. Produção e composição do leite de cabras da raça Anglo-Nubiana. In: REUNIÃO ANUAL DA SBZ, 28, 1991, João Pessoa. Sociedade Brasileira de Zootecnia 1991. 692 pp.

16. Sung YY, Wu TI, Wang PH. Evaluation of goat milk quality of Alpine, Nubian, Saanen and Toggenburg breeds in Taiwan. *Small Rumin Res* 1999; 33:17-23.
17. Jenness R. Composition and characteristics of goat milk: review 1968-1979. *J Dairy Sci* 1980; 63(10):1605-30.
18. Queiroga RCRE. Caracterização nutricional, microbiológica, sensorial e aromática do leite de cabra Saanen, em função do manejo do rebanho, higiene da ordenha e fase de lactação [Tese de Doutorado]. Recife, Pernambuco: Universidade Federal de Pernambuco, 2004. 148 pp.
19. Pereira RÂG, Queiroga RCRE, Vianna RPT, Oliveira MEG. Qualidade química e física do leite de cabra distribuído no Programa Social “Pacto Novo Cariri” no Estado da Paraíba. *Rev Inst Adolfo Lutz* 2005; 64(2): 205-11.
20. Behmer MLA. Tecnologia do leite. NOBEL, 13 ed. 1984, 320pp.
21. Zocche F, Bersot LS, Barcellos VC, Paranhos JK, Rosa STM, Raimundo NK. Qualidade microbiológica e físico-química do leite pasteurizado produzido na região oeste do Paraná. *Arch Vet Sci* 2002; 7(2): 59-67.
22. Serafim T, Moro EMP, Sturmer FCR. Análise e controle microbiológico do leite tipo “C” distribuídos em Cruz Alta – RS, Brasil. In: Anais do 21º Congresso Brasileiro de Microbiologia. Foz do Iguaçu: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2001.
23. Lima JGP, Rodrigues E, Ribeiro AGP, Borges A. A. detecção da peroxidase para avaliação da pasteurização recomendada para leite In: Anais do 21º Congresso Brasileiro de Microbiologia. Foz do Iguaçu: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2001.
24. Garrido NS, Morais JMT, Briganti RC, Oliveira MA, Bergamini AMM, Oliveira SAV, et al. Avaliação da qualidade físico-química e microbiológica do leite proveniente de mini e micro-usinas de beneficiamento da região de Ribeirão Preto SP. *Rev Inst Adolfo Lutz* 2001; 60(2): 141-6.
25. Lopes ACS, Stamford TLM. Efficiency of pasteurization on the microbiological quality of type C milk. *Arq Bras, Med Vet Zootec* 1998; 50(1): 99-101.

# Otimização e validação de metodologia analítica para determinação de flavonóis e flavonas por CLAE em hortaliças

## Optimization and validation of HPLC methodology for determining flavonols and flavones in vegetables

RIALA6/1120

Lísia S. HUBER<sup>1</sup>, Delia B. RODRIGUEZ-AMAYA<sup>1\*</sup>, Maria I. RODRIGUES<sup>2</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, C.P. 6121, 13083-862, Campinas, SP. Telefone:(19) 3521 4013. E-mail: delia@fea.unicamp.br

<sup>2</sup>Departamento de Engenharia de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Recebido: 29/05/2007 – Aceito para publicação: 23/08/2007

### RESUMO

O objetivo deste trabalho foi otimizar a metodologia analítica para determinação de flavonóis e flavonas em hortaliças. A hidrólise foi otimizada utilizando-se Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para investigar os efeitos da concentração de HCl e do tempo de hidrólise. Essa etapa foi realizada simultaneamente com a extração por metanol aquoso 50%, em refluxo a 90°C. Foi utilizado cromatógrafo líquido Waters com coluna Nova-Pak C18 e detector de arranjo de diodos. Os compostos estudados foram miricetina (M), quercetina (Q), kaempferol (K), luteolina (L) e apigenina (A). As condições ótimas encontradas para hidrólise de cada hortaliça foram: 1,0M HCl/6 horas para espinafre e couve, 1,6M HCl/5 horas para rúcula, 1,2M HCl/2 horas para alface, 1,7M HCl/4,3 horas para salsa e 0,8M HCl/2,5 horas para cebola. O melhor gradiente para separação (CLAE) dos flavonóides das hortaliças em estudo foi constituído de metanol:água (acidificados com 0,3% de ácido fórmico) 20:80, chegando a 45:55 em 5 minutos, 48:52 em 17 minutos e voltando a 20:80 em 20 minutos. As curvas analíticas apresentaram coeficientes de correlação maiores que 0,99. Os limites de detecção foram de 0,5, 0,4, 0,5, 0,6 e 1,0µg/mL, respectivamente, para M, Q, L, K e A.

**Palavras-chave.** flavonóides, análise por CLAE, hortaliças.

### ABSTRACT

The objective of this investigation was to optimize the analytical methodology for determining flavonols and flavones in vegetables. The hydrolysis procedure was optimized using Central Composite Rotational Design (CCRD) to investigate the effects of HCl concentration and hydrolysis time. This step was carried out simultaneously with extraction with 50% aqueous methanol, and refluxing at 90°C. A Waters liquid chromatograph, with Nova-Pak C18 column and photodiode array detector, was used. The analyzed compounds were myricetin (M), quercetin (Q), kaempferol (K), luteolin (L), and apigenin (A). The optimum conditions found for hydrolysis for each vegetable were: 1.0M HCl for 6 hours for spinach and kale, 1.6M HCl for 5 hours for rocket, 1.2M HCl for 2 hours for lettuce, 1.7M HCl for 4.3 hours for parsley, and 0.8M HCL for 2.5 hours for onion. The best gradient (HPLC) for separating flavonoids from these vegetables consisted of methanol:water (acidified with 0.03% formic acid) 20:80, changing to 45:55 in 5 minutes, 48:52 in 17 minutes, returning to 20:80 in 20 minutes. The standard curves of the flavonoids had coefficients of correlation higher than 0.99. The detection limits were 0.5, 0.4, 0.5, 0.6 and 1.0µg/mL for M, Q, L, K, and A, respectively.

**Key words.** flavonoids, HPLC analysis, vegetables.

## INTRODUÇÃO

Flavonóides são compostos polifenólicos amplamente distribuídos em alimentos de origem vegetal. Classificados em grandes grupos, como as antocianinas, isoflavonas, flavonas, flavanóis, flavonóis e flavanonas, estes compostos vêm despertando um crescente interesse devido aos estudos que mostram uma relação inversa entre o seu consumo e o risco de doenças degenerativas como o câncer e doenças cardiovasculares<sup>1-7</sup>. Esta possível proteção pelos flavonóides é atribuída à sua ação como antioxidantes, devido a suas propriedades como seqüestradores de oxigênio singlete, quelantes de metais ou doadores de hidrogênio, sendo potentes seqüestradores de radicais livres<sup>8-11</sup>. São também anti-trombóticos, através da redução da agregação plaquetária<sup>12,13</sup>; moduladores da síntese de óxido nítrico pelo endotélio vascular, levando ao vaso-relaxamento<sup>12</sup>; anti-mutagênicos, interrompendo vários estágios do processo de câncer<sup>14-16</sup>; e mediadores da transdução celular<sup>17</sup>.

As fontes alimentares de flavonóides são analisadas principalmente em relação a três flavonóis, quercetina, miricetina e kaempferol, e duas flavonas, apigenina e luteolina<sup>18-23</sup>. Estes são também os flavonóides mais investigados em estudos sobre compostos anticarcinogênicos.

Os métodos analíticos quantitativos empregados para flavonóides são diversificados, embora utilize-se maciçamente a cromatografia, em especial a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A eletroforese capilar é uma técnica bastante promissora, mas os relatos ainda são modestos em comparação à CLAE.

Os métodos por CLAE para flavonóides envolvem, na maioria das análises, colunas de fase reversa e detector de arranjo de diodos<sup>24</sup>.

Em plantas, com exceção das catequinas, os flavonóides ocorrem na forma glicosilada, ou seja, ligados a moléculas de açúcar<sup>25-27</sup>. A determinação quantitativa de flavonóides na forma glicosídica é difícil devido ao grande número de glicosídeos diferentes existentes para cada flavonóide e a dificuldade de adquirir padrões. A hidrólise das diversas formas de glicosídeos para liberar as agliconas oferece um método mais prático, porém, pode provocar a degradação dos flavonóides. Glicosídeos são hidrolisados usando-se normalmente HCl em metanol aquoso<sup>18,19,21</sup>. A hidrólise dos glicosídeos requer concentrações relativamente altas de ácidos minerais (1-2M), em condições de refluxo, numa mistura de metanol e água (50:50, v/v)<sup>21</sup>.

O procedimento utilizado na maioria das pesquisas é o estabelecido por Hertog et al.<sup>21</sup>, que emprega refluxo das amostras por 2 horas a 90°C com HCl 1,2M em solução aquosa de metanol 50%. Estes autores estabeleceram as melhores condições de hidrólise para alimentos contendo flavonóis glicuronídeos (2,0M de HCl por 2 horas, ou ainda 1,6M de HCl por 4 horas), flavonóis glicosídeos (1,2M de HCl por no máximo 2 horas) e flavonas (2,0M de HCl por 4 horas).

Häkkinen et al.<sup>28</sup>, utilizando uma mistura de padrões de flavonóis e ácidos fenólicos, compararam o procedimento estabelecido por Hertog et al.<sup>21</sup>, 1,2M de HCl a 90°C por 2 horas, com outras condições de hidrólise, utilizando 0,6M ou 1,2M de HCl em metanol 50%, com tempo de 16h a 21°C ou 35°C sob atmosfera de nitrogênio. Os melhores resultados foram obtidos com 1,2M de HCl a 90°C por 2 horas e 0,6M de HCl a 35°C por 16 horas. Posteriormente, estes dois procedimentos foram comparados, utilizando-se amostras de "blackcurrant" e morango. A melhor condição para quercetina e miricetina em "blackcurrant" foi com 1,2M de HCl a 90°C por 2 horas, porém, kaempferol não foi detectado nesta condição de hidrólise. Nas amostras de morango, esta temperatura também foi mais eficiente para quercetina, porém miricetina e kaempferol não foram detectados. O método de escolha foi hidrólise a 35°C por 16 horas usando 1,2M de HCl. Ácido ascórbico e *t*-butil-hidroquinona (TBHQ) foram testados como antioxidantes, sendo que o primeiro foi escolhido, já que TBHQ interferiu na identificação da quercetina.

Mais recentemente, Nuutila et al.<sup>29</sup> compararam os métodos de Hertog et al.<sup>21</sup> e Häkkinen et al.<sup>28</sup>, utilizando soluções de padrão e misturas de padrões (ácidos fenólicos, flavonóis, flavonas e catequinas) e também padrões separados. Os melhores resultados, para a maioria dos compostos, foram obtidos utilizando-se refluxo a 90°C por 2 horas com 1,2M de HCl (Hertog et al.<sup>21</sup>) sem adição de antioxidante. Porém, na ausência de antioxidante, a miricetina era extensivamente degradada. Ácido ascórbico e TBHQ foram comparados, obtendo-se os mesmos resultados de Häkkinen et al.<sup>28</sup>. A quantidade ideal de antioxidante foi estabelecida em 2mg para 5mL de solução, em amostras de cebola e espinafre.

Estas variações demonstram a importância da otimização e validação de métodos analíticos para cada alimento analisado, devido às variações na natureza da matriz e na composição e glicosilação dos flavonóides.

No geral, a otimização de processos pode ser alcançada por métodos empíricos ou estatísticos. Os tradicionais processos que otimizam um fator de cada vez demandam maior tempo, e podem ignorar as interações entre os vários fatores, sendo que o resultado da otimização pode não refletir o modelo real, uma vez que as atuais respostas aos processos, resultam da influência das interações entre as variáveis. Os processos estatísticos de otimização permitem que sejam levadas em consideração estas interações<sup>30</sup>. A Análise por Superfície de Resposta (ASR), originalmente descrita por Box et al.<sup>31</sup>, é um dos métodos que permite a avaliação dos efeitos dos muitos fatores e suas interações sobre as variáveis de resposta.

O objetivo deste estudo foi estabelecer as melhores condições cromatográficas para separação de flavonóis e flavonas de hortaliças e otimizar, através de delineamento estatístico, as melhores condições para extração/hidrólise destes compostos.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Amostras

As amostras foram adquiridas em supermercados da cidade de Campinas, São Paulo. Foram determinadas as condições ótimas de extração/hidrólise e análise cromatográfica dos flavonóides presentes em alface (*Lactuca sativa*), couve (*Brassica oleraceae*), espinafre (*Tetragonia expansa*), rúcula (*Eruca sativa*), salsa (*Petroselinum sativum*) e cebola (*Allium cepa*).

As amostras submetidas às análises foram retiradas de um mesmo lote homogeneizado para cada aspecto avaliado (um lote para otimização das condições de hidrólise, um para avaliação da precisão e outro para avaliação da exatidão) para que as variações naturais não fossem atribuídas a variações analíticas.

### Reagentes e padrões

Para a preparação das amostras e fases móveis, utilizou-se água purificada em sistema Milli-Q (Millipore). Metanol grau cromatográfico foi adquirido da Mallinckrodt Baker (Philipsburg, EUA) e acetonitrila da Merck do Brasil (São Paulo, Brasil). Ácido acético, ácido fórmico, ácido ascórbico e ácido clorídrico de grau analítico foram adquiridos da Labsynth Ltda (São Paulo, Brasil). As fases móveis foram filtradas em filtros politetrafluoroetileno (PTFE) da Millipore, com poros de 0,45µm de diâmetro.

Os padrões de miricetina (M), quercetina (Q), kaempferol (K), luteolina (L) e apigenina (A) foram adquiridos da Sigma Chemicals Co. (St. Louis, EUA). Soluções estoque dos padrões foram preparadas pela dissolução de cada flavonóide em metanol grau cromatográfico, em concentração de aproximadamente 1000µg/mL e conservadas a -18°C protegidas da luz. As soluções estoque apresentaram estabilidade superior a 2 meses nessas condições.

### Equipamento e condições cromatográficas

A análise cromatográfica foi realizada em um módulo de separação a líquido da Waters (modelo 2690), Milford, EUA, equipado com injetor manual Rheodyne (modelo 7725i), controlado por Software Millennium 32. Foi utilizada uma coluna Nova-Pak C18, (4µm, 3,9 x 150mm) e detector de arranjo de diodos (Waters 996), sendo a detecção fixada em 370nm. O fluxo da fase móvel foi de 1mL/min e o volume de injeção foi 20µL.

Para a definição das condições cromatográficas, foram realizados testes utilizando-se uma mistura de padrões dos cinco compostos em estudo, M, Q, L, K e A, dissolvidos em metanol, adicionado de ácido clorídrico conforme procedimento utilizado para as amostras. Neste estudo, foram testadas as seguintes fases móveis: água e acetonitrila, acidificadas com 0,3% de ácido fórmico (v/v); água e metanol, acidificados com 0,3% de ácido acético (v/v); e água e metanol, acidificados com 0,3% de ácido fórmico (v/v).

A identificação dos flavonóis e flavonas foi feita por comparação dos tempos de retenção, co-cromatografia e dos espectros obtidos através do detector de arranjo de diodos, utilizando-se padrões.

A quantificação foi realizada por padronização externa. As curvas de calibração foram construídas pela injeção em triplicata de soluções padrão em cinco concentrações diferentes, cobrindo a faixa de concentração esperada nas amostras e simulando as condições após hidrólise das hortaliças. Aliquotas da solução estoque de cada padrão foram diluídas em 1,5mL de água purificada em Milli-Q contendo ácido ascórbico (0,04% na solução de injeção). A esta solução foi adicionado 1mL de HCl 6M (equivalente a 1,2M na solução de injeção) e o volume foi completado a 5mL com metanol.

### Extração e hidrólise dos flavonóides

Para se obter a máxima eficiência de extração e hidrólise sem promover degradação, a hidrólise de cada hortaliça foi otimizada utilizando-se Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)<sup>32</sup>.

As hortaliças foram lavadas, secas com papel absorvente, e após remoção das partes não comestíveis, cortadas em porções menores que foram trituradas em processador de alimentos. As cebolas foram descascadas e trituradas em processador de alimentos. Sub-amostras de cada amostra foram pesadas, adicionadas de quantidade conhecida de água (variando conforme o tipo de amostra, em proporções de 1:0,5 a 1:2) e ácido ascórbico e homogeneizadas durante 3 minutos na velocidade 15 em homogeneizador do sistema Polytron MR2100, Kinematica-AG (Luzern, Suíça). Foram tomados 7,5g desse homogeneizado, acrescidos de 12,5mL de metanol e 5mL de HCl em diferentes concentrações molares iniciais. As soluções de extração assim obtidas consistiram-se de diferentes concentrações molares finais de HCl em solução aquosa de metanol 50% (v/v), com 0,04% de antioxidante. Estes extratos foram levados a refluxo a 90°C durante diferentes períodos. Em seguida, foram resfriados e filtrados em funil sinterizado com porosidade G2. O volume foi completado a 50mL com metanol e as soluções foram colocadas em ultra-som por 5 minutos. Aliquotas médias de 2mL foram filtradas em filtro de politetrafluoroetileno (PTFE) Millipore de 0,45µm de diâmetro, antes da análise por CLAE.

### Planejamento experimental e Análise de Superfície de Resposta

A otimização da extração e hidrólise dos flavonóis e flavonas das hortaliças estudadas foi realizada através da Análise de Superfície de Resposta. Seis DCCRs constituídos por 12 experimentos conduzidos aleatoriamente foram utilizados para avaliação da concentração do ácido e tempo de hidrólise na eficiência da extração e hidrólise dos flavonóides. A Tabela 1 apresenta os valores estudados para cada hortaliça e a Tabela 2 a matriz do planejamento com as distintas condições de hidrólise para determinação das concentrações de flavonóides nas hortaliças estudadas.

**Tabela 1.** Fatores e níveis testados (valores codificados estão entre parênteses) para o Delineamento Composto Central Rotacional.

Hortaliça	Fatores (M <sup>a</sup> /h;min <sup>b</sup> )				
	Ponto axial inferior (-α)	Nível inferior (-1)	Nível intermediário (0)	Nível superior (+1)	Ponto axial superior (+α)
Alface	0,4M/35min	0,8M/1h	1,2M/2h	1,6M/3h	2M/3h25min
Cebola	0,6M/5min	0,8M/30min	1,2M/1h30min	1,6M/2h30min	1,8M/2h55min
Couve	0,15M/1h46min	0,4M/3h	1,0M/6h	1,6M/9h	1,85M/10h14min
Espinafre	0,15M/1h46min	0,4M/3h	1,0M/6h	1,6M/9h	1,85M/10h14min
Rúcula	1,0M/2h11min	1,2M/3h	1,6M/5h	2,0M/7h	2,2M/7h49min
Salsa	0,6M/2h11min	0,8M/3h	1,2M/5h	1,6M/7h	1,8M/7h49min

<sup>a</sup>concentração molar de HCl na solução de hidrólise; <sup>b</sup>tempo de hidrólise.

**Tabela 2.** Condições experimentais do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) e as respostas para os flavonóides analisados nas hortaliças.

Ensaio	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	Concentração de flavonóides (µg/g)								
			Alface	Cebola	Couve	Espinafre	Rúcula	Salsa			
			Q	Q	Q	K	Q	K	Q	K	A
1	-1	-1	12,34	155,01	260,40	129,04	27,85	97,77	278,03	553,80	1656,39
2	-1	+1	12,24	374,25	419,38	229,11	58,21	201,70	289,56	570,00	2377,72
3	+1	-1	13,95	305,14	458,28	270,87	63,58	225,05	283,27	563,44	2603,44
4	+1	+1	11,06	232,22	175,53	117,78	58,47	204,29	281,13	557,53	2352,31
5	-1,41*	0	10,86	281,24	105,56	51,42	25,84	72,84	294,68	563,98	1722,09
6	+1,41*	0	9,06	280,77	269,82	173,73	62,40	220,25	301,00	579,72	2577,75
7	0	-1,41*	11,29	52,44	386,83	206,08	45,51	153,87	262,74	544,89	1746,17
8	0	+1,41*	11,47	311,17	404,50	242,91	73,45	233,45	288,72	575,66	2393,63
9	0	0	14,50	372,23	442,11	258,02	69,73	249,47	303,46	592,67	2564,83
10	0	0	13,68	359,33	478,22	281,81	66,64	237,33	304,66	611,87	2442,34
11	0	0	14,91	367,80	491,95	282,90	67,08	239,85	300,21	608,05	2565,50
12	0	0	13,29	334,30	485,15	275,63	66,31	234,56	301,54	592,80	2462,06

X<sub>1</sub>= concentração molar de HCl, X<sub>2</sub>= tempo de hidrólise, Q= quercetina, K=kaempferol, A=apigenina.

\*α= ±2 para X<sub>1</sub> em alface e ± 1,5 em cebola, rúcula e salsa

Os resultados obtidos na Tabela 2 foram analisados estatisticamente utilizando-se o pacote STATISTICA for Windows, versão 6.0 da STATSOFT. Verificou-se a possibilidade de ajuste de modelos codificados de segunda ordem através da Equação 1.

A análise de variância (ANOVA) foi realizada para cada flavonóide extraído das hortaliças, verificando-se a adequação dos modelos para obtenção e análise das superfícies de resposta.

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{12}X_1X_2$$

**Equação(1)**

Onde b<sub>0</sub>, b<sub>1</sub>, b<sub>2</sub>, b<sub>11</sub>, b<sub>22</sub> e b<sub>12</sub> representam os coeficientes de regressão, X<sub>1</sub> a concentração molar de HCl e X<sub>2</sub> o tempo de hidrólise.

#### Validação da extração e método cromatográfico

A faixa linear foi verificada para flavonóis e flavonas. A avaliação dos limites de detecção do equipamento (LD) foi feita pelo método da relação sinal-ruído 3:1, por diluições sucessivas dos padrões, onde determinou-se a menor quantidade detectável para cada um deles como sendo três vezes o valor da amplitude do ruído. O limite de quantificação instrumental foi considerado como sendo três vezes o LD<sup>33,34</sup>.

Para verificar a precisão do método, valores de sete repetições foram obtidos para cada hortaliça e para avaliação da exatidão, triplicatas de recuperações com adição de padrão em um nível de concentração foram obtidas para cada hortaliça. Para as amostras fortificadas, o padrão foi adicionado à amostra homogeneizada, que foi misturada e deixada por 20 minutos para acomodação do padrão na matriz. As amostras sem ou com adição de padrões foram então submetidas a extração/hidrólise otimizadas neste estudo.

Como as condições de hidrólise foram as mesmas para couve e espinafre, a recuperação foi avaliada apenas em espinafre.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Condições cromatográficas

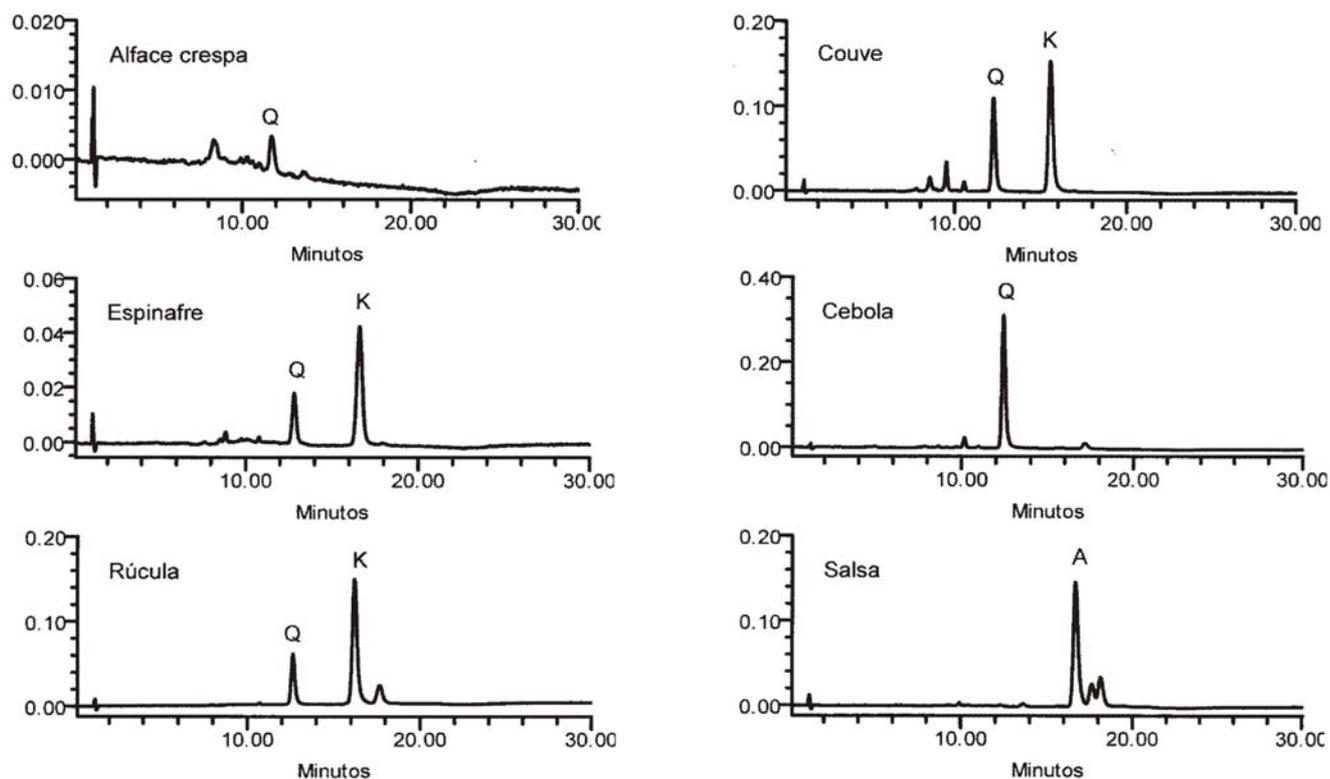
Com a fase móvel água e acetonitrila, acidificadas com 0,3% de ácido fórmico, não foi possível uma boa separação entre os picos de quercetina e luteolina. Conseguiu-se uma boa separação dos compostos em estudo, com água e metanol, acidificados com 0,3% de ácido acético, porém os picos apresentaram cauda. Água e metanol, acidificados com 0,3% de ácido fórmico,

proporcionaram boa separação dos compostos em estudo, sendo que os picos não apresentaram cauda. Esta foi a fase móvel escolhida, e extratos hidrolisados das amostras, com e sem acréscimo de padrões, foram injetados no cromatógrafo sob as melhores condições conseguidas para os padrões, fazendo-se os ajustes necessários para a melhor resolução dos picos. O gradiente que melhor separou os flavonóides das amostras investigadas foi o mesmo conseguido para a separação dos padrões: iniciando em 20:80 de metanol:água (acidificados com ácido fórmico), chegando a 45:55 em 5 minutos, 48:52 em 17 minutos e 20:80 em 20 minutos, sempre com gradiente linear. O tempo de condicionamento da coluna foi de 10-15 minutos.

Cromatogramas típicos dos flavonóides agliconas para cada extrato das hortaliças são apresentados na Figura 1. Os flavonóides M, Q, L, K e A eluíram nesta seqüência nos tempos de retenção de 10,4 minutos, 12,5 minutos, 14,0 minutos, 16,2 minutos e 16,6 minutos, respectivamente.

### Análise dos resultados dos DCCRs utilizados na otimização da extração/hidrólise das agliconas

As amostras de alface e cebola apresentaram apenas o flavonol quercetina. Salsa apresentou a flavona apigenina. Couve, espinafre e rúcula apresentaram os flavonóis quercetina e kaempferol (Figura 1).



**Figura 1.** Cromatogramas típicos dos flavonóides agliconas Q=quercetina, K=kaempferol e A=apigenina, dos extratos hidrolisados de alface crespa, couve, espinafre, cebola, rúcula e salsa. Condições cromatográficas: coluna Nova-Pak C18; fase móvel iniciando em 20:80 de metanol:água (acidificados com 0,3% de ácido fórmico), chegando a 45:55 em 5 minutos, 48:52 em 17 e 20:80 em 20 minutos, sempre em gradiente linear, detecção fixada a 370nm.

Na etapa de hidrólise/extração, o objetivo é liberar os açúcares ligados às agliconas, para que estas sejam mais facilmente identificadas e quantificadas. Essa etapa deve ser eficaz na quebra das ligações glicosídicas, porém sem degradar as agliconas liberadas. Assim, considera-se que se utilizarmos uma concentração muito alta de ácido por um longo período, podemos liberar completamente as agliconas, porém acelerar sua degradação. Se utilizarmos uma concentração de ácido baixa por curto período, a liberação das agliconas pode não ser completa. Desta maneira, a interação que pode ocorrer no efeito destas duas variáveis, indica que as melhores

condições devem ser alcançadas quando utilizamos uma baixa concentração de ácido por um período mais longo, ou um tempo de hidrólise mais curto com concentração mais elevada de ácido. Estas diferentes condições dependerão dos tipos de glicosídeos presentes na amostra, bem como do tipo de matriz analisada.

A Tabela 3 apresenta os coeficientes de regressão para as agliconas extraídas das hortaliças analisadas. Para a elaboração dos modelos, em função das variáveis estudadas, adotou-se 5% de significância na avaliação estatística dos coeficientes de regressão obtidos.

**Tabela 3.** Estimativas dos coeficientes da regressão do modelo polinomial quadrático e significância (p-valor), para a resposta dos teores de flavonóides agliconas nas hortaliças analisadas.

	ALFACE		CEBOLA	
	Quercetina		Quercetina	
	Coeficientes	p-valor	Coeficientes	p-valor
B <sub>0</sub>	14,20*	<0,0001	359,28*	<0,0001
B <sub>1</sub>	-0,26	0,3528	0,87	0,9500
B <sub>11</sub>	-1,01*	0,0021	-28,26	0,0898
B <sub>2</sub>	-0,34	0,3273	64,08*	0,0034
B <sub>22</sub>	-1,21*	0,0177	-80,90*	0,0020
B <sub>12</sub>	-0,70	0,1756	-73,04*	0,0093
COUVE				
	Quercetina		Kaempferol	
	Coeficientes	p-valor	Coeficientes	p-valor
	B <sub>0</sub>	474,24*	<0,0001	274,53*
B <sub>1</sub>	23,27	0,2603	25,44*	0,0476
B <sub>11</sub>	-134,62*	0,0007	-76,74*	0,0005
B <sub>2</sub>	-12,39	0,5326	-0,14	0,9898
B <sub>22</sub>	-30,02	0,2027	-20,44	0,1256
B <sub>12</sub>	-110,43*	0,0058	-63,29*	0,0047
ESPINAFRE				
	Quercetina		Kaempferol	
	Coeficientes	p-valor	Coeficientes	p-valor
	B <sub>0</sub>	67,44*	<0,0001	240,27*
B <sub>1</sub>	10,97*	0,0001	42,34*	0,0002
B <sub>11</sub>	-11,65*	0,0001	-43,99*	0,0003
B <sub>2</sub>	8,11*	0,0004	24,49*	0,0035
B <sub>22</sub>	-3,92*	0,0237	-20,29*	0,0139
B <sub>12</sub>	-8,86*	0,0017	-31,17*	0,0058
RÚCULA				
	Quercetina		Kaempferol	
	Coeficientes	p-valor	Coeficientes	p-valor
	B <sub>0</sub>	302,36*	<0,0001	601,17*
B <sub>1</sub>	0,74	0,6879	2,44	0,5039
B <sub>11</sub>	-2,83	0,1755	-14,36*	0,0074
B <sub>2</sub>	5,77*	0,0189	6,73	0,1069
B <sub>22</sub>	-14,45*	0,0004	-22,27*	0,0014
B <sub>12</sub>	-3,42	0,2294	-5,53	0,3125
SALSA				
	Apigenina			
	Coeficientes	p-valor		
	B <sub>0</sub>	2511,97*	<0,0001	
B <sub>1</sub>	259,43*	0,0005		
B <sub>11</sub>	-136,23*	0,0145		
B <sub>2</sub>	173,41*	0,0045		
B <sub>22</sub>	-190,74*	0,0051		
B <sub>12</sub>	-243,11*	0,0047		

\*p-valor < 0,05

As equações codificadas com os parâmetros estatisticamente significativos, os coeficientes de determinação ( $R^2$ ), F calculados e F tabelados estão apresentados na Tabela 4.

Pelos coeficientes de determinação ( $R^2$ ) e F calculados obtidos, observa-se que os resultados experimentais tiveram um excelente ajuste aos modelos obtidos ( $R^2$  entre 0,85 e 0,98), com exceção da extração/

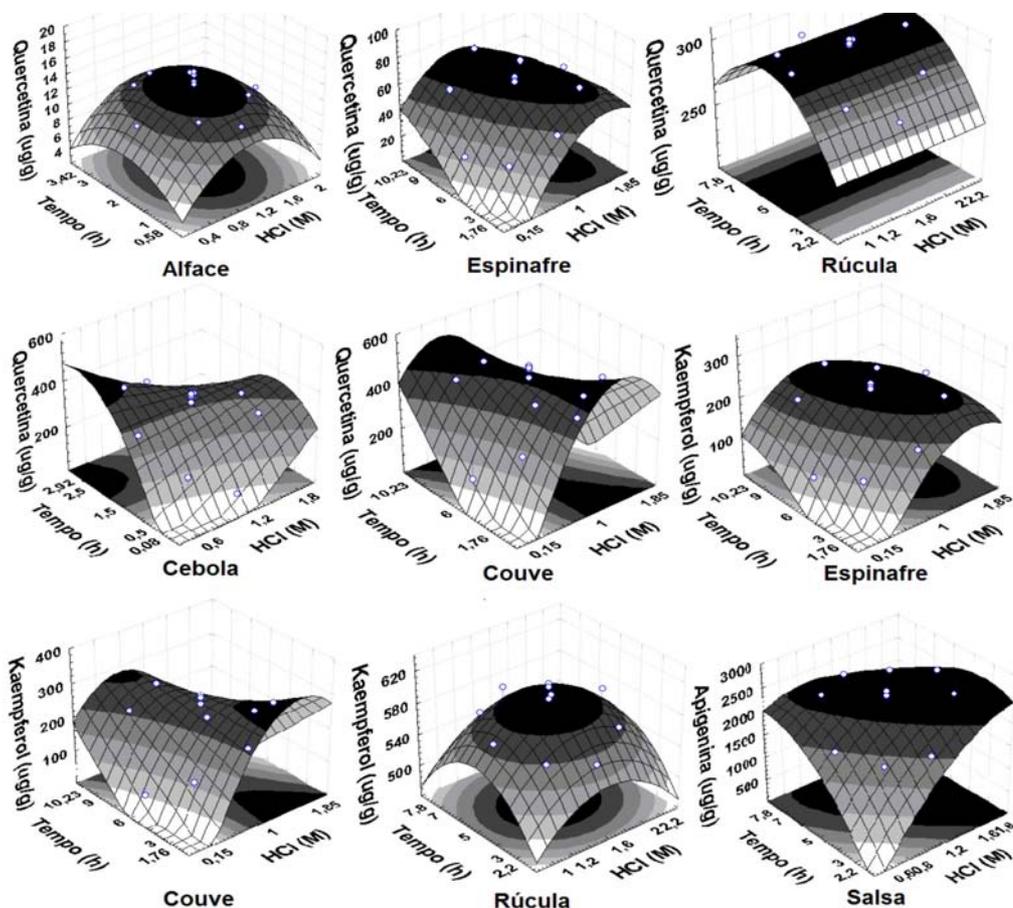
hidrólise de quercetina em alface e kaempferol em rúcula, com  $R^2$  de 0,74 e 0,77, respectivamente, apresentando valores mais baixos, porém estatisticamente aceitáveis<sup>32</sup>.

Assim, foi possível gerar as nove superfícies de respostas apresentadas na Figura 2. Observa-se pelos eixos das respostas que as figuras estão apresentadas em ordem crescente dos teores de flavonóides.

**Tabela 4.** Equações que representam os teores de agliconas (Y) em função da concentração molar de HCl ( $X_1$ ) e tempo de hidrólise ( $X_2$ ) presentes nas hortaliças estudadas.

		EQUAÇÃO Y = ( $\mu\text{g}$ Aglicona/g hortaliça) (Valores de $X_1$ e $X_2$ codificados)	$R^2$	F <sub>CAL</sub>	F <sub>TAB</sub> ( $\alpha$ , $v_R$ , $v_r$ )
Alface	Q	$Y = 14,20 - 1,01 X_1^2 - 1,21 X_2^2$	0,74	15,87	4,26
Cebola	Q	$Y = 359,28 + 64,08 X_2 - 80,90 X_2^2 - 73,04 X_1 X_2$	0,86	15,84	4,07
Couve	Q	$Y = 474,24 - 134,62 X_1^2 - 110,43 X_1 X_2$	0,85	25,38	4,26
	K	$Y = 274,53 + 25,44 X_1 - 76,74 X_1^2 - 63,29 X_1 X_2$	0,88	19,47	4,07
Espinafre	Q	$Y = 67,44 + 10,97 X_1 - 11,65 X_1^2 + 8,11 X_2 - 3,92 X_2^2 - 8,86 X_1 X_2$	0,98	51,18	4,39
	K	$Y = 240,27 + 42,34 X_1 - 43,99 X_1^2 + 24,49 X_2 - 20,29 X_2^2 - 31,17 X_1 X_2$	0,96	34,17	4,07
Rúcula	Q	$Y = 302,36 + 5,77 X_2 - 14,45 X_2^2$	0,85	25,23	4,26
	K	$Y = 601,17 - 14,36 X_1^2 - 22,27 X_2^2$	0,77	37,13	4,26
Salsa	A	$Y = 2511,97 + 259,43 X_1 - 136,23 X_1^2 + 173,41 X_2 - 190,74 X_2^2 - 243,11 X_1 X_2$	0,95	22,99	4,39

$R^2$ = coeficiente de determinação;  $F_{\text{Calc}} = (QM_{\text{Regressão}}/QM_{\text{Resíduo}})$ ; Q=quercetina; K=kaempferol; A=apigenina.  
 $\alpha$ = nível de significância (5%);  $v_R$ =graus de liberdade da regressão;  $v_r$ =graus de liberdade dos resíduos



**Figura 2.** Superfícies de resposta para a determinação das agliconas quercetina, kaempferol e apigenina.

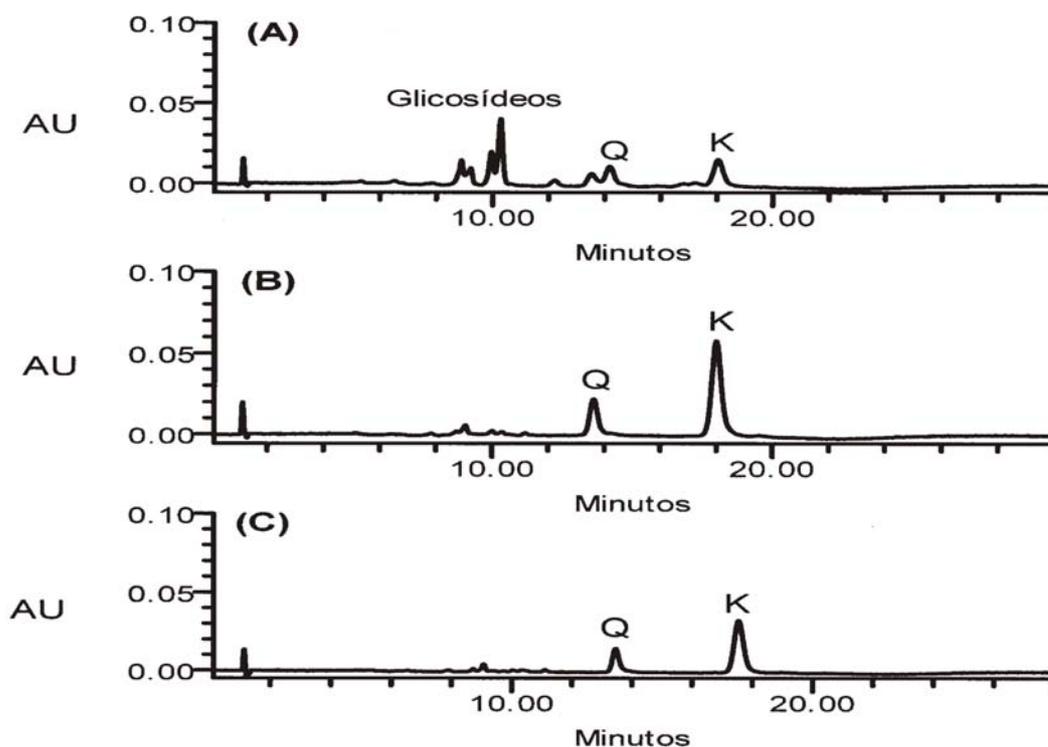
Alface foi a hortaliça com menor teor de quercetina. Espinafre, rúcula, cebola e couve apresentaram teores crescentes deste flavonol. Kaempferol foi encontrado em espinafre, couve e rúcula, sendo a rúcula, a hortaliça mais rica neste composto. Salsa apresentou altos teores de apigenina.

Através das superfícies de resposta geradas, determinou-se as faixas de concentração molar de HCl e tempo de hidrólise ótimos para cada aglicona presente nas hortaliças analisadas. As melhores condições de extração/hidrólise foram estabelecidas, em: 1,2M de HCl por 2 horas para alface, 0,8M de HCl por 2,5h para cebola, 1,0M de HCl por 6 horas para couve e espinafre, 1,6M de HCl por 5 horas para rúcula e 1,7M de HCl por 4,3 horas para salsa.

A Figura 3 apresenta os cromatogramas obtidos da amostra de espinafre submetida a diferentes condições de hidrólise: (A) com HCl 0,15M por 6 horas, onde ainda pode-se observar a presença de glicosídeos, indicando uma hidrólise incompleta destes compostos a agliconas; (B) com HCl 1,0M por 6 horas, condição ótima obtida a partir da superfície de resposta, onde podemos verificar que todos os glicosídeos foram hidrolisados e (C) com HCl 1,0M por 10,23 horas, condição na qual os compostos de interesse já sofreram degradação, apresentando menores teores. Para algumas matrizes e condições de hidrólise, a presença de picos de degradação pode ser observada.

**Tabela 5.** Propriedades das curvas padrão.

Flavonóide	Faixa de concentração (µg/mL)	Coefficiente de determinação (r <sup>2</sup> )	Coefficiente de variação entre as triplicatas (%)
Miricetina	7 – 60	0,9988	0,8
Quercetina	9,4 – 84	0,9996	1,8
Luteolina	7,1 – 61,2	0,9990	1,5
Kaempferol	14,3 – 125,5	0,9998	1,8
Apigenina	7,1 – 60,6	0,9998	2,2



**Figura 3.** Cromatogramas típicos dos flavonóides agliconas Q=quercetina, K=kaempferol, dos extratos hidrolisados de espinafre, obtidos após diferentes condições de hidrólise (A) com HCl 0,15M por 6 horas; (B) com HCl 1,0M por 6 horas e (C) com HCl 1,0 M por 10,23 horas. Condições cromatográficas: coluna Nova-Pak C18; fase móvel iniciando em 20:80 de metanol:água (acidificados com 0,3% de ácido fórmico), chegando a 45:55 em 5 minutos, 48:52 em 17 e 20:80 em 20 minutos, sempre em gradiente linear, detecção fixada a 370nm.

### Avaliação da metodologia analítica

As curvas padrão passaram pela origem e apresentaram boa linearidade nas faixas de concentração estabelecidas (Tabela 5). Os coeficientes de correlação obtidos foram superiores a 0,99. Os limites de detecção obtidos para M, Q, L, K e A foram, respectivamente, 0,5; 0,4; 0,5; 0,6 e 1,0 µg/mL. A precisão (repetitividade) do método foi demonstrada pelos coeficientes de variação das replicatas (Tabela 6), que variaram de 0,75 para cebola a 5,0 para alface. As taxas de recuperação para os flavonóides das diferentes hortaliças analisadas estão apresentadas na Tabela 7, variando de 89,9% para quercetina em rúcula a 102,1% para quercetina em alface. Essas características comprovam o excelente desempenho do método analítico.

**Tabela 6.** Teores de flavonóides nas amostras e seus respectivos coeficientes de variação.

Amostra	Concentração (µg/g)*	Coeficiente de variação (%)
Alface	Q 70,52 ± 3,55	5,00
Cebola	Q 299,60 ± 2,24	0,75
Couve	Q 265,39 ± 11,47	4,32
	K 337,51 ± 16,67	4,94
Espinafre	Q 31,17 ± 0,54	1,73
	K 161,96 ± 3,92	2,42
Rúcula	Q 251,18 ± 4,52	1,80
	K 945,98 ± 9,42	1,00
Salsa	A 2143,43 ± 58,04	2,71

\*média de sete repetições, Q=quercetina, K=kaempferol, A=apigenina.

**Tabela 7.** Quantidades adicionadas, percentagens de recuperação e coeficientes de variação (CV) das recuperações dos flavonóides estudados.

Flavonóide	Quantidade adicionada (µg/g)	Recuperação <sup>a</sup> (%)	CV (%)
Alface	Q 27,9	102,1	0,2
Cebola	Q 166,7	96,3	3,9
Espinafre	Q 16,73	92,0	0,9
	K 77,8	91,8	1,1
Rúcula	Q 147,14	89,9	0,9
	K 525,70	92,7	2,4
Salsa	A 672,34	102,0	5,0

<sup>a</sup>média de três determinações, Q=quercetina, K=kaempferol, A=apigenina. CV= coeficiente de variação.

### CONCLUSÕES

A melhor condição cromatográfica para a determinação de flavonóis e flavonas nas amostras estudadas, foi obtida com o uso de coluna de fase reversa C18 Nova-Pak (4µm, 3,9 x 150mm), utilizando-se como fase móvel metanol e água, acidificados com 0,3% de ácido fórmico, em gradiente linear,

iniciando em 20:80, chegando a 45:55 em 5 minutos, 48:52 em 17 minutos e 20:80 em 20 minutos, com fluxo de 1mL/min e volume de injeção de 20µL.

A análise por superfície de resposta foi imprescindível na otimização da extração/hidrólise dos flavonóis e flavonas, sendo possível estabelecer as condições ótimas de concentração molar de HCl e tempo de hidrólise para cada hortaliça.

Com base nesta otimização, fica evidente que as condições ótimas de hidrólise para análise de flavonóides variam e devem ser determinadas para cada matriz estudada.

### REFERÊNCIAS

- Anderson RF, Amarasinghe C, Fisher LJ, Mak WB, Packer JE. Reduction in free-radical-induced DNA strand breaks and base damage through fast chemical repair by flavonoids. *Free Rad Res* 2000; 33: 91-103.
- Hertog MGL, Feskens EJM, Hollman PCH, Katan MB, Kromhout D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet* 1993; 342: 1007-1011.
- Hollman PCH, Hertog MGL, Katan MB. Role of dietary flavonoids in protection against cancer and coronary heart disease. *Biochem Soc Trans* 1996; 24: 785-9.
- Hollman PCH. Evidence for health benefits of plant phenols: local or systemic effects? *J Sci Food Agric* 2001; 81: 842-52.
- Knekt P, Jarvinen R, Reunanen A, Maatela J. Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. *Brit Med J* 1996; 312: 478-81.
- Middleton Jr E, Kandaswami, C. Effects of flavonoids on immune and inflammatory functions. *Biochem Pharmacol* 1992; 43: 1167-79.
- Middleton Jr E, Kandaswami C. The impact of plant flavonoids on mammalian biology: implications for immunity, inflammation and cancer. In: Harborne JB, editor. *The flavonoids*. London: Chapman and Hall; 1994.
- Castelluccio C, Paganga G, Melikian N, Bolwell GP, Pridham J, Sampson J et al. Antioxidant potential of intermediates in phenylpropanoid metabolism in higher plants. *Febs Lett* 1995; 368: 188-92.
- Kandaswami C, Middleton E. Free radical scavenging and antioxidant activity of plant flavonoids. *Adv Exp Med Biol* 1994; 366: 351-76.
- Rice-Evans CA, Miller NJ, Bolwell GP, Bramley PM, Pridham JB. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Rad Res* 1995; 22: 375-83.
- Rice-Evans CA, Miller, NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med* 1996; 20: 933-56.
- Freedman JE, Parker C, Li L, Perlman JA, Frei B, Ivanov V et al. Select flavonoids and whole juice from purple

- grapes inhibit platelet function and enhance nitric oxide release. *Circulation* 2001; 103: 2792-98.
13. Tzeng SH, Ko WC, Ko FN, Teng CM. Inhibition of platelet aggregation by some flavonoids. *Thromb Res* 1991; 64: 91-100.
  14. Kuntz S, Wenzel U, Daniel H. Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines. *Eur J Clin Nutr* 1999; 38: 133-42.
  15. Wenzel U, Kuntz S, Brendel MD, Daniel H. Dietary flavone is a potent apoptosis inducer in human colon carcinoma cells. *Cancer Res* 2000; 60: 3823-31.
  16. Yang CS, Landau JM, Huang MT, Newmark HL. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annu Rev Nutr* 2001; 21: 381-406.
  17. Schroeter H, Boyd C, Spencer JPE, Williams RJ, Cadenas E, Rice-Evans C. MAPK signaling in neurodegeneration: influences of flavonoids and of nitric oxide. *Neurobiol Aging* 2002; 23: 861-80.
  18. Crozier A, Lean MEJ, McDonald MS, Black C. Quantitative analysis of the flavonoid content of commercial tomatoes, onions, lettuce, and celery. *J Agric Food Chem* 1997; 45: 590-5.
  19. Hertog MGL, Hollman PCH, Katan MB. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. *J Agric Food Chem* 1992; 40: 2379-83.
  20. Hertog MGL, Hollman PCH, van de Putte B. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions, wines and fruit juices. *J Agric Food Chem* 1993; 41: 1242-6.
  21. Hertog MGL, Hollman PCH, Venema DP. Optimization of a quantitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavonoids in vegetables and fruits. *J Agric Food Chem* 1992; 40: 1591-8.
  22. McDonald M, Hughes M, Burns J, Lean MEJ, Matthews D, Crozier A. Survey of the free and conjugated myricetin and quercetin content of red wines of different geographical origins. *J Agric Food Chem* 1998; 46: 368-75.
  23. Vries J, Janssen K, Hollman PCH, Van Staveren WA, Katan MB. Consumption of quercetin and kaempferol in free-living subjects eating a variety of diets. *Cancer Lett* 1997; 114: 141-4.
  24. Merken HM, Beecher GR. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: A review. *J Agric Food Chem* 2000; 48: 577-99.
  25. DiCarlo G, Mascolo N, Izzo AA, Capasso F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sci* 1999; 65(4): 337-53.
  26. Erlund I. Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutr Res* 2004; 24: 851-74.
  27. Hermann K. On the occurrence of flavonol and flavone glycosides in vegetables. *Z Lebensm Unters Forsch A* 1988; 186: 1-5.
  28. Häkkinen SH, Kärenlampi SO, Heinonen IM, Mykkänen HM, Törrönen AR. HPLC method for screening of flavonoids and phenolic acids in berries. *J Sci Food Agric* 1998; 77:543-51.
  29. Nuutila AM, Kammiovirta K, Oksman-Caldentey KM. Comparison of methods for the hydrolysis of flavonoids and phenolic acids from onion and spinach for HPLC analysis. *Food Chem* 2002; 76: 519-25.
  30. Haaland PO. *Experimental design in biotechnology*. New York: Marcel Dekker; 1989.
  31. Box GEP, Hunter WG, Hunter JS. *Statistics for experimenters: an introduction to design, data analysis and model building*. New York: Wiley; 1978.
  32. Rodrigues MI, Iemma AF. *Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos*. Campinas: Casa do Pão Editora; 2005.
  33. Caulett R, Boddy R. *Statistic for analytical chemists*. 1st ed. London: Chapman and Hall; 1983.
  34. Ribani M, Bottoli CBG, Collins CH, Jardim ICSF, Melo LFC. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quím Nova* 2004; 27: 771-80.

## AGRADECIMENTOS

À CAPES pela concessão da bolsa à primeira autora, à FAPESP e ao CNPq, pelo financiamento dos projetos PRONEX n° 2003/10151-4 e Projeto Universal n°477189/2004-0, respectivamente

# Avaliação da capacidade antioxidante do extrato de gengibre (*Gengiber officinale*) adicionado ao óleo de soja em teste de estocagem acelerada

## Evaluation of the antioxidant capacity of ethanolic ginger extract (*Gengiber officinale*) in accelerated incubator-storage test

RIALA6/1121

Denise ANDREO, Neuza JORGE\*

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

Recebido: 02/05/2007 – Aceito para publicação: 30/08/2007

### RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade antioxidante do extrato etanólico de gengibre em óleo de soja, submetido ao teste de estocagem acelerada. Quatro tratamentos foram preparados e submetidos a um teste de estocagem acelerada em estufa, a 60°C durante 12 dias: óleo de soja refinado (OSR) isento de antioxidantes sintéticos – OSR (controle), óleo de soja adicionado de 2.500mg/kg de extrato etanólico de gengibre – OSR + EG, óleo de soja adicionado de 50 mg/kg do antioxidante sintético TBHQ (terc-butilhidroquinona) – OSR + TBHQ e óleo de soja adicionado de 2.500mg/kg de extrato etanólico de gengibre mais 50 mg/kg de TBHQ – OSR + M. Amostras de cada tratamento foram recolhidas nos tempos 0, 3, 6, 9 e 12 dias de estocagem, e analisadas quanto ao índice de peróxidos e dienos conjugados. Os resultados das determinações analíticas mostraram que a capacidade antioxidante no extrato de gengibre decresce de acordo com os tratamentos utilizados e na seguinte ordem: OSR + M = OSR + TBHQ > OSR + EG > OSR.

**Palavras-chave.** antioxidante, estocagem acelerada, estufa, gengibre, óleo de soja.

### ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the antioxidant capacity of ginger ethanolic extract in soybean oil exposed to the accelerated incubator-storage test. Four treatments were prepared and analyzed by means of accelerated storage test in incubator at 60°C during 12 days: synthetic antioxidant substance free - refined soybean oil (RSO) (control), soybean oil supplemented with 2500 mg/kg of ethanolic ginger extract – RSO + EG, soybean oil supplemented with 50 mg/kg of synthetic antioxidant substance TBHQ (Terc-butylhydroquinone) – RSO + TBHQ, and soybean oil supplemented with 2500 mg/kg of ethanolic ginger extract and 50 mg/kg of TBHQ – RSO + M. Samples from each treatment were collected at 0, 3, 6, 9 and 12 days of storage, and peroxide index and conjugated dienes were determined. The results from this analytical determination showed that the antioxidant capacity in ethanolic ginger extract decreases according to exposed treatment in the following order: OSR + M = OSR + TBHQ > OSR + EG > OSR.

**Key words.** antioxidant, accelerated storage incubator, ginger, soybean oil.

## INTRODUÇÃO

Óleos e gorduras são compostos pertencentes ao grupo dos lipídios, formados principalmente por triacilgliceróis, que são ésteres de ácidos graxos com glicerol<sup>1</sup>.

Os óleos e gorduras são importantes no processamento de alimentos, pois conferem sabor agradável, textura e aroma particulares às preparações<sup>2</sup>.

Durante o processo de aquecimento, os óleos são continuamente expostos a vários fatores que levam a uma grande diversidade de reações químicas, tais como: hidrólise, oxidação e polimerização da molécula do triacilglicerol, favorecendo a formação de radicais livres e diversas substâncias nocivas à saúde do ser humano<sup>3</sup>.

Com o objetivo de retardar os processos oxidativos, alguns compostos antioxidantes são adicionados aos alimentos. Estas substâncias com a capacidade de retardar as oxidações lipídicas podem ser naturais ou sintéticas, e atuam de diversas maneiras: interrompendo a cadeia de reações oxidativas; cedendo um hidrogênio a um radical lipídico livre e assumindo a forma de radical estável, diminuindo assim, o número de radicais livres; reduzindo a velocidade da oxidação e prolongando-se o período de indução, que consiste no tempo que o material analisado necessita para começar a apresentar sinais detectáveis de oxidação<sup>4</sup>.

Os antioxidantes podem ser classificados de acordo com seu mecanismo de ação como primários ou secundários. Alguns antioxidantes primários com baixa atividade antioxidante podem ser combinados, atuando como sinergistas. Dessa forma, um antioxidante sintético, por exemplo, pode ser utilizado em baixas concentrações se o sinergista é simultaneamente adicionado ao alimento<sup>4</sup>.

No entanto, o emprego de antioxidantes sintéticos na indústria de alimentos tem sido alvo de questionamentos quanto a sua inocuidade e, devido a isso, pesquisas estão voltadas para a busca de compostos naturais que exibam esta propriedade funcional, atuando sozinhos ou sinergisticamente com outros aditivos, como alternativa para prevenir a deterioração oxidativa de alimentos e diminuir o uso dos antioxidantes sintéticos<sup>5</sup>.

Dentre as fontes de antioxidantes naturais podem-se citar as frutas, as ervas e as especiarias, tais como o alecrim, a sálvia e o gengibre<sup>6,7,8</sup>.

O gengibre (*Gengiber officinale*) é uma especiaria, comumente utilizada devido ao seu aroma doce e sabor pungente. O rizoma de gengibre também é conhecido devido a sua atividade antioxidante<sup>9</sup>.

Em estudo realizado por Zancan et al<sup>10</sup>, concluiu-se que a atividade antioxidante da oleoresina de gengibre deve-se principalmente aos gingeróis e shogaóis, substâncias que conferem ao gengibre *in natura* seu sabor característico.

Em estudos anteriores ficou comprovado que a extração dos compostos bioativos do gengibre é mais eficiente quando são utilizados solventes com polaridade intermediária, como o grupo dos álcoois, por exemplo<sup>11,12</sup>. Devido a isso, o etanol foi

selecionado para este estudo. Além disso, sabe-se também que o etanol não é um solvente tóxico e os resíduos gerados pela extração não causam agressões ao meio ambiente.

Para verificar a estabilidade de óleos adicionados de antioxidantes pode-se utilizar a sua estocagem em condições normais e aceleradas, com aumento de temperatura, e realizar análises periódicas para acompanhar as alterações químicas, físicas e sensoriais<sup>13,14</sup>.

Diante disso, este trabalho objetivou a avaliação da capacidade antioxidante do extrato etanólico de gengibre, adicionado ao óleo de soja submetido ao teste acelerado em estufa, e também o seu efeito sinérgico com o antioxidante sintético terc-butilhidroquinona (TBHQ), utilizado atualmente pelas indústrias de alimentos com o objetivo de retardar as alterações oxidativas.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Óleo

Para a realização do experimento foi utilizado óleo de soja refinado (OSR), sem adição de antioxidantes sintéticos, conforme informações fornecidas pela indústria fabricante da marca utilizada. Utilizou-se embalagens contendo 900mL de óleo de soja refinado, adquiridos no comércio do município de Uberlândia-MG. As amostras de óleo adquiridas eram todas do mesmo lote e estavam dentro do prazo de validade indicado na embalagem.

### Gengibre

Neste trabalho, utilizou-se, aproximadamente, 1kg de rizomas de gengibre (*Gengiber officinale*) *in natura*, adquiridos no comércio do município de São José do Rio Preto-SP. Os rizomas de gengibre *in natura* foram fatiados, colocados em bandejas de alumínio e desidratados em estufa com circulação de ar à temperatura de 55°C durante, aproximadamente, 24 horas<sup>11</sup>. Após a desidratação, o material foi triturado em moinho de facas, até transformar-se em pó fino. O gengibre em pó foi armazenado em pote de vidro tampado, inertizado com fluxo de nitrogênio e congelado a -18°C até o momento da utilização.

### Antioxidantes

O antioxidante sintético utilizado foi o TBHQ, apresentado na forma de pó, cedido pela empresa Danisco S/A.

O extrato etanólico de gengibre foi obtido de acordo com a metodologia descrita por Rehman, Salariya e Habib<sup>11</sup>. O gengibre desidratado (10g) foi mantido sob agitação permanente, em etanol (100mL), à temperatura ambiente (25 ± 2°C) durante 12 horas e, em seguida, centrifugado a 3.000rpm, por 10 minutos. Após a transferência do sobrenadante, o precipitado foi novamente submetido ao processo de extração nas mesmas condições anteriormente explicitadas, e os sobrenadantes resultantes de cada extração foram combinados. Em seguida, procedeu-se a remoção do

solvente, em evaporador rotativo sob pressão reduzida a 40°C. O extrato seco foi pesado e ressuspenso em etanol, obtendo-se uma solução-estoque contendo um grama de extrato etanólico para cada dez gramas de solvente etanol (1:10g/g), utilizada para aplicação direta no óleo de soja refinado.

### Ensaio experimental

Quatro tratamentos foram submetidos ao teste de oxidação acelerada em estufa a 60°C:

- Óleo de soja refinado, sem adição de antioxidantes – controle (OSR);
- Óleo de soja refinado, com adição de 2.500mg/kg de extrato de gengibre (OSR + EG);
- Óleo de soja refinado, com adição de 50mg/kg de TBHQ (OSR + TBHQ);
- Óleo de soja refinado, com adição da mistura de antioxidantes, ou seja, 2.500 mg/kg de extrato etanólico de gengibre e 50mg/kg de TBHQ (OSR + M).

Os tratamentos foram realizados em estufa aquecida, utilizando-se béqueres de 50mL contendo 40mL de óleo. A temperatura utilizada foi 60°C, normalmente utilizada em testes de estocagem acelerada<sup>15,16</sup>. O aquecimento foi conduzido de modo contínuo por 12 dias e amostras foram recolhidas a cada três dias (0, 3, 6, 9 e 12 dias).

O ensaio foi conduzido em duas repetições e as amostras foram analisadas quanto ao índice de peróxidos e dienos conjugados.

### Métodos

Com o objetivo de avaliar as alterações oxidativas primárias, utilizou-se as análises físico-químicas de peróxidos e dienos conjugados para a avaliação dos resultados obtidos após o teste de estocagem acelerada.

### Índice de peróxidos

Denomina-se índice de peróxidos a quantidade de oxigênio ativo, calculada em miliequivalentes, contida em um quilograma de óleo medida a partir do iodo liberado do iodeto de potássio pelos peróxidos presentes no óleo. Foi determinado segundo a norma da AOCS Cd 8-53<sup>17</sup>.

### Dienos conjugados

Este método determina dienos conjugados de ligações insaturadas, expressos como porcentagens de ácidos dienóicos conjugados. A determinação de dienos conjugados foi efetuada por meio do método oficial AOCS Ti 1a-64<sup>17</sup>.

### Análise dos dados

Foram considerados os seguintes fatores: tratamentos (OSR, OSR + EG, OSR + TBHQ, OSR + M) e tempos de aquecimento (0, 3, 6, 9 e 12 dias).

Os resultados obtidos de índice de peróxidos e dienos conjugados, em duas repetições, foram submetidos às análises de variância para determinar a influência dos fatores, sobre a alteração dos óleos submetidos ao teste acelerado em estufa. O experimento foi realizado em esquema fatorial 4 x 5, no delineamento inteiramente casualizado<sup>18</sup>. Foi aplicado o teste de Tukey, e as análises de variância foram obtidas pelo programa ESTAT, versão 2.0.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As alterações oxidativas primárias podem ser avaliadas por meio da determinação de hidroperóxidos e dienos conjugados, formados pela perda de ácidos graxos insaturados, devido à presença de oxigênio. Já as alterações secundárias são acompanhadas pela formação de compostos carbonila, malonaldeído e outros aldeídos, hidrocarbonetos e produtos fluorescentes<sup>19,20</sup>.

### Índice de peróxidos

O índice de peróxidos pode ser utilizado para quantificar os hidroperóxidos formados no alimento durante um período de estocagem. Com isso, é possível também verificar o efeito do antioxidante na estabilidade do óleo.

A Tabela 1 apresenta os resultados médios de índice de peróxidos para os tratamentos OSR, OSR + EG, OSR + TBHQ e OSR + M, submetidos ao teste acelerado em estufa a 60°C por 12 dias. Em cada tempo, a atividade antioxidante dos tratamentos é maior quanto menor o índice de peróxidos em relação ao controle.

**Tabela 1.** Valores médios de índice de peróxidos (meq/kg) para os tratamentos submetidos ao teste acelerado em estufa a 60°C.

Tratamentos	Tempos de aquecimento (dias)				
	0	3	6	9	12
OSR	0,79 <sup>eA</sup>	2,11 <sup>dA</sup>	21,93 <sup>eA</sup>	46,28 <sup>bA</sup>	61,56 <sup>aA</sup>
OSR + EG	0,54 <sup>eA</sup>	1,78 <sup>dA</sup>	4,53 <sup>cB</sup>	14,46 <sup>bB</sup>	26,63 <sup>aB</sup>
OSR + TBHQ	0,89 <sup>dA</sup>	1,64 <sup>dA</sup>	3,03 <sup>cC</sup>	5,09 <sup>bC</sup>	6,08 <sup>aC</sup>
OSR + M	0,54 <sup>eA</sup>	1,43 <sup>eA</sup>	2,77 <sup>bC</sup>	4,27 <sup>aC</sup>	5,21 <sup>aC</sup>

(OSR): óleo de soja refinado, TBHQ: antioxidante sintético terc-butilhidroquinona, (OSR + EG) – OSR + 2.500 mg/kg de extrato de gengibre, (OSR + TBHQ) – OSR + 50 mg/kg de TBHQ, (OSR + M) – OSR + 2.500 mg/kg de extrato de gengibre + 50 mg/kg de TBHQ.

a, b ... (linha) – em cada Tratamento, médias de Tempos de aquecimento seguidas de mesma letra minúscula, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P > 0,05).

A, B ... (coluna) – em cada Tempo de aquecimento, médias de Tratamentos seguidas de mesma letra maiúscula, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P > 0,05).

Pode-se verificar pela análise na Tabela 1, um acréscimo no índice de peróxidos, em todos os tratamentos, com o tempo de aquecimento dos óleos na estufa, o que indica o desenvolvimento de produtos primários da oxidação lipídica. Nos óleos de soja adicionados do antioxidante sintético TBHQ e da mistura, observa-se um aumento menos drástico ao longo dos tempos de aquecimento.

Com relação aos tratamentos dentro de cada tempo de aquecimento, nota-se que em até 3 dias de aquecimento não foi observada diferença significativa entre as médias dos índices de peróxidos para os tratamentos estudados. Os tratamentos OSR + EG, OSR + TBHQ e OSR + M demonstraram um desempenho estatisticamente diferente do controle (OSR) somente a partir de 6 dias de aquecimento na estufa. O TBHQ e a mistura de antioxidantes adicionados ao óleo de soja apresentaram comportamento semelhante quanto à formação de peróxidos em todos os tempos de aquecimento. Além disso, ao final do experimento, as atividades antioxidantes do TBHQ e da mistura foram superiores à atividade do extrato de gengibre na concentração de 2.500mg/kg.

Os tratamentos OSR + EG, OSR + TBHQ e OSR + M foram eficientes na proteção do óleo, com relação à formação de peróxidos; o extrato de gengibre reduziu em 57%, o TBHQ reduziu em 90% e a mistura do antioxidante sintético TBHQ com o extrato etanólico de gengibre reduziu em 92% a formação de peróxidos do óleo após 12 dias de estocagem acelerada a 60°C. Nota-se que a adição do extrato de gengibre ao óleo de soja não foi tão eficiente quanto o antioxidante sintético TBHQ e a mistura de antioxidantes, contra a formação de peróxidos.

Com relação à eficiência contra a formação de peróxidos durante este período de estocagem acelerada, podem-se classificar os tratamentos da seguinte maneira: OSR + M = OSR + TBHQ > OSR + EG > OSR.

O TBHQ tem se mostrado mais eficiente que os antioxidantes naturais, quando adicionado na dosagem máxima de 200mg/kg. Gámez-Mesa et al.<sup>21</sup> verificaram que o TBHQ obteve melhor resultado que o extrato de bagaço de uvas, contra a formação de peróxidos, em óleo de soja, durante estocagem a 60°C.

Almeida-Doria e Regitano-D'Arce<sup>15</sup> verificaram que o TBHQ, aplicado na concentração de 200mg/kg foi mais eficiente na proteção contra a formação de peróxidos em óleo de soja, do que extratos etanólicos de alecrim e orégano, a partir de 5 e 7 dias em teste de estocagem acelerada a 63°C.

### Dienos conjugados

A medida quantitativa dos dienos conjugados tem sido largamente utilizada para a determinação da oxidação de óleos e gorduras. A peroxidação dos ácidos graxos insaturados acompanha a mudança da dupla ligação na formação dos hidroperóxidos conjugados. Essa estrutura conjugada absorve fortemente a luz ultravioleta no comprimento de onda entre 232 e 234 nm<sup>22,23</sup>.

O acompanhamento dos espectros de absorção na faixa do ultravioleta das amostras de óleo fornece uma boa indicação das alterações que ocorrem durante o processo oxidativo, visto que o índice de peróxidos não reflete o aumento da degradação do óleo com o tempo de aquecimento. Por serem instáveis, os peróxidos são rapidamente formados e quebrados em compostos menores, porém, os dienos conjugados que se formam concomitantemente, permanecem no óleo aquecido<sup>24</sup>.

A Tabela 2 apresenta os resultados médios de dienos conjugados para os tratamentos OSR, OSR + EG, OSR + TBHQ e OSR + M, submetidos ao teste acelerado em estufa a 60°C por 12 dias. Em cada tempo, a atividade antioxidante dos tratamentos é maior quanto menor o valor de dienos conjugados em relação ao controle.

Pode-se observar, pela análise dos resultados que até o tempo de aquecimento de 3 dias não houve formação significativa de dienos conjugados nos tratamentos utilizados. Esta formação começou a ser detectada estatisticamente apenas a partir do tempo de aquecimento de 6 dias em estufa. A partir daí, observa-se que os tratamentos OSR + EG, OSR + TBHQ e OSR + M foram eficientes contra a formação de dienos conjugados, pois diferiram do controle. A maior formação de dienos no óleo indica formação de compostos primários de oxidação lipídica mais acentuada nesse óleo do que nos demais tratamentos.

**Tabela 2.** Valores médios de dienos conjugados (%) para os tratamentos submetidos ao teste acelerado em estufa a 60°C.

Tratamentos	Tempos de aquecimento (dias)				
	0	3	6	9	12
OSR	0,23 <sup>dA</sup>	0,27 <sup>dA</sup>	0,45 <sup>eA</sup>	0,65 <sup>bA</sup>	0,89 <sup>aA</sup>
OSR + EG	0,26 <sup>eA</sup>	0,28 <sup>eA</sup>	0,29 <sup>eB</sup>	0,37 <sup>bB</sup>	0,50 <sup>aB</sup>
OSR + TBHQ	0,25 <sup>bA</sup>	0,22 <sup>bA</sup>	0,22 <sup>bC</sup>	0,27 <sup>abC</sup>	0,31 <sup>aC</sup>
OSR + M	0,27 <sup>aA</sup>	0,27 <sup>aA</sup>	0,30 <sup>aB</sup>	0,27 <sup>aC</sup>	0,29 <sup>aC</sup>

(OSR): óleo de soja refinado, TBHQ: antioxidante sintético terc-butilhidroquinona, (OSR + EG) – OSR + 2.500 mg/kg de extrato de gengibre, (OSR + TBHQ) – OSR + 50 mg/kg de TBHQ, (OSR + M) – OSR + 2.500 mg/kg de extrato de gengibre + 50 mg/kg de TBHQ.

a, b ... (linha) – em cada Tratamento, médias de Tempos de aquecimento seguidas de mesma letra minúscula, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P > 0,05$ ). A, B ... (coluna) – em cada Tempo de aquecimento, médias de Tratamentos seguidas de mesma letra maiúscula, não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $P > 0,05$ ).

Após o final do processo, pode-se verificar que o extrato etanólico de gengibre demonstrou efeito antioxidante durante todo o aquecimento, embora tenha apresentado o menor nível de proteção, com 44% de redução da formação de dienos conjugados após 12 dias de estocagem acelerada. A aplicação do antioxidante sintético TBHQ e da mistura de TBHQ e extrato etanólico de gengibre foram mais efetivas entre os tratamentos testados, embora não tenham apresentado diferença significativa entre si na proteção do óleo de soja refinado estocado a 60°C com relação à formação de dienos conjugados. O óleo adicionado de TBHQ apresentou redução de 65%, e a mistura de TBHQ e extrato de gengibre apresentou 67% de redução na formação desses compostos no final do processo.

Ruth, Shaker e Morrissey<sup>25</sup> observaram redução de 23% no valor de dienos conjugados em óleo de linhaça, com a adição de 4% de extrato metanólico de semente de soja.

O extrato etanólico de manjeriço retardou a formação de dienos conjugados durante a estocagem de carne de porco, evidenciando a utilização de extratos naturais com características polares contra a oxidação lipídica<sup>26</sup>.

A comparação entre antioxidantes sintéticos e naturais quanto à capacidade antioxidante depende do tipo do composto analisado e da concentração utilizada. Os valores de dienos conjugados em óleo de milho com adição de 20% de extrato etanólico de germe de trigo torrado foram inferiores ao do óleo contendo 0,02% de BHA, em estudo realizado por Krings et al.<sup>27</sup>.

Iqbal e Bhanger<sup>28</sup> estudaram a formação de dienos conjugados em óleo de girassol adicionado de extrato metanólico de alho, em estocagem acelerada. As concentrações de 250, 500 e 1.000mg/kg foram comparadas com os antioxidantes sintéticos BHA e BHT (200mg/kg). Após 80 minutos de aquecimento a 185°C, concluíram que o óleo de girassol adicionado de 200mg/kg de BHT foi o mais eficiente na inibição da formação de dienos conjugados, seguido da amostra contendo 1.000 mg/kg de extrato metanólico de alho.

Em estudo realizado por Zandi e Gordon<sup>29</sup>, extrato metanólico de folhas de chá verde (0,25%) foi capaz de retardar a formação de dienos conjugados em óleo de canola, durante 20 dias de estocagem acelerada.

Os resultados encontrados neste estudo podem ser considerados satisfatórios, porém as seguintes considerações devem ser ressaltadas: a espécie de gengibre, as condições de plantio, bem como o processamento e o armazenamento do óleo utilizado para o estudo, podem interferir no resultado final, com relação à atividade antioxidante.

## CONCLUSÃO

Apesar de o antioxidante sintético TBHQ ter apresentado proteção superior ao óleo, nas concentrações utilizadas neste estudo, deve-se ressaltar a vantagem de se optar pelo uso do extrato etanólico de gengibre como antioxidante

natural, pois após a avaliação dos resultados, foi possível concluir que o extrato etanólico de gengibre foi capaz de prevenir a oxidação lipídica à temperatura de 60°C e, portanto, poderia ser indicado como antioxidante natural em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. Vale ressaltar, porém, que estudos mais específicos envolvendo o extrato etanólico de gengibre devem ser realizados para avaliar os componentes responsáveis pela ação antioxidante apresentada pelo extrato.

Concluiu-se também que o sinergismo entre o antioxidante natural e o TBHQ, nas mesmas concentrações em que foram adicionadas separadamente, não melhorou a eficiência em retardar a oxidação lipídica do óleo de soja no teste acelerado em estufa.

A atividade antioxidante dos diversos tratamentos testados neste estudo decresceu na seqüência: OSR + M = OSR + TBHQ > OSR + EG > OSR.

## AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de mestrado.

## REFERÊNCIAS

1. Turatti JM, Gomes RAR, Athié I. Lipídeos: aspectos funcionais e novas tendências. Campinas: ITAL; 2002.
2. Salinas RD. Alimentos e nutrição: introdução à bromatologia. 3<sup>th</sup> ed., Porto Alegre: Artmed, 2002; p. 99-131.
3. Takeoka GR, Full GH, Dao LT. Effect of heating on the characteristics and chemical composition of selected frying oils and fats. *J Am Oil Chem Soc.* 1997; 45:3244-9.
4. Ordóñez JA et al. Tecnologia de alimentos: componentes dos alimentos e processos. vol I. Porto Alegre: Artmed, 2005; p. 33-49.
5. Melo EA, Guerra NB. Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos. *Bol SBCTA* 2002;36:1-11.
6. Soong Y-Y, Barlow PJ. Antioxidant activity and phenolic content of selected fruit seeds. *Food Chem.* 2004;88:411-417.
7. Jaswir I, Che-Man YB, Kitts DD. Use of natural antioxidants in refined palm olein during repeated deep-fat frying. *Food Res Intern.* 2000;33:501-8.
8. Shobana S, Naidu KA. Antioxidant activity of selected Indian spices. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2000;62:107-10.
9. Jitoe A, Masuda T, Tengah IGP, Suprpta DN, Gara IW, Nakatani N. Antioxidant activity of tropical ginger extract and analysis of the contained curcuminoids. *J Agric Food Chem.* 1992; 40:1337-40.

10. Zancan KC, Marques MOM, Petenate AJ, Meireles MAA. Extraction of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) oleoresin with CO<sub>2</sub> and co-solvents: a study of the antioxidant action of the extracts. *J Supercrit Fluids*. 2002;24:57-76.
11. Rehman ZU, Salariya AM, Habib F. Antioxidant activity of ginger extract in sunflower oil. *J Sci Food Agric*. 2003;83:624-9.
12. Kaur C, Kapoor HC. Anti-oxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. *Intern J Food Sci Technol*. 2002; 37:153-61.
13. Dutton HJ. Analysis of fats and oils. *J Am Oil Chem Soc*. 1978; 55:806-8.
14. Faria JAF. Antioxidantes e estabilidade de óleos comestíveis. *Óleos e Grãos* 1994; 20:32-4.
15. Almeida-Doria RF, Regitano-D'Arce AB. Antioxidant activity of rosemary and oregano ethanol extracts in soybean oil under thermal oxidation. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2000; 20: 197-203.
16. Kim SY, Jeong SM, Park WP, Nam KC, Ahn DU, Lee SC. Effect of heating conditions of grape seeds on the antioxidant activity of grapes seed extracts. *Food Chem*. 2005;97:472-9.
17. AOCS. American Oil Chemists Society. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society. Champaign; 1993.
18. Banzatto DA,; Kronka SN. Experimentação agrícola. 4<sup>th</sup> ed. Jaboticabal: Funep, 2006.
19. Gray JJ. Measurement of lipid oxidation: a review. *J Am Oil Chem Soc*. 1978;55:538-46.
20. Shaidi F. Natural antioxidants: an overview. In: Shaidi F. Natural antioxidants: chemistry, health, effects and applications. Champaign: AOAC, 1996; p. 1-11.
21. Gámez-Meza N, Noriega-Rodriguez JA, Medina-Juarez LA, Ortega-Garcia J, Cazarez-Casanova R, Angulo-Guerrero O. Antioxidant activity in soybean oil of extract from Thompson grape bagasse. *J Am Oil Chem Soc* 1999;76:1445-7.
22. Kulas E, Ackman R. Different tocopherols and the relationship between two methods for determination of primary oxidation products in fish oil. *J Am Oil Chem Soc*. 2001; 49:1724-9.
23. Wheatley RA. Some trends in the analytical chemistry of lipid peroxidation. *Tr Anal Chem*. 2000; 19:617-28.
24. Cella RCF, Regitano-D'Arce MAB, Spoto MHF. Comportamento do óleo de soja refinado utilizado em fritura por imersão com alimentos de origem vegetal. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2002;22:111-16.
25. Ruth SMV, Shaker ES, Monrresse P.A. Influence of methanolic extracts of soybean seeds and soybean oil on lipid oxidation in linseed oil. *Food Chem*. 2001; 75:177-84.
26. Juntachote T, Berghofer E, Siebenhandl S, Bauer F. Antioxidative effect of added dried Holy basil and its ethanolic extracts on susceptibility of cooked ground pork to lipid oxidation. *Food Chem*. 2007; 100:129-35.
27. Krings U, El-Saharty YS, El-Zeany BA, Pabel B, Berger RG. Antioxidant activity of extracts from roasted wheat germ. *Food Chem*. 2000;71: 91-5.
28. Iqbal S, Bhanger MI. Stabilization of sunflower oil by garlic extract during accelerated storage. *Food Chem*. 2007;100:246-54.
29. Zandi P, Gordon MH. Antioxidant activity of extracts from old teas leaves. *Food Chem*. 1999;64:285-8.

# Atividade antioxidante de extratos de bagaço de uva das variedades Regente e Pinot Noir (*Vitis vinifera*)

## Antioxidant activity of grape bagasse extracts from Regente and Pinot Noir varieties (*Vitis vinifera*)

RIALA6/1122

Ismael Ivan ROCKENBACH\*, Graciela Lessa da SILVA, Eliseu RODRIGUES, Luciano Valdemiro GONZAGA, Roseane FETT

\* Endereço para correspondência: Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. Rod. Admar Gonzaga 1346, Itacorubi, CEP: 88034-001, Florianópolis, SC, e-mail: ismael.rockenbach@gmail.com  
Recebido: 05/07/2007 – Aceito para publicação: 26/09/2007

### RESUMO

Bagaços de uva (*Vitis vinifera*) das variedades Pinot Noir e Regente, coletados no município de Videira, Santa Catarina, foram analisados quanto ao conteúdo total de polifenóis e capacidade antioxidante. Foram utilizados sistemas solventes aquosos a 50% (v/v) de metanol, etanol e acetona acidificados (HCl 0,1%). O conteúdo de fenólicos totais foi determinado pela técnica de Folin-Ciocalteu e a atividade antioxidante por meio de técnicas de seqüestro de radicais livres ABTS e DPPH e pelo método do  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico. A acetona apresentou maior conteúdo de polifenóis totais, atingindo em peso seco, 7852mg GAE/100g na variedade Pinot Noir e 5334mg GAE/100g na variedade Regente. A atividade antioxidante média das variedades Pinot Noir e Regente foi, respectivamente, de 477 e 419 $\mu$ Mol TEAC/g pela técnica ABTS e 480 e 479 $\mu$ Mol TEAC/g pela técnica DPPH. No ensaio da co-oxidação do  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico os extratos etanólicos apresentaram maior sinergismo quando associados ao BHT, com 92,6% e 90,9% de inibição da oxidação com 200 $\mu$ L para a variedade Regente e Pinot Noir, semelhante ao BHT com 200 $\mu$ L, apresentando 91,7% de inibição da oxidação. Os extratos de bagaço de uva demonstraram potencial antioxidante, atuando como inibidores de radicais livres ou em sinergismo com o antioxidante sintético.

**Palavras-chave.** atividade antioxidante, polifenóis, bagaço de uva.

### ABSTRACT

Grape (*Vitis vinifera*) bagasse from Pinot Noir and Regente varieties, collected in Videira - Santa Catarina, were evaluated in order to determine the total polyphenol contents and antioxidant capacity. Acidified (HCl 0.1%) aqueous solvent systems of 50% (v/v) methanol, ethanol, and acetone were used. Total polyphenol contents were determined by Folin-Ciocalteu technique, and antioxidant activity was assessed by means of ABTS, DPPH, and  $\beta$ -carotene/linoleic acid techniques. Acetone presented the highest total polyphenol contents, reaching in a dry matter the concentrations of 7.852mg GAE/100g in Pinot Noir variety and 5.334mg GAE/100g in Regente variety. The average antioxidant activity of Pinot Noir and Regente varieties was of 477 and 419 $\mu$ Mol TEAC/g by means of ABTS technique, respectively, and 480 and 479 $\mu$ Mol TEAC/g, respectively when these samples were analyzed by DPPH technique. From  $\beta$ -carotene/linoleic acid technique analysis, it was observed that the ethanolic extracts showed higher synergism when associated to BHT, presenting 92.6% and 90.9% of oxidation inhibition with 200 $\mu$ L for Regente and Pinot Noir varieties, which were similar to BHT with 200 $\mu$ L, presenting 91.7% of oxidation inhibition. Extracts from grape bagasse demonstrated a potential antioxidant activity, functioning as inhibitors of free-radicals, or in synergism with a synthetic antioxidant.

**Key words.** antioxidant activity, polyphenols, grape bagasse.

## INTRODUÇÃO

O crescente interesse nas propriedades antioxidantes dos compostos fenólicos em vegetais e frutas deriva de sua forte atividade e baixa toxicidade comparada com antioxidantes fenólicos sintéticos, tais como o BHT (butil hidroxitolueno), BHA (butil hidroxi-anisól), PG (Propil Galato) e TBHQ (terc-butílo-hidroxi-quinona)<sup>1,2</sup>.

Os resíduos da produção de vinho são caracterizados por conter altos teores de compostos fenólicos devido à extração insuficiente durante a vinificação. Segundo Shrikhande<sup>3</sup> os extratos de cascas de uva, consistindo de antocianinas das cascas e procianidinas das sementes, são fontes importantes de polifenóis. Sementes e cascas são normalmente descartadas nas operações de suco e vinho branco antes do processamento. Esses resíduos não fermentados tornam-se então valiosos para a extração de polifenóis. Os subprodutos obtidos após exploração da vinificação, tanto as sementes como o bagaço, constituem uma fonte muito barata para a extração de flavonóides antioxidantes, podendo ser utilizados como suplementos alimentares, ou na produção de fitoquímicos, proporcionando vantajosa importância econômica<sup>4,5,6</sup>.

A proposta deste trabalho foi avaliar a atividade antioxidante de extratos dos resíduos do processo de vinificação das variedades Regente e Pinot Noir, cultivadas no município de Videira, Santa Catarina.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material

Foram utilizadas amostras de bagaço de uvas vermelhas (*Vitis vinifera* v. Pinot Noir e Regente) coletadas no município de Videira, Santa Catarina, resultantes da safra de 2005/2006, cedidas pela EPAGRI (Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina). O município de Videira localiza-se a uma latitude de 27°00', longitude de 51°09', estando a uma altitude de 779,1 metros acima do nível do mar<sup>7</sup>, possui clima úmido do tipo temperado, com as estações bem definidas e temperaturas médias que variam de 35°C no verão a 0°C no inverno.

Com o objetivo de preservar as propriedades gerais dos bagaços, os exemplares foram acondicionados em caixas isotérmicas contendo gelo, sendo encaminhados imediatamente para laboratório, onde foram armazenados à temperatura de  $-18,0 \pm 0,2^\circ\text{C}$  por 15 dias até as análises.

### Métodos

#### Preparação dos extratos

O conteúdo em peso seco dos bagaços foi obtido em estufa a 105°C, até peso constante. Para obtenção dos extratos,

as amostras do bagaço de uva das variedades Pinot Noir e Regente foram submetidas a tratamento térmico a 80°C, num período de 10 min, para inativação enzimática<sup>8,9</sup>. Posteriormente, foram secas em estufa de ar circulante, a temperatura de 50°C, por 24 horas. Após resfriamento em dessecador, as amostras foram trituradas (60 mesh) e desengorduradas em extrator de Soxhlet, utilizando-se hexano, durante 6 horas. Os extratos foram preparados com 1,5g de material seco e 2 x 25mL de solvente, utilizando soluções aquosas a 50% (v/v) de metanol, etanol e acetona acidificados com HCl a 0,1% sob agitação mecânica e ao abrigo da luz, durante um período de 2 horas. Os extratos foram filtrados em papel filtro Whatman nº1 e transferidos para balão volumétrico, sendo o volume final ajustado para 50mL.

#### Determinação do Conteúdo de Polifenóis Totais (PT)

O conteúdo total de polifenóis em cada extrato de bagaço de uva foi determinado espectrofotometricamente de acordo com o método de Folin-Ciocalteu<sup>10</sup>, com a leitura da absorbância em 764nm, e os resultados expressos em miligramas de equivalentes a ácido gálico (GAE) por 100 gramas de extrato seco.

#### Determinação da capacidade antioxidante – sequestro de radicais livres do ABTS<sup>+</sup>

Para determinar a atividade antioxidante utilizou-se o método ABTS (2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin 6-ácido sulfônico) descrito por Re et al.<sup>11</sup>. A absorbância foi medida em espectrofotômetro modelo Hewlett-Packard 8425A, no tempo de 7 minutos após a adição da amostra. A capacidade antioxidante total da amostra foi calculada em  $\mu\text{Mol/g}$  de TEAC (atividade antioxidante equivalente ao Trolox)<sup>12</sup>.

#### Determinação da capacidade antioxidante – método DPPH

Desenvolvido por Brand-Willams et al.<sup>13</sup>, o método DPPH tem como base a redução da absorbância na região visível de comprimento de onda de 515nm do radical DPPH<sup>\*</sup> (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) por antioxidantes. Foram aplicadas modificações de Kim et al.<sup>14</sup>, que utilizam o método com base na absorbância do radical DPPH<sup>\*</sup> 100  $\mu\text{M}$  (2,9mL) dissolvido em metanol a 80% no comprimento de onda de 517nm. Os resultados são expressos em Trolox ( $\mu\text{Mol TEAC/100g}$  de amostra).

#### Determinação da capacidade antioxidante - sistema de co-oxidação do $\beta$ -caroteno/ácido linoléico

A capacidade antioxidante também foi avaliada pelo método de descoramento do  $\beta$ -caroteno descrito por Marco<sup>15</sup> e modificado por Miller<sup>16</sup>. Uma alíquota de 20 $\mu\text{L}$  da solução de  $\beta$ -caroteno (20mg/mL em clorofórmio) foi colocada em um frasco erlenmeyer de 250mL com 40 $\mu\text{L}$  de ácido linoléico, 1mL de clorofórmio e 20mg de Tween 40. Após homogeneização, o clorofórmio foi completamente evaporado

com nitrogênio. Ao erlenmeyer foram adicionados 150mL de água deionizada (previamente submetida a tratamento com atmosfera de oxigênio, durante 30 minutos). A emulsão apresentou-se límpida e sua absorvância foi ajustada entre 0,6 e 0,7 a 470nm. Diferentes alíquotas (50, 100 e 200µL) de soluções a 100ppm dos extratos foram comparadas ao controle (sem antioxidante) e à solução de BHT (butil hidroxitolueno) a 100ppm, utilizado como antioxidante padrão. Além disso, o efeito sinérgico foi avaliado utilizando-se misturas das soluções de extratos com a solução de BHT (1:1). Uma leitura inicial da absorvância foi feita imediatamente após a adição das soluções de extratos e do padrão ao sistema. Posteriormente, a absorvância foi monitorada a cada 15 min, durante 2 horas. As cubetas foram mantidas em banho-maria a 50°C durante as leituras. A atividade antioxidante foi calculada em termos de percentual de inibição, relativo ao controle, de acordo com a seguinte equação:

$$\% \text{ inibição} = 100 - \left( \frac{A_i - A_f}{C_i - C_f} \times 100 \right)$$

$A_i$  = absorvância inicial da solução de extrato

$A_f$  = absorvância final da solução de extrato

$C_i$  = absorvância inicial da solução controle

$C_f$  = absorvância final da solução controle

### Análise Estatística

Realizou-se análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey para identificar diferenças significativas entre as médias através do software Statistica® 6.0, ao nível de 5% de significância (P<0,05).

Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados apresentados como média ± desvio padrão.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Conteúdo de Polifenóis Totais

A concentração de polifenóis totais foi maior no extrato aquoso de acetona, seguido pelo extrato etanólico e metanólico para as variedades Pinot Noir e Regente (Tabelas 1 e 2), respectivamente. Houve diferença estatisticamente significativa (P<0,05) apenas para o extrato metanólico da variedade Regente, que apresentou menor teor de compostos fenólicos.

Llobera e Cañellas<sup>17</sup> realizaram um estudo com o bagaço de uvas vermelhas variedade Manto Negro (*Vitis vinifera*) e encontraram valores de compostos fenólicos de 2630 mg GAE/100g em peso seco, sendo estes valores inferiores aos encontrados em nosso estudo. Em outro estudo Yilmaz e Toledo<sup>18</sup> determinaram o conteúdo de polifenóis totais em semente de uva utilizando diferentes sistemas solventes. Foram encontrados valores, em peso seco, em torno de 2800mg GAE/100g utilizando soluções aquosas de etanol (50, 60 e 70%), 3000mg GAE/100g em soluções aquosas metanólicas (60 ou 70%) e valores em torno de 4000mg GAE/100g quando utilizadas soluções aquosas de acetona (50 ou 75%).

Levando em consideração que as concentrações de polifenóis totais encontradas em nosso estudo atingem, em peso seco, 7852mg GAE/100g no extrato acetônico da variedade Pinot Noir, pode-se dizer que os subprodutos da vinificação, como cascas e sementes, representam uma fonte rica de produtos de alto valor, sendo caracterizados pelo elevado conteúdo de polifenóis<sup>4,5,19,6</sup>. Kuskoski et al.<sup>20</sup> realizaram pesquisa com a polpa de abacaxi, cupuaçu, maracujá, graviola e uva, e encontraram valores de compostos fenólicos de 21,7; 20,5; 20,0; 84,3 e 117,1mg GAE/100g em peso fresco. Em outro estudo Sun et al.<sup>21</sup> encontraram em frutas como uva (182,0 ± 2,6mg/100g), morango (147,8 ± 1,1mg/100g) e abacaxi (40,4 ± 1,0mg/100g), valores de compostos fenólicos totais, em peso fresco, inferiores aos encontrados em nosso estudo com bagaço de uva, que foram de 1806 e 1067mg GAE/100g, para Pinot Noir e Regente, respectivamente.

**Tabela 1.** Conteúdo de polifenóis totais (PT) e Atividade antioxidante (ABTS e DPPH) de extratos de bagaço de uva variedade Pinot Noir (solventes a 50% em meio aquoso acidificado com HCl 0,1% v/v).

Amostras	PT (mg GAE/100g de bagaço)		DPPH – TEAC <sup>c</sup>	ABTS–TEAC <sup>c</sup>
	PS <sup>a</sup>	PF <sup>b</sup>		
Etanol	7173 ± 381 <sup>a</sup>	1650 ± 88 <sup>a</sup>	450 ± 14 <sup>a</sup>	471 ± 12 <sup>a</sup>
Metanol	7073 ± 389 <sup>a</sup>	1627 ± 89 <sup>a</sup>	438 ± 11 <sup>a</sup>	436 ± 57 <sup>a</sup>
Acetona	7852 ± 291 <sup>a</sup>	1806 ± 67 <sup>a</sup>	551 ± 7 <sup>b</sup>	523 ± 24 <sup>a</sup>
Média	7366 ± 354	1694 ± 81	480 ± 11	477 ± 31

Resultados expressos como média ± desvio padrão, n = 3.

<sup>a</sup>PS: Peso seco; <sup>b</sup>PF: Peso fresco (77% de umidade); <sup>c</sup>TEAC: atividade antioxidante equivalente ao Trolox (µMol TEAC/g).

Letras diferentes em uma mesma coluna representam diferença estatística (Tukey HSD, P <0,05).

**Tabela 2.** Conteúdo de polifenóis totais (PT) e Atividade antioxidante (ABTS e DPPH) de extratos de bagaço de uva variedade Regente (solventes a 50% em meio aquoso acidificado com HCl 0,1% v/v).

Amostras	PT (mg GAE/100g de bagaço)		DPPH – TEAC <sup>c</sup>	ABTS – TEAC <sup>c</sup>
	PS <sup>a</sup>	PF <sup>b</sup>		
Etanol	5230 ± 96 <sup>b</sup>	1046 ± 19 <sup>b</sup>	439 ± 18 <sup>a</sup>	357 ± 12 <sup>a</sup>
Metanol	4354 ± 98 <sup>a</sup>	871 ± 20 <sup>a</sup>	443 ± 12 <sup>a</sup>	454 ± 20 <sup>b</sup>
Acetona	5334 ± 13 <sup>b</sup>	1067 ± 3 <sup>b</sup>	556 ± 12 <sup>b</sup>	447 ± 15 <sup>b</sup>
Média	4973 ± 69	995 ± 14	479 ± 14	419 ± 16

Resultados expressos como média ± desvio padrão, n = 3.

<sup>a</sup> PS: Peso seco; <sup>b</sup> PF: Peso fresco (80% de umidade); <sup>c</sup> TEAC: atividade antioxidante equivalente ao Trolox (µMol TEAC/g).

Letras diferentes em uma mesma coluna representam diferença estatística (Tukey HSD, P <0,05).

### Atividade Antioxidante pelos métodos ABTS e DPPH

Os valores médios encontrados em nosso estudo considerando-se os diferentes solventes são, respectivamente, 477 e 419 µMol TEAC/g pelo método ABTS e 480 e 479 µMol TEAC/g pelo método DPPH para Pinot Noir e Regente (Tabelas 1 e 2), respectivamente. Para a variedade Pinot Noir o extrato acetônico apresentou maior atividade pelo método DPPH, não havendo diferença significativa entre os extratos pelo método ABTS (P <0,05). Para a variedade Regente o extrato acetônico apresentou maior atividade pelo método DPPH. Enquanto que pelo método ABTS o extrato metanólico apresentou maior atividade em relação ao extrato acetônico, porém sem apresentar diferença significativa (P <0,05).

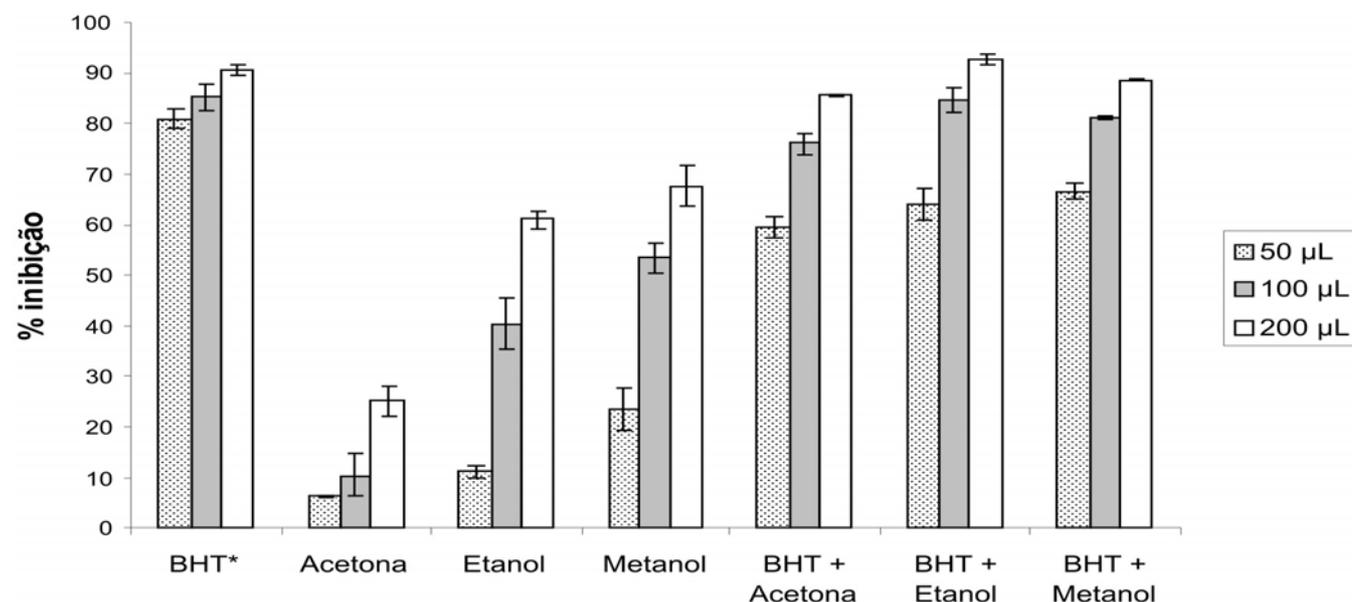
A atividade antioxidante média encontrada no bagaço das uvas é relativamente elevada quando comparada com frutas ricas em antocianinas, como morango (20,6 µMol TEAC/g peso fresco ORAC), descrita por Kalt et al.<sup>22</sup>, suco de uva e de amora (8,11 – 38,29 µMol TEAC/g peso fresco pelo método ABTS), descrita por Sellappan et al.<sup>23</sup>; polpa de açaí (48,6 µMol/mL ORAC),

determinada por Del Pozo-Insfran et al.<sup>24</sup>; e suco de uva tinta (14,6 – 25,0 µMol TEAC/mL), descrita por Dávalos et al.<sup>25</sup>.

Em outro estudo Kuskoski et al.<sup>26</sup> determinaram atividade antioxidante das polpas de frutas de grande consumo no mercado sul brasileiro (amora, uva, açaí, goiaba, morango, acerola, abacaxi, manga, graviola, cupuaçu e maracujá), aplicando método ABTS. Os valores de atividade antioxidante equivalente ao Trolox obtidos oscilam entre valores mínimos e máximos de 2,0 e 67,6 µMol TEAC/g em peso fresco.

### Atividade Antioxidante através do sistema β-caroteno/ácido linoléico

A ação antioxidante dos extratos acetônico, etanólico e metanólico do bagaço das duas variedades de uva também foi avaliada através do sistema modelo β-caroteno/ácido linoléico. O método avalia a atividade de inibição de radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoléico. A Figura 1 mostra as porcentagens de inibição da oxidação dos extratos acetônico, etanólico e metanólico da variedade Regente.



\* BHT - butil hidroxitolueno

**Figura 1.** Atividade antioxidante dos extratos acetônico, etanólico e metanólico do bagaço de uva variedade Regente determinada pela oxidação acoplada do β-caroteno/ácido linoléico.

O extrato metanólico teve maiores valores de atividade antioxidante, que indicou com 200µL a melhor proteção contra o processo de oxidação, com uma média de 67,5%, seguido por 53,5% de inibição da oxidação pela mesma amostra com 100µL. Na variedade Pinot Noir (Figura 2) o extrato etanólico teve maiores valores de atividade antioxidante, indicando com 200µL a melhor proteção contra o processo de oxidação com uma média de 63,6%, seguido por 41,1% de inibição da oxidação pela mesma amostra com 100µL.

Estes resultados são inferiores aos dados apresentados no estudo de Moreira e Mancini-Filho<sup>27</sup>, onde o extrato aquoso de mostarda a 200 ppm apresentou 72% de inibição da oxidação, e o extrato etéreo de canela indicou 83% de atividade antioxidante. Em outro estudo Jayaprakasha et al.<sup>28</sup>, utilizando diferentes sistemas solventes em extratos de semente de uva, obtiveram 89,3% de inibição com acetato de etila em meio aquoso (proporção 17:3).

Os dados demonstram que o percentual de inibição da oxidação é dose-dependente, ou seja, aumenta com a elevação do volume de solução de extrato aplicada. Outro fato relevante a ser observado é que, ao contrário dos resultados de ABTS e DPPH, os extratos acetônicos foram menos efetivos no ensaio do sistema β-caroteno/ácido linoléico em comparação com os extratos metanólico e etanólico. Este fato pode estar relacionado com a composição fenólica dos extratos, provavelmente determinada pelas características de afinidade polar entre solvente e compostos fenólicos. Frankel et al.<sup>29</sup> observaram que antioxidantes de caráter polar apresentaram maior capacidade

antioxidante em sistemas de caráter mais apolar, sendo observado o contrário para antioxidantes de caráter apolar.

Além disso, o extrato etanólico das duas variedades foi o que melhor apresentou sinergismo quando associado ao BHT. A mistura, com volume de 200µL, de antioxidante sintético e extrato (1:1) teve uma performance na inibição da oxidação semelhante, de 92,6% para a variedade Regente e 90,9% para a variedade Pinot Noir, ao BHT puro quando aplicado o mesmo volume, com 91,7% de inibição nos ensaios para as duas variedades.

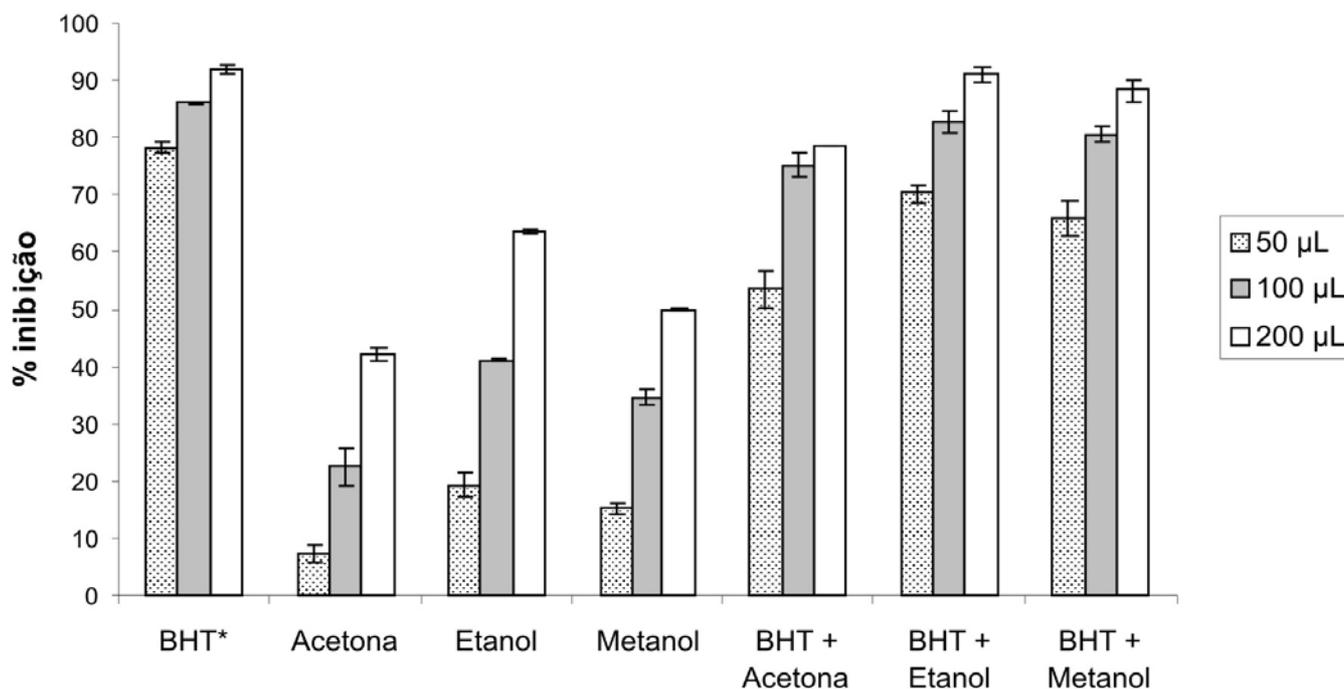
## CONCLUSÃO

Considerando que o bagaço de uva é resíduo obtido a partir da separação do mosto na vinificação, o conteúdo total de compostos fenólicos que permanece no bagaço é elevado, comparando-se com a polpa de algumas frutas como abacaxi, cupuaçu, maracujá, graviola e uva.

Os extratos de bagaço de uva avaliados apresentaram potencial antioxidante atuando como inibidores de radicais livres, ou atuando em sinergismo com o antioxidante sintético BHT.

## AGRADECIMENTOS

Ao CNPq/Capes pelo auxílio financeiro, e a EPAGRI (Empresa Catarinense de Pesquisa Agropecuária) de Videira, Estado de Santa Catarina, pelo fornecimento das amostras.



\* BHT - butil hidroxitolueno

**Figura 2.** Atividade antioxidante dos extratos acetônico, etanólico e metanólico do bagaço de uva variedade Pinot Noir determinada pela oxidação acoplada do β-caroteno/ácido linoléico.

## REFERÊNCIAS

1. Marinova EM, Yanishlieva NV. Antioxidative activity of extracts from selected species of the family Lamiaceae in sunflower oil. Food Chem 1997; 58 (3): 245-8.
2. Nakatani N. Antioxidant from spices and herbs. In: Shahidi F, editor. Natural antioxidants: chemistry, health effects and applications. Champaign: AOCS Press; 1997. p. 64-75.
3. Shrikhande AJ. Wine by-products with health benefits. Food Res Int 2000; 33: 469-74.
4. Alonso A, Guilleán D, Barroso C, Puertas B, García A. Determination of antioxidant activity of wine byproducts and its correlation with polyphenolic content. J Agric Food Chem 2002; 50: 5832-6.
5. Negro C, Tommasi L, Miceli A. Phenolic compounds and antioxidant activity from red grape marc extracts. Bioresource Technol 2003; 87: 41-4.
6. González-Paramas A, Esteban-Ruano S, Santos-Buelga C, Pascual-Teresa S, Rivas-Gonzalo J. Flavanol content and antioxidant activity in winery byproducts. J Agric Food Chem 2004; 52: 234-8.
7. Massignam AM, Dittrich RC. Estimativa do número médio e da probabilidade mensal de ocorrência de geadas para o Estado de Santa Catarina. R Bras Agromet 1998; 6 (2): 213-20.
8. Valderrama P, Marangoni F, Clemente E. Efeito do tratamento térmico sobre a atividade de peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PPO) em Maçã (*Mallus comunis*). Ciênc Tecnol Aliment 2001; 21 (3): 321-5.
9. Troiani EP, Tropiani CT, Clemente D. Peroxidase (POD) and Polyphenoloxidase (PPO) in grape (*Vitis vinifera* L.). Ciênc Agrotec 2003; 27 (3): 635-42.
10. Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. Am J Enol Viticul 1965; 16: 144-58.
11. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Bio Med 1999; 26: 1231-7.
12. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. Free Radical Bio Med 1996; 20: 933-56.
13. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensm-Wiss Technol 1995; 22: 25-30.
14. Kim D-O, Lee KW, Lee HJ, Lee CY. Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolics phytochemicals. J Agric Food Chem 2002; 50: 3713-7.
15. Marco GJ. A rapid method for evaluation of antioxidants. J Am Oil Chem Soc 1968; 45: 594-8.
16. Miller HE. A simplified method for the evaluation of antioxidants. J Am Oil Chem Soc 1971; 48: 91.
17. Llobera A, Cañellas J. Dietary fibre content and antioxidant activity of Mano Negro red grape (*Vitis vinifera*): pomace and stem. Food Chem 2007; 101: 659-66.
18. Yilmaz Y, Toledo R. Oxygen radical absorbance capacities of grape/wine industry by products and effect of solvent type on extraction of grape seed polyphenols. J Food Compos Anal 2006; 19: 41-8.
19. Kammerer D, Claus A, Carle R, Schieber A. Polyphenol screening of pomace from red and white grapevarieties (*Vitis vinifera* L.) by HPLC-DAD-MS/MS. J Agric Food Chem 2004; 52: 4360-7.
20. Kuskoski EM, Asuero AG, Morales MT, Fett R. Wild fruits and pulps of frozen fruits: antioxidant activity, polyphenols and anthocyanins. Ciênc Rural 2006; 36 (4): 1283-1287.
21. Sun J, Chu YF, Wu X, Liu RH. Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. J Agric Food Chem 2002; 50: 7449-54.
22. Kalt W, Forney CF, Martin A, Prior RL. Antioxidant capacity, vitamin C, phenolics and anthocyanins after fresh storage of small fruits. J Agric Food Chem 1999; 47: 4638-44.
23. Sellappan S, Akoh CC, Krewer G. Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity of Georgia-Grown Blueberries and Blackberries. J Agric Food Chem 2002; 50: 2432-8.
24. Del Pozo-Insfran D, Brenes CH, Talcott ST. Phytochemical composition and pigment stability of açai (*Euterpe oleracea* Mart.). J Agric Food Chem 2004; 52: 1539-45.
25. Dávalos A, Bartolomé B, Gómez-Cordovés C. Antioxidant properties of commercial grape juices and vinegars. Food Chem 2005; 93: 325-30.
26. Kuskoski EM, Asuero AG, Troncoso AM, Mancini-Filho J, Fett R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. Ciênc Tecnol Aliment 2005; 25 (4): 726-32.
27. Moreira AVB, Mancini-Filho J. Atividade antioxidante das especiarias mostarda, canela e erva doce em sistemas aquoso e lipídico. Nutrire 2003; 25: 31-46.
28. Jayaprakasha GK, Singh RP, Sakariah KK. Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models *in vitro*. Food Chem 2001; 73: 285-90.
29. Frankel EN, Huang S-W, Kanner J, German JB. Interfacial phenomena in the evaluation of antioxidants: bulk oils vs emulsions. J Agric Food Chem 1994; 42: 1054-59.

# Mercúrio total em pescado da cadeia produtiva da Baixada Santista, estado de São Paulo, Brasil

## Total mercury in fishes from the productive chain at the Santos coastal region, São Paulo, Brazil

RIALA6/1123

Marcelo Antonio MORGANO<sup>1\*</sup>, Agar Costa Alexandrino de PEREZ<sup>2</sup>, Raquel Fernanda MILANI<sup>1</sup>, Dilza Maria Bassi MANTOVANI<sup>1</sup>, Cristiane Rodrigues Pinheiro NEIVA<sup>2</sup>, Erika Fabiane FURLAN<sup>2</sup>, Rúbia Yuri TOMITA<sup>2</sup>, Roberto da Graça LOPES<sup>2</sup>, Marildes Josefina Lemos NETOS<sup>2</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>1</sup>ITAL - Instituto de Tecnologia de Alimentos, Centro de Química de Alimentos e Nutrição Aplicada, Av. Brasil, 2880, CEP 13070-178, Campinas, SP. E-mail: [morgano@ital.sp.gov.br](mailto:morgano@ital.sp.gov.br)

<sup>2</sup> IP - Instituto de Pesca, Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio do Pescado Marinho, Av. Bartolomeu de Gusmão, 192 - Ponta da Praia - CEP 11030-906 - Santos (SP)

Trabalho financiado pela FAPESP (Proc. n° 03/06456-4)

Recebido: 07/05/2007 - Aceito para publicação: 30/07/2007

### RESUMO

Neste estudo foi avaliado o teor de mercúrio total em diversas amostras de pescados da cadeia produtiva da Baixada Santista, SP. As amostras foram procedentes de estabelecimentos inspecionados das cidades de Bertioga, Guarujá, Itanhaém, Mongaguá, Peruíbe, Praia Grande, Santos, São Vicente e da Companhia de Entrepostos e Armazéns Gerais de São Paulo (CEAGESP). Após a validação da técnica foram realizadas as determinações do teor de mercúrio total em 257 amostras de pescados, utilizando-se a técnica de espectrometria de emissão com fonte de plasma indutivamente acoplado e gerador de hidretos (ICP OES-HG). A concentração de mercúrio total encontrada nas diversas espécies de peixes variou de 0,166 a 0,878mg/kg. Quase a totalidade das amostras apresentou concentração de mercúrio total abaixo do permitido pela legislação brasileira que é de 0,5 mg/kg para peixes não-predadores e 1,0mg/kg para peixes predadores.

**Palavras-chave.** pescado, qualidade do pescado, peixe, mercúrio total, espectrometria de emissão, gerador de hidretos, ICP OES.

### ABSTRACT

The present study evaluated the total mercury in fish samples from the productive chain of Santos coastal region, SP. Fish samples were collected at Bertioga, Guarujá, Santos, São Vicente, Praia Grande, Mongaguá, Itanhaém, and Peruíbe cities. After validating the technique, the total mercury contents were determined in 257 fish samples by means of inductively coupled plasma optical emission spectrometry technique (ICP OES-HG). The concentration of total mercury found in several fish species ranged from 0.166 to 0.878 mg/kg. The majority of fish samples presented total mercury concentration higher than the maximum permitted value according to Brazilian legislation, which is 0.5mg/kg for non-predatory fish species and 1.0mg/kg for predatory species.

**Key words.** fish, mercury, determination, emission spectrometry, hydride generator, ICP OES.

## INTRODUÇÃO

O consumo de peixe em muitas regiões do mundo tem se tornado um hábito como alternativa saudável a outras carnes, principalmente pela presença de ácidos graxos poliinsaturados, pela disponibilidade de proteínas e de vitaminas A e D. Contudo, o consumo de peixes em más condições de conservação pode causar doenças devido tanto as infecções, quanto a intoxicações<sup>1</sup>. Além disso, o pescado pode estar contaminado por diferentes contaminantes inorgânicos que não são detectáveis pela avaliação sensorial, utilizada pelo consumidor no momento da compra e os peixes são considerados como a principal fonte de mercúrio ingerido pelo homem<sup>2,3</sup>.

Na natureza o mercúrio é distribuído através das fontes poluentes que podem ter origem geológica natural ou antrópica. As formas inorgânicas podem, por processos biológicos, físicos ou químicos, serem convertidas em compostos como o metilmercúrio que, por serem solúveis em água, levam a contaminação das águas do mar e da biota aquática<sup>4</sup>.

Combinações perversas entre fontes antrópicas de Hg, a elevada concentração de matéria orgânica na água, a atividade de bactérias, a grande diversidade e o consumo de peixes pela população, aumentam a possibilidade de risco de intoxicação humana por compostos de mercúrio<sup>5</sup>.

No pescado, o mercúrio é fixado preferencialmente no grupamento sulfidríla da proteína, sendo acumulado principalmente como metilmercúrio (que constitui, em média, 85% do mercúrio total), considerada a forma química mais deletéria ao homem<sup>6,7,8</sup>. Mesmo em regiões com níveis normais de mercúrio na água, podem ser observados níveis altos de mercúrio em peixes, uma vez que incorporado à cadeia trófica o mercúrio é biomagnificado<sup>9</sup>. Nos seres humanos, o metilmercúrio tem tempo de meia-vida biológica relativamente longo, de 44 a 80 dias, e sua excreção ocorre via fezes, urina e leite<sup>6</sup>.

Os sintomas decorrentes da presença de teor elevado de metilmercúrio são neurológicos: visão turva e redução do campo visual, ataxia, parestesia, neurastenia, perda de audição, disartria, confusão mental, tremor muscular, distúrbio da motilidade e, nos casos mais graves, paralisia e morte<sup>6</sup>.

O risco de intoxicação pela acumulação de metilmercúrio proveniente da ingestão de pescado contaminado depende do teor do contaminante na carne, da quantidade ingerida e da frequência de ingestão (em função do tempo de meia-vida)<sup>10</sup>. No Brasil, o limite de tolerância de mercúrio em pescado foi fixado em 0,5mg/kg para espécie não-predadora e 1,0 mg/kg para espécie predadora<sup>11</sup>. Em alguns países da Europa (como Alemanha, Finlândia, Suécia), na Nova Zelândia e nos Estados Unidos, o valor limite permitido é de 1,0mg/kg. No Japão o limite é de 0,4mg/kg, na Austrália, Israel, Noruega, Suíça e Tailândia é de 0,5 mg/kg e na Itália de 0,7mg/kg<sup>12</sup>.

Mesmo que os alimentos sejam submetidos a salga, defumação ou tratamentos com ácidos fracos, não apresentam alteração na quantidade de mercúrio total<sup>13</sup>. Por outro lado, estudos mostraram perda de aproximadamente 30 % do teor de mercúrio após fritura ou cocção<sup>14</sup>.

A Baixada Santista foi considerada, na década de 70, uma das regiões com maior contaminação ambiental devido à crescente industrialização, recebendo a partir daí mais atenção das autoridades quanto aos riscos oriundos da presença de contaminantes e quanto ao controle das fontes poluidoras<sup>15</sup>.

Silva et al.<sup>16</sup> estudaram amostras de mexilhões extraídos nas baías de Santos e São Vicente e encontraram níveis de mercúrio inferiores a 0,05 mg/kg, ou seja, abaixo do permitido pela legislação brasileira. Os moluscos bivalves são filtradores e bioacumulam resíduos químicos e biológicos e são utilizados mundialmente como indicadores de poluição marinha. Em análise realizada em 1997, pela CETESB<sup>17</sup> na região de Bertioga, ainda com bivalves, também foram encontrados níveis de mercúrio abaixo do legalmente permitido. O trabalho de Morales-Aizpurúa et al.<sup>2</sup> mostrou que existe contaminação por Hg em amostras de cação comercializadas em SP, onde foram detectados níveis de Hg 0,04 e 4,71mg/kg, com 54% das amostras (n = 26) acima do permitido pela legislação brasileira. Em outro estudo com moluscos bivalves coletados em bancos naturais do litoral da Baixada Santista, Pereira et al.<sup>18</sup> revelaram que em 70 amostras avaliadas os níveis de concentração de mercúrio foram inferiores ao estabelecido pela legislação brasileira.

No entanto, em relação aos peixes, objeto de estudo deste artigo, é preciso considerar que a produção desembarcada na Baixada Santista é produto tanto de capturas no litoral e ambientes costeiros da Região, como também de pescarias realizadas na faixa litorânea compreendida, geralmente, entre o Rio de Janeiro e Santa Catarina. Sellanes et al.<sup>3</sup> estudando a presença de Hg total em 85 amostras de peixes (dourado de mar, sardinha, atuns, ariocós, vermelhos e xerelete) da costa fluminense, não encontraram níveis acima de 0,5mg/kg. Vieira et al.<sup>19</sup> estudando peixes carnívoros, onívoros, herbívoros e detritívoros encontraram os maiores níveis de Hg nos peixes carnívoros (cachara, pintado, piranha e dourado de água doce), mostrando também que existe uma tendência à concentração decrescente de Hg na carne dependendo do hábito alimentar: carnívoros > onívoros > herbívoros > detritívoros.

Diante da relevância do mercúrio como contaminante ambiental e sua possível transferência para o ser humano pela cadeia trófica, o objetivo deste trabalho foi avaliar se existe contaminação apreciável de mercúrio total em peixes marinhos amostrados em diferentes cidades da Baixada Santista, onde se encontram os maiores entrepostos de desembarque e agentes de distribuição de pescado para o mercado consumidor paulista e da CEAGESP.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Amostragem

No período de junho de 2005 a setembro de 2006, técnicos do Serviço de Inspeção e Vigilância Sanitária em nível municipal, estadual e federal, coletaram 257 amostras de peixe *in natura*, em oito diferentes pontos da cadeia produtiva do pescado marinho na região da Baixada Santista denominados de barco, entreposto, indústria, mercado municipal, mercado

atacadista, peixaria, feira livre e supermercado (Tabela 1). Os locais de coleta das amostras foram definidos de maneira a possibilitar que todos os pontos desta cadeia produtiva fossem contemplados. As cidades de coleta das amostras de pescados foram: Bertioga, Guarujá, Santos, São Vicente, Praia Grande, Mongaguá, Itanhaém e Peruibe. Também foram obtidas algumas amostras do CEAGESP, de lotes de pescado procedentes da região da Baixada Santista. Os pontos de coleta da cadeia produtiva são conceituados como:

- Barco: refere-se ao ponto que antecede o desembarque e neste entende-se que o pescado ainda não foi submetido a nenhum tipo de beneficiamento, nem mesmo a lavagem.
- Entreposto: refere-se ao local onde o pescado é desembarcado e inicialmente beneficiado, passando pelas etapas de lavagem, separação (por espécies ou categorias) e pesagem.
- Indústria: neste local o pescado recebido após a lavagem, separação e pesagem é submetido a algum tipo de processamento, seja pela obtenção de cortes como postas ou filés, ou produtos mais elaborados, sendo considerado como matéria-prima.
- Mercado municipal: local que comercializa o pescado e possui infraestrutura e serviços básicos, em sua maioria possuem construções em alvenaria, subdivididas em boxes

azulejados. Manipula os pescados realizando procedimento de evisceração e filetagem.

- Feira livre: refere-se ao tipo de comércio formalmente autorizado realizado em barracas montadas em ruas e com caráter itinerante que comercializa o pescado, manipulando-o minimamente (evisceração e filetagem).

- Supermercado: lojas pertencentes a grandes redes de supermercados ou hipermercados, comercializam o pescado em balcões refrigerados e os manipula.

- Mercado atacadista: local que centraliza o comércio em grande escala, recebe e distribui o pescado oriundo de várias localidades, não sendo manipulado e em sua maioria permanece em caixas com gelo durante a comercialização. Neste estudo refere-se ao CEAGESP de São Paulo, onde foram coletadas somente as amostras do pescado oriundo da Baixada Santista.

As amostras chegaram ao laboratório em sacos plásticos limpos, separadas por espécie e ponto de coleta, transportadas em caixas isotérmicas com gelo. Em seguida foram filetadas, eliminando-se as vísceras, pele e escamas. A seguir, os filés de cada amostra foram homogeneizados em multiprocessador e armazenados em sacos de polietileno a  $-18^{\circ}\text{C}$  até o momento das análises químicas.

**Tabela 1.** Identificação das espécies de peixes marinhos coletados nos diferentes elos da cadeia produtiva da Baixada Santista/SP, no período de junho de 2005 a setembro de 2006 e distribuição do número de amostras por espécies analisadas.

Nome comercial	Nome Científico	Número de amostras
Abrótea	<i>Urophycis brasiliensis</i>	07
Anchova	<i>Pomatomus saltatrix</i>	04
Atum	<i>Thunnus albacares</i>	02
Bagre	<i>Genidens barbuis</i>	01
Betara	<i>Menticirrhus americanus</i>	16
Bicuda	<i>Sphyræna sp</i>	01
Cabrinha	<i>Prionotus punctatus</i>	09
Carapau	<i>Caranx hippos</i>	01
Catuá	<i>Cephalopholis fulva</i>	01
Chora-chora	<i>Umbrina canosai</i>	02
Cioba	<i>Lutjanus analis</i>	05
Corcoroca		02
Congro-rosa	<i>Brotula clarkae</i>	01
Corvina	<i>Micropogonias furnieri</i>	57
Galo	<i>Selene setapinnis</i>	01
Goete	<i>Cynoscion jamaicensis</i>	32
Guaivira	<i>Oligoplites saliens</i>	04
Meca	<i>Xiphias gladius</i>	01
Merluza	<i>Merluccius hubbsi</i>	02
Oveva	<i>Larimus breviceps</i>	01
Palombeta	<i>Chloroscombrus chrysurus</i>	02
Pargo	<i>Pargrus pagrus</i>	01
Peixe-lua	<i>Masturus lanceolatus</i>	02
Peixe-sapo	<i>Lophius gastrophysis</i>	02
Pescada	Família Sciaenidae	20
Pescada-amarela	Família Sciaenidae	03
Pescada-branca	Família Sciaenidae	11
Pescada-cambucu	Família Sciaenidae	01
Pescada-inglesa	Família Sciaenidae	04
Maria-mole	Família Sciaenidae	03
Porquinho	<i>Balistes caprisicus</i>	01
Raia		01
Sardinha	<i>Sardinellabrasiliensis</i>	30
Savelha		01
Sororoca	<i>Scomberomorus maculatus</i>	05
Tainha	<i>Mugil liza</i>	16
Trilha	<i>Mullus argentinae</i>	01
Peixe-voador		01
Não Identificado		02

## Reagentes

Ácido sulfúrico, permanganato de potássio, pentóxido de vanádio, ácido nítrico, ácido clorídrico, cloridrato de hidroxilamina, de elevada pureza e baixo teor de mercúrio (Merck). Cloreto de estanho (Carlo Erba Analyticals). Argônio líquido (99,996 %, Air Liquide, SP, Brasil). As soluções padrão de mercúrio foram preparadas a partir de diluição apropriada do padrão estoque de referência certificado de 1000mg/L (Merck), rastreado pelo NIST, em solução  $H_2SO_4:HNO_3$  5% (v/v). Toda vidraria utilizada foi lavada com solução de Extran® seguida de imersão em ácido nítrico a 20 % durante 2 horas e enxágüe final com água destilada e deionizada.

## Método analítico

As análises foram feitas em triplicata, segundo o método descrito por Morgano et al.<sup>20</sup>. Para a digestão das amostras foram pesados 0,5g de peixe diretamente no tubo de vidro de digestão e, em seguida, adicionados 10mL de mistura sulfonítrica ( $HNO_3:H_2SO_4$  1:1 (v/v) com 0,1 % (m/v) de  $V_2O_5$ ) e deixado em repouso por aproximadamente 12 horas. Após o repouso, a mistura foi submetida a aquecimento em banho-maria a 90°C durante 3 horas. Em seguida, adicionaram-se 5 mL de  $KMnO_4$  7 % (m/v) e submeteu-se novamente a mistura a aquecimento em banho-maria a 90 °C durante 3 horas. O excesso de oxidante foi reduzido com 900µL de solução de cloridrato de hidroxilamina 20 % (m/v). Transferiu-se o conteúdo do tubo para balão volumétrico de 50mL e completou-se o volume com água destilada e deionizada.

Para a quantificação do mercúrio total presente, utilizou-se um ICP OES simultâneo da VARIAN, modelo VISTA-MPX (Mulgrave, Austrália) e um gerador de hidretos VARIAN – VGA77 (Mulgrave, Austrália), usando argônio como gás de arraste e para a formação do plasma. As condições de operação do instrumento foram: potência de rádio frequência = 1,0 kW, fluxo do argônio = 15L/min, fluxo do gás auxiliar = 1,5L/min, tempo de replicata = 10s, tempo de estabilização = 15s, tempo de limpeza = 10s, replicatas = 3, correção de background e comprimento de onda para leitura do mercúrio = 194,164nm.

## Validação do método

Para a determinação dos parâmetros de validação foram adotados os critérios estabelecidos pelo FDA<sup>21,22</sup>. Avaliou-se a exatidão do método utilizando-se um material de referência certificado de tecido de ostra (NIST SRM 1566b, Oyster Tissue) com valor certificado para o mercúrio de  $0,0371 \pm 0,0013$  mg/kg, sendo  $0,036 \pm 0,003$  mg/kg (n = 5; z-score = 0,8) o valor encontrado experimentalmente. Utilizou-se também o método de adição de padrão e a recuperação encontrada variou entre 90 a 98 % para adição de mercúrio entre 0,02 a 0,04mg/kg, com coeficiente de variação entre 1% a 3 %,

para n = 3 repetições em cada faixa de concentração. Para a determinação do limite de detecção (LOD) e do limite de quantificação (LOQ) foram preparados 10 brancos dos reagentes com adição de quantidade de mercúrio equivalente a metade do primeiro ponto da curva analítica. Os limites de detecção e de quantificação foram 0,04mg/kg (3 vezes o desvio-padrão de 10 repetições de branco x fator diluição) e 0,07mg/kg (10 vezes o desvio-padrão de 10 repetições de branco x fator diluição), respectivamente. A precisão do método avaliada pelo coeficiente de variação de cinco repetições analíticas foi de 9 %. A curva de calibração na faixa de 0,5 a 50µg/L foi linear em toda faixa de concentração (r = 0,9999). O teor de carbono residual da amostra encontrado foi de 4 %. Os parâmetros ensaiados indicaram adequação do método empregado.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para as 257 amostras de peixes analisadas foram calculadas as médias, estimativas de desvio-padrão, valores mínimos e máximos e a mediana (em peso úmido) para o total de amostras de cada município e os resultados estão apresentados na Tabela 2. As espécies analisadas apresentaram concentração de mercúrio total abaixo dos limites estabelecidos pela legislação brasileira vigente<sup>11</sup> que é de 0,5mg/kg para pescado não-predador e 1mg/kg para pescado predador. Somente em duas amostras de peixes predadores foram encontrados níveis de mercúrio acima de 0,5mg/kg. Estas amostras foram procedentes das cidades de Santos e Guarujá, das espécies meca (Hg =  $0,878 \pm 0,099$  mg/kg) e bagre (Hg =  $0,660 \pm 0,070$  mg/kg), tendo sido coletadas no entreposto e em supermercado, respectivamente. Cabe considerar que o peixe denominado por meca é, na verdade, uma espécie pelágica migradora, que vive em águas afastadas da costa, inclusive internacionais, sendo apenas desembarcada na Baixada Santista. A bioacumulação do contaminante inorgânico, portanto, pode ter ocorrido a partir de fontes que escapam ao controle das autoridades nacionais. Já o bagre é espécie demersal-bentônica, o que a expõe mais ao risco de bioacumulação do Hg por ingerir presas associadas ao sedimento de fundo, onde tende a se concentrar o metal, mesmo anos após a interrupção de descargas contaminantes.

A Tabela 3 apresenta os resultados encontrados para o teor de mercúrio total para as espécies de pescados estudadas. As amostras eram predominantemente da família *Sciaenidae*, ou seja, compostas por goetes (32 amostras), pescadas (42 amostras) e corvinas (57 amostras), totalizando 58% da amostragem total. As sardinhas também foram representativas (30 amostras) e as outras espécies apareceram em menor proporção variando de 1 a 9 amostras por espécie estudada.

**Tabela 2.** Concentrações médias  $\pm$  estimativas de desvios-padrão, valores mínimos e valores máximos de mercúrio total, em mg/kg, encontrado nas amostras de peixes coletadas em diferentes municípios da Baixada Santista/São Paulo.

Localidade	n*	Mercúrio total (mg/kg)			
		Média $\pm$ Desvio-Padrão	Mínimo	Máximo	Mediana
Mongaguá	10	0,092 $\pm$ 0,058	< 0,07	0,217	0,091
Santos	64	0,125 $\pm$ 0,129	< 0,07	0,878	0,100
Peruíbe	9	0,087 $\pm$ 0,120	< 0,07	0,357	0,030
Bertioga	20	0,093 $\pm$ 0,102	< 0,07	0,390	0,035
Praia Grande	20	0,096 $\pm$ 0,083	< 0,07	0,355	0,085
Guarujá	57	0,099 $\pm$ 0,104	< 0,07	0,660	0,060
Itanhaém	3	0,099 $\pm$ 0,104	< 0,07	0,180	0,020
São Vicente	34	0,075 $\pm$ 0,045	< 0,07	0,180	0,057
Ceagesp	40	0,088 $\pm$ 0,087	< 0,07	0,407	0,068

\*n = número de amostras de peixe coletadas por localidade.

**Tabela 3.** Concentrações médias  $\pm$  estimativas de desvios-padrão, valores mínimos e máximos de mercúrio total (mg/kg) encontrados para as diferentes espécies de peixes analisadas.

Espécies	n	Mercúrio total (mg/kg)		
		Média $\pm$ Desvio-padrão	Mínimo	Máximo
Abrótea	6	0,082 $\pm$ 0,018	<0,07	0,110
Anchova	4	0,107 $\pm$ 0,030	<0,07	0,143
Atum	2	0,125 $\pm$ 0,078	<0,07	0,180
Bagre	1	0,660	0,660	0,660
Betara	16	0,086 $\pm$ 0,038	<0,07	0,211
Cabrinha	8	0,151 $\pm$ 0,113	<0,07	0,407
Chora-chora	2	<0,07	<0,07	<0,07
Cioba	5	<0,07	<0,07	<0,07
Cocoroça	2	0,170 $\pm$ 0,006	0,166	0,174
Corvina	57	0,122 $\pm$ 0,080	<0,07	0,387
Goete	32	0,088 $\pm$ 0,032	<0,07	0,190
Guaivira	4	0,123 $\pm$ 0,055	<0,07	0,180
Meca	1	0,878	0,878	0,878
Merluza	2	<0,07	<0,07	<0,07
Palombeta	2	0,136 $\pm$ 0,025	0,118	0,153
Peixe Lua	2	0,276 $\pm$ 0,067	0,228	0,323
Peixe Sapo	2	0,161 $\pm$ 0,058	0,120	0,202
Pescada	42	0,094 $\pm$ 0,045	<0,07	0,258
Sardinha	30	<0,07	<0,07	<0,07
Sororoça	5	0,077 $\pm$ 0,016	<0,07	0,105
Tainha	16	<0,07	<0,07	<0,07
Outros	16	0,123 $\pm$ 0,089	<0,07	0,355

\* n = número de amostras de peixe da espécie analisada.

Na Figura 1 apresenta-se a concentração média de mercúrio, calculada em base úmida, para os oito municípios amostrados na Baixada Santista. O município que apresentou amostras com maior concentração de mercúrio foi Santos e com menores concentrações foi São Vicente. Em Santos, as principais espécies de peixes foram a pescada, goete, meca, abrótea, corvina e sardinha. Estas são as espécies de maior comercialização na Baixada Santista e, embora o teor de mercúrio total esteja aquém dos valores máximos permitidos pela legislação nacional<sup>11</sup>, o risco de contaminação pode existir na dependência da quantidade de pescado ingerida, ainda que seja uma situação difícil de ocorrer em razão de que o hábito alimentar do brasileiro não contempla a carne de peixe entre as preferidas. Apenas em termos individuais pode haver algum risco. No Japão, onde há um alto consumo de peixe, o nível máximo de mercúrio total permitido é de 0,4mg/kg, inferior ao de outros países onde o consumo de pescado é menor. Contribuiu para o valor geral de Hg total detectado nas amostras de Santos a maior concentração encontrada na carne de meca.

Na Figura 2 apresenta-se a distribuição dos pontos da cadeia produtiva do pescado nos quais se coletaram amostras, sendo que predominaram as coletas em mercado, supermercado e em barcos de pesca. As amostras provenientes de mercado e supermercado foram predominantes, pois estes são os locais de maior volume de comercialização, certamente em razão da praticidade e da previsível melhor higiene do produto.

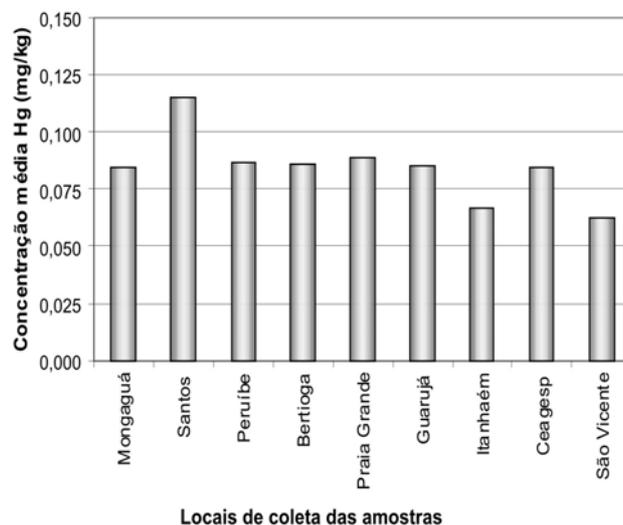
Na Figura 3 apresenta-se a distribuição percentual das amostras nos diferentes municípios. As cidades em que foram coletadas mais amostras (Santos, Guarujá, e São Vicente, além do Ceagesp) são as que possuem mais equipes ligadas aos serviços de inspeção de produtos de origem animal.

A Figura 4 mostra o percentual de participação nas amostras das espécies predominantes. Quatro delas (corvina, cabrinha, sardinha e betara) somaram 54% das amostras analisadas. Estas são as quatro espécies de maior produção desembarcada e comercializada na Baixada Santista, em função das capturas e do menor preço. As espécies com menos de 2% do total foram agrupadas em outros.

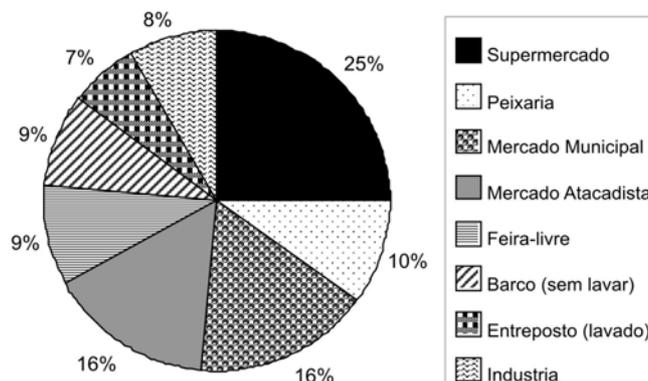
Kitahara et al.<sup>7</sup> analisaram amostras de peixes de água-doce de diferentes locais de captura e procedência comercial do país inteiro e encontraram níveis de concentração de Hg de 0,01 a 0,02mg/kg para tilápia e 0,04 a 0,26mg/kg para matrinxã. Fu Fumoto e Oliveira<sup>23</sup> analisaram peixes marinhos e de água doce comercializados na cidade de São Paulo e encontraram níveis de mercúrio variando de 0,02 – 0,06mg/kg para a tilápia. Damato et al.<sup>24</sup> analisaram mexilhões procedentes da Baixada Fluminense e encontraram níveis médios de mercúrio que variaram de 0,03 a 0,06mg/kg. De modo geral, esses

resultados estão próximos aos apresentados na Tabela 2 e Tabela 3. Estes estudos mostram a vulnerabilidade dos sistemas aquáticos à contaminação por mercúrio, tornando necessário o constante monitoramento do pescado destinado ao consumo humano.

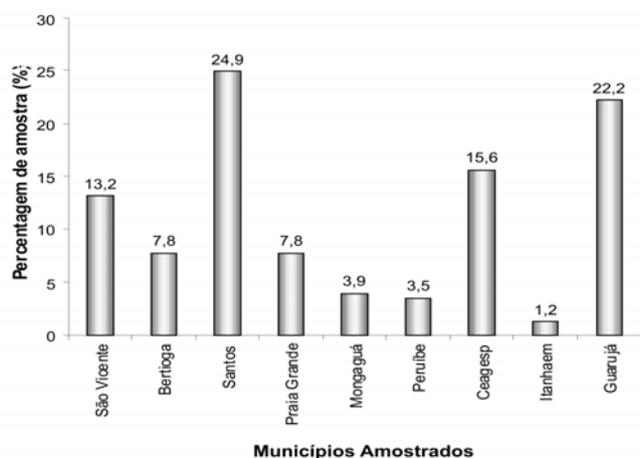
O resultado desta pesquisa é altamente satisfatório sob o ponto de vista do consumidor, devido aos baixos valores encontrados para o mercúrio total presente nas amostras estudadas. Este estudo não permitiu identificar se há probabilidade de contaminação por mercúrio em algum elo da cadeia produtiva do pescado marinho da Baixada Santista, pois não foram encontrados níveis deste contaminante que fornecesse dados para esta afirmação.



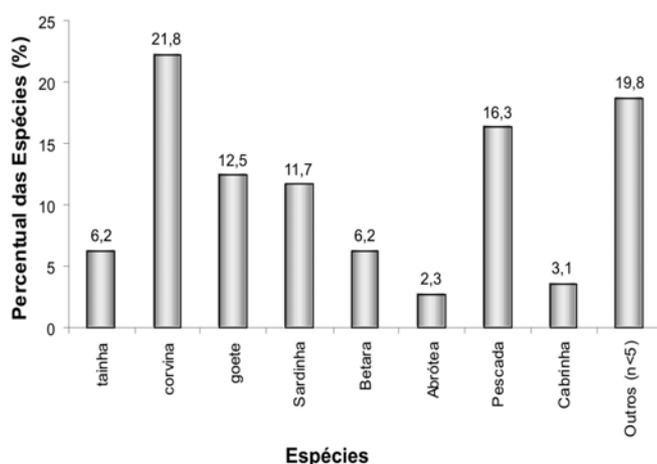
**Figura 1.** Concentração média de mercúrio (Hg) total, em base úmida, por município de coleta e amostras procedentes do CEAGESP da Baixada Santista.



**Figura 2.** Distribuição percentual das amostras de peixe nos diferentes pontos da cadeia produtiva do pescado.



**Figura 3.** Distribuição percentual das amostras por município.



**Figura 4.** Participação percentual das principais espécies no total amostrado.

## CONCLUSÃO

Praticamente as 257 amostras de peixes procedentes da Baixada Santista, litoral de São Paulo, no período 2005/2006 encontravam-se em condições adequadas para o consumo humano quanto à presença do mercúrio total, pois apresentaram níveis inferiores ao estabelecido pela legislação brasileira (0,5mg/kg para peixe não predador e 1,0mg/kg para peixe predador), não importando o local ou a espécie analisada com exceção das espécies de meca e de bagre.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao suporte financeiro obtido junto à FAPESP (Processo nº03/06456-4).

## REFERÊNCIAS

1. Germano PML, Oliveira JCF, Germano MIS. O pescado como causa de toxinfecções bacterianas. *Hig Aliment* 1993; 7 (28): 40-5.
2. Morales-Aizpurúa IC, Tenuta-Filho A, Sakuma AM, Zenebon O. Mercúrio total em cação comercializado em São Paulo – SP, Brasil. *Cienc Tecnol Aliment* 1999; 19 (3): 429-32.
3. Sellanes AG, Mársico ET, Santos NN, Clemente SCS, Oliveira GA, Monteiro ABS. Mercúrio em peixes. *Acta Scientiae Veterinariae* 2002; 30(2): 107-12.
4. Ferreira JR. Mercury in water and fish from the São Vicente estuary near Santos, Brazil. *Ambio* 1979; 8 (1): 210-13.
5. Lacerda LD, Pfeiffer WC, Malm O, Souza CMM, Silveira EG, Bastos WR. Mercúrio no meio ambiente: Risco potencial das áreas garimpeiras no Brasil. *Acta Limnologica Brasiliensis* 1990; 3 (2): 969-77.
6. Bisinoti MC, Jardim WF. O comportamento do metilmercúrio (METILHg) no ambiente. *Quim Nova* 2004; 27 (4): 593-600.
7. Kitahara SE, Okada IA, Sakuma AM, Zenebon O, Jesus RS, Tenuta-Filho A. Mercúrio total em pescado de água doce. *Cienc Tecnol Aliment* 2000; 20 (2): 267-73.
8. Silva A M. Toxicologia do mercúrio no meio ambiente. São Paulo. Cered, 1951. 26p.
9. Peterson CL, Klawe WL, Sharp GD. Mercury in tunas: a review. *Fish Bull* 1973; 71 (3): 603-13.
10. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. (ATSDR). Toxicological profile for mercury. Atlanta, U. S. Public Health Service; 1989.
11. Brasil. Portaria nº 685 de 1998 da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder executivo*. Brasília, DF, 27 ago. 1998. Seção 1, nº 1, p. 1415-37.
12. Johnston JN, Savage GP. Mercury consumption and toxicity with reference to fish and fish meal. *Nutr Abstr Rev* 1991; 61 (2): 73-116.
13. Souza JVB, Goyannes AL. Contenido de mercúrio en productos de la pesca por espectrometria de absorción atômica en vapor frio. *Anales Bromatologia* 1986; 44: 45-57.
14. Limaverde Filho AM, Campos RC, Goes VA, Pinto RAG. Avaliação da perda de mercúrio total em peixes antes e após os processos de fritura e cocção. *Cienc Tecnol Aliment* 1999; 19 (1): 19-22.
15. Pfeiffer SC. Heavy metals surveys in Brazilian coastal environments. In: Seeligier U, Lacerda LD, Patchineelam SR. eds. *Metals in Coastal Environments of Latin America*. Berlin, Springer-Verlag, 1988, p.3-8.

16. Silva CCA, Tommasi LR, Boldrini CV, Pereira DN. Níveis de mercúrio na Baixada Santista. *Ciênc Cult* 1983; 35 (6): 771-3.
17. Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental [CETESB]. Resolução SMA n. 63, de 16 dez 1996: Rio Itaguapé. São Paulo; 1997. p.15.
18. Pereira OM, Henriques MB, Zenebon O, Sakuma A, Kira CS. Determinação dos teores de Hg, Pb, Cd, Cu e Zn em moluscos (*Crassostrea brasiliana*, *Perna perna* e *Mystella falcata*). *Rev Inst Adolfo Lutz* 2002; 61 (1): 19-25.
19. Vieira LM, Nunes VS, Campos RC. Níveis de mercúrio total em carne de peixes como indicadores de contaminação em sistemas aquáticos do Pantanal. In: IV Simpósio sobre Recursos Naturais e Sócio-econômicos do Pantanal, Corumbá/MS, 2004: p. 8.
20. Morgano MA, Gomes PC, Mantovani DMB, Perrone AAM, Santos T. Níveis de mercúrio total em peixes de água doce de pisciculturas paulistas. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2005; 25 (2): 250-253.
21. FDA. Food and Drug Administration. Guideline on general principles of process, 1987 [cited 2007 Jan 10]. Available from: <http://www.fda.gov/cder/guidance/pv.htm>.
22. FDA. Food and Drug Administration. Guidance for Industry, Analytical procedures and methods validation, 2000 [cited 2007 Jan 10]. Available from: <http://www.fda.gov/cber/gdlns/methval.pdf>.
23. Fu Kumoto CJ, Oliveira CAF. Determinação de mercúrio em pescado comercializado no município de São Paulo, SP-Brasil. *Hig Aliment*. 1995; 9 (40): 27-30.
24. Damato C, São Clemente SC, Santos NN. Levantamento sobre os índices de mercúrio presentes em mexilhões (*Perna perna* L.) oriundos da Praia de Piratininga e Baía de Guanabara e Sepitiba. *Hig Aliment* 1997; 11 (50): 30-5.

# Detecção de bactérias Gram-negativas não fermentadoras em água tratada para diálise

## Detection of non-fermenting Gram-negative bacteria in treated water for dialysis procedure purpose

RIALA6/1124

Adriana BUGNO\*, Adriana Aparecida Buzzo ALMODÓVAR, Tatiana Caldas PEREIRA, Mariângela Tirico AURICCHIO

\*Endereço para correspondência: Instituto Adolfo Lutz, Divisão de Bromatologia e Química, Av. Dr. Arnaldo, 355 São Paulo/ SP

CEP: 01246-902, telefone: 3068-2963, fax: 3068-2926, e-mail: [adrbugno@ial.sp.gov.br](mailto:adrbugno@ial.sp.gov.br)

Recebido: 28/03/2007 – Aceito para publicação: 25/05/2007

### RESUMO

No Brasil, 90% dos pacientes renais crônicos dependem dos procedimentos de hemodiálise para remover produtos de degradação metabólica, excesso de água e de sais minerais do organismo, e para restaurar o equilíbrio ácido-base e eletrolítico. A água é o principal componente do tratamento por diálise e suas qualidades química e microbiológica são essenciais para evitar riscos adicionais ao paciente. As soluções para diálise e os equipamentos proporcionam ambientes adequados ao desenvolvimento microbiano, especialmente bactérias Gram-negativas. Além de bacteremias, os microrganismos Gram-negativos podem estar relacionados à ocorrência de reações pirogênicas. Este estudo teve por objetivo verificar a ocorrência de bactérias Gram-negativas não fermentadoras de glicose em 97 amostras de água tratada para diálise e 27 amostras de dialisatos, avaliadas entre junho de 2005 e dezembro de 2006. As bactérias Gram-negativas não fermentadoras de glicose foram detectadas em 29,6% das amostras de dialisatos e em 49,5% das amostras de água tratada. Nove espécies foram isoladas e identificadas, sendo a mais freqüente o complexo *Burkholderia cepacia* (59,0%), seguido de *Stenotrophomonas maltophilia* (13,1%).

**Palavras-chave.** água para diálise, dialisato, bactérias Gram-negativas, bactérias não fermentadoras

### ABSTRACT

In Brazil, 90% of patients with renal failure depend on the hemodialysis procedures in order to remove the metabolic degradation products, water and mineral salts excesses from the organism, restoring the electrolyte and acid-base balance. Water is the main component of the dialysis therapy, and its chemical and microbiology quality is essential to avoid additional risks to patient. Dialysis solutions and equipments provide suitable environments for the microbial growth, particularly Gram-negative bacteria. In addition to bacteremia, Gram-negative microorganisms can be related to pyrogenic reactions. The objective of this study was to investigate the occurrence of non-fermenting Gram-negative bacteria in 97 dialysis water samples, and 27 dialysates analyzed from June 2005 to December 2006. Non-fermenting Gram-negative bacteria were detected in 29.6% of dialysates and in 49.5% of treated water samples. Nine bacteria species were isolated and identified; the *Burkholderia cepacia* complex was the most frequent (59.0%), followed by *Stenotrophomonas maltophilia* (13.1%).

**Key words.** dialysis water, dialysate, Gram-negative bacteria, non-fermenting bacteria

## INTRODUÇÃO

A insuficiência renal, que corresponde à diminuição da capacidade dos rins para eliminar substâncias tóxicas presentes no sangue, tem como causas principais, no Brasil, diabetes, hipertensão arterial, inflamações e infecções dos rins.

Levantamentos estatísticos realizados pela Sociedade Brasileira de Nefrologia indicam progressão anual no número de pacientes renais crônicos no país: 59.153 pacientes em 2004, 65.121, em 2005 e 70.872, em 2006; aproximadamente 90% destes pacientes (64.306 pacientes, em 2006) dependem do procedimento de hemodiálise, que corresponde a um processo artificial que visa repor as funções renais de remoção de produtos de degradação metabólica, o excesso de água e de sais minerais do organismo e, estabelecer uma nova situação de equilíbrio.

O tratamento dialítico, que modificou o prognóstico dos pacientes com insuficiência renal crônica, é também responsável por complicações, cuja intensidade e frequência são cada vez mais descritas<sup>1,2</sup>.

Na hemodiálise, o fluido de diálise ou dialisato é utilizado para facilitar a normalização do balanço eletrolítico e a remoção de substâncias tóxicas de baixo peso molecular presentes no plasma. O dialisato consiste principalmente de água tratada, misturada com solução concentrada de eletrólitos, tampão e glicose<sup>1</sup>.

Até a década de 70, a água potável era utilizada na hemodiálise; entretanto, evidenciou-se correlação entre os contaminantes na água potável e os efeitos adversos do procedimento<sup>1-4</sup>, sendo necessária a utilização de tratamentos complementares, com a finalidade de adequar as características físico-químicas e microbiológicas da água potável à sua aplicação em procedimentos dialíticos.

Em geral, os sistemas de tratamento de água incluem filtros primários, abrandadores, filtros de carvão ativado, deionizadores e osmose reversa, cuja eficiência depende da capacidade do equipamento, da natureza e origem geográfica da água a ser tratada, além de variações sazonais<sup>1-7</sup>. Embora a escolha do tipo de sistema de tratamento da água seja crucial, é um erro supor que a melhor escolha significa que todos os problemas relacionados à qualidade da água estão resolvidos, pois a qualidade depende também da manutenção e monitoramento do sistema.

Considerando que cada paciente é exposto indiretamente a aproximadamente 120 litros de água a cada sessão de hemodiálise, com duração média de 3 a 4 horas, a qual é

realizada três vezes por semana e, que a barreira entre o sangue do paciente e o dialisato é realizada por uma membrana semi-permeável, a qual pode permitir acesso direto dos contaminantes para o sangue do paciente<sup>1,6</sup>, verifica-se que a qualidade química e microbiológica da água utilizada para diálise é essencial para evitar riscos adicionais ao paciente<sup>2,3,5,8-10</sup>.

Entre janeiro de 1980 e junho de 1999, o “Center for Diseases Control and Prevention” (CDC) investigou 16 surtos de bacteremia ou reações pirogênicas em pacientes submetidos a hemodiálise, sendo que foi relatado a ocorrência de cinco surtos relacionados ao inadequado tratamento de água e três surtos relacionados à contaminação dos dialisatos<sup>9</sup>.

Vários fatores contribuem para a ocorrência de contaminação microbiana em sistemas de tratamento de água para diálise: a) todos os componentes do sistema permitem o desenvolvimento microbiano, particularmente de bactérias Gram-negativas, entre as quais podem ser citadas espécies de *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Burkholderia* e *Stenotrophomonas*<sup>2,9-15</sup> e de micobactérias não tuberculosas<sup>2,5,9,10,14</sup>; b) a presença de microrganismos, nutrientes orgânicos e pH, associados a fatores físicos (pontos cegos, baixo fluxo ou áreas de estagnação de água) favorecem a formação de biofilmes em todo o sistema de tratamento e distribuição de água tratada, e também no circuito hidráulico da máquina de diálise<sup>1,2,4,7,11,15</sup>; c) biofilmes facilitam a persistência microbiana no sistema, mesmo após procedimentos de sanitização e desinfecção, e atuam como fonte de bactérias, endotoxinas, fragmentos de endotoxinas e polissacarídeos, que são liberados na água e aumentam o risco de ocorrência de bacteremia e reações pirogênicas<sup>1,2,5,7,10,11,15</sup>.

Ao lado de doenças cardiovasculares, as infecções são as principais causas de morte em pacientes dialíticos<sup>3,9,12,13</sup> e o reconhecimento do risco potencial que representava a qualidade da água utilizada nos tratamentos dialíticos fez com que vários órgãos e comissões estabelecessem critérios e normas para a especificação da água a ser utilizada. Dentre estas normas, cita-se as definidas na “European Pharmacopoeia”, as sugeridas pela “Association for the Advancement of Medical Instrumentation” (AAMI)<sup>2,4,6,7</sup> e, no Brasil, os critérios de qualidade estabelecidos na Resolução RDC nº 154/2004<sup>16</sup> (Tabela 1).

Os critérios de qualidade referentes à carga microbiana presente na água tratada estão relacionados à ocorrência de bacteremias e reações pirogênicas. Teoricamente, a membrana intacta do dialisador deve prevenir a passagem de bactérias do dialisato para o sangue do paciente, porém casos de bacteremia

**Tabela 1.** Parâmetros microbiológicos para água tratada para diálise.

Norma	Bactérias heterotróficas	Endotoxina bacteriana	Coliformes totais
AAMI	200 UFC/mL	2 EU/mL	—
European Pharmacopoeia	100 UFC/mL	0,25 EU/mL	—
Resolução RDC nº 154/2004	200 UFC/mL	2 EU/mL	Ausência (em 100 mL)

podem ocorrer se houverem defeitos na integridade da membrana, se o nível de contaminação microbiana for elevado ou por contaminação durante o processo de reuso dos dialisadores<sup>2,5,9,10</sup>. Além disso, altas cargas microbianas podem estar associadas a elevado conteúdo de endotoxinas bacterianas, as quais podem interagir com monócitos através da membrana do dialisador e estimular a liberação indireta de citocinas ou podem atravessar a membrana e estimular diretamente uma resposta imune<sup>5,9,10,14</sup>.

Considerando que bactérias Gram-negativas são as principais responsáveis pela ocorrência de endotoxinas bacterianas, verifica-se o diferencial nos critérios de qualidade estabelecidos pela legislação brasileira quanto à pesquisa de bactérias do grupo dos coliformes totais, as quais correspondem a cerca de 20 espécies de bactérias Gram-negativas, entéricas e não entéricas, não esporogênicas, aeróbias ou anaeróbias facultativas, capazes de fermentar lactose com produção de gás, em 24 a 48 horas a 35°C. Entretanto, a legislação brasileira falha ao não considerar a presença de bactérias Gram-negativas não fermentadoras, como *Pseudomonas aeruginosa*, cuja presença está relacionada à ocorrência de endotoxinas bacterianas e à possibilidade de formação de biofilmes.

Os riscos decorrentes da presença de *Pseudomonas aeruginosa* e outras bactérias Gram-negativas não fermentadoras em água tratada para diálise foram considerados neste estudo, que teve por objetivo verificar a ocorrência destes microrganismos em amostras de água tratada para diálise e dialisatos, de diversas clínicas de diálise do Estado de São Paulo, avaliadas entre junho de 2005 e dezembro de 2006.

## MÉTODOS

Foram analisadas 27 amostras de dialisatos e 97 amostras de água tratada para diálise, das quais 31 amostras foram coletadas após o sistema de tratamento; 24 amostras, na entrada da máquina de diálise e 42 amostras, na sala do reuso.

A coleta foi realizada segundo recomendações da "American Public Health Association" (APHA)<sup>17</sup>, em frascos estéreis com 300 mL de capacidade. Antes da amostragem, o ponto de coleta foi

desinfetado com álcool 70% e a água foi mantida em escoamento por 3 a 5 minutos; somente após este período foi realizada a coleta. As amostras foram mantidas sob refrigeração durante seu transporte ao laboratório e submetidas à análise microbiológica imediatamente após seu recebimento. Somente foram submetidas às análises as amostras recebidas, no máximo, até 12 horas após a coleta.

Para a pesquisa de bactérias Gram-negativas não fermentadoras, foi utilizada técnica recomendada pela APHA<sup>17</sup> para a pesquisa de *Pseudomonas aeruginosa* em águas: 100mL da amostra foram adicionados a 100mL de Caldo Asparagina, concentração dupla, e incubados a 37°C por 48 horas. Após o período de incubação, foram efetuados repiques em Agar Verde Brillante, Agar Cetrimide e Agar Leite, incubados a 37°C por 48 horas. A identificação presuntiva dos isolados foi realizada em Meio Rugai e Araujo modificado<sup>18</sup>, enquanto a confirmação foi realizada em sistema de identificação bioquímica API 20NE.

## RESULTADOS

Neste estudo, bacilos Gram-negativos não fermentadores foram detectados em 08 amostras (29,6%) de dialisatos e em 48 amostras (49,5%) de água tratada. Com relação as amostras de água tratada, verificou-se a presença destes microrganismos em 15 amostras (48,4%) coletadas na saída do tratamento, 10 amostras (41,7%) coletadas na entrada da máquina de diálise e em 23 amostras (54,8%) coletadas no reuso. Nove espécies de bacilos Gram-negativos não fermentadores de glicose foram isolados e identificados, sendo apresentada, na Tabela 2, a frequência de detecção em função do tipo de amostra analisada.

O complexo *Burkholderia cepacia* foi o mais frequentemente isolado, seguido de *Stenotrophomonas maltophilia*, que representaram 72,1% de todos os isolados obtidos e detectados em todos os pontos de coleta. O complexo *Burkholderia cepacia* foi o mais prevalente em todos os tipos de amostras, seguido de *Stenotrophomonas maltophilia* e *Ralstonia pickettii*, em água tratada e de *Pseudomonas fluorescens*, em dialisatos.

**Tabela 2.** Bacilos Gram-negativos não fermentadores isolados em amostras de água tratada para diálise e dialisatos.

Microrganismo	Nº de amostras positivas				Total
	Saída Tratamento	Água tratada		Dialisato	
		Entrada Máquina	Reuso		
Complexo <i>Burkholderia cepacia</i>	10	5	16	5	36
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	2	2	3	1	8
<i>Ralstonia pickettii</i>	2	0	2	0	4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	1	1	1	3
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	0	0	1	2	3
<i>Pseudomonas putida</i>	0	1	1	0	2
<i>Alcaligenes xylosoxidans</i>	1	0	2	0	3
<i>Alcaligenes faecalis</i>	1	0	0	0	1
<i>Brevundimonas vesiculares</i>	0	1	0	0	1

## DISCUSSÃO

Bactérias Gram-negativas, como *Pseudomonas* spp, *Escherichia coli* e *Enterobacter* spp, foram isoladas em amostras clínicas e em água tratada e dialisatos associados à ocorrência de surtos de infecção<sup>9,12</sup>. Estudos bacteriológicos efetuados nestas amostras indicam que os gêneros *Pseudomonas* e *Stenotrophomonas* são mais frequentemente isolados<sup>9,11,12</sup>, embora *Burkholderia* spp, *Comamonas* spp, *Acinetobacter* spp, *Flavobacterium* spp, *Alcaligenes* spp e *Xantomonas* spp possam também estar presentes<sup>2,7,14</sup>.

Considerando que bactérias Gram-negativas não fermentadoras podem se desenvolver rapidamente em águas, inclusive quando tratadas por deionização, destilação e osmose reversa<sup>9,10,12</sup>; que estes microrganismos podem ser responsáveis pela ocorrência de bacteremias e endotoxemias em hemodíalises, mesmo quando os níveis de contaminação microbiológica da água tratada estão em conformidade com padrões estabelecidos<sup>9,10,12</sup> e que a água tratada e dialisatos podem ser reservatórios para várias espécies de *Pseudomonas* e outros bacilos Gram-negativos, é necessário aprimorar o monitoramento microbiológico da água tratada a fim de se conhecer as espécies potencialmente patogênicas que possam estar presentes entre a população bacteriana e estabelecer estratégias de controle da contaminação do sistema que atuem sobre este grupo de bactérias.

Muitos surtos associados à diálise demonstram o potencial de morbidade e mortalidade relacionado às infecções em pacientes dialíticos, sendo que muitos destes surtos poderiam ter sido evitados pelo uso de adequado tratamento de água, eficiente desinfecção do sistema de tratamento e de máquinas de diálise, pela adesão a rígidos protocolos de reprocessamento de dialisadores e por rigoroso monitoramento da qualidade da água tratada.

Sendo um importante componente no tratamento dialítico, a escolha do tipo de sistema de tratamento da água é importante, mas a melhor escolha não garante a qualidade da água, que também depende da manutenção e monitoramento do sistema.

Os resultados obtidos neste estudo, associado ao reconhecimento do papel da qualidade da água para a prevenção de riscos a pacientes dialíticos, conduzem à necessidade de que os padrões microbiológicos e de endotoxinas na água tratada sejam revistos e adotados parâmetros adequados quanto a presença de microrganismos indicadores, como *Pseudomonas* spp e outras bactérias Gram-negativas não fermentadoras.

## REFERÊNCIAS

1. Hoenick NA, Ronco C, Levin R. The importance of water quality and haemodialysis fluid composition. *Blood Purif*, 2006; 24: 11-8.
2. Silva AMM, Martins CTB, Ferraboli R, Jorgetti V, Romão Junior JE. Revisão/Atualização em Diálise: Água para hemodíalise. *J Bras Nefrol*, 1996; 18(2): 180-8.
3. Vorbeck-Meister I, Sommer R, Vorbeck F, Hörl WH. Quality of water used for haemodialysis: bacteriological and chemical parameters. *Nephrol Dial Transplant*, 1999; 14: 666-75.
4. Pontoriero G, Pozzoni P, Andrulli S, Locatelli F. The quality of dialysis water. *Nephrol Dial Transplant*, 2003; 18 (suppl 7): vii21-5.
5. Morin P. Identification of the bacteriological contamination of a water treatment line used for haemodialysis and its disinfection. *J Hosp Infect*, 2000; 45: 218-24.
6. Hoenick NA, Levin R. The implications of water quality in hemodialysis. *Semin Dial*, 2003; 16(6): 492-7
7. McFeters GA, Broadaway SC, Pyle BH, Egozy Y. Distribution of bacteria within operating laboratory water purification systems. *Appl Environm Microbiol*, 1993; 59 (5): 1410-5.
8. Lebedo I. On-line preparation of solutions for dialysis: practical aspects versus safety and regulations. *J Am Soc Nephrol*, 2002; 13: S78-S83.
9. Roth VR, Jarvis WR. Outbreaks of infection and or pyrogenic reactions in dialysis patients. *Semin Dial*, 2000; 13 (2):92-6.
10. Favero MS. Role of the CDC in hemodialysis: an historical perspective. *Semin Dial*, 2000; 13 (2): 64-7.
11. Zunino P, Beltrán L, Zunino L, Méndez H, Percovich V et al. Microbiological quality of hemodialysis water in a three-year multicenter study in Uruguay. *J Nephrol*, 2002; 15:374-9.
12. Arvanitidou M, Vayona A, Spanakis N, Tsakris A. Occurrence and antimicrobial resistance of Gram-negative bacteria isolated in haemodialysis water and dialysate of renal units: results of a Greek multicentre study. *J Appl Microbiol*, 2003; 95: 180-5.
13. Saxena AK, Panhora BR. Haemodialysis catheter-related bloodstream infections: current treatment options and strategies for prevention. *Swiss Med Wkly*, 2005; 135:127-38.
14. Oie S, Kamiya A, Yoneda I, Uchiyama K, Tsuchida M, Takai K et al. Microbial contamination of dialysate and its prevention in haemodialysis units. *J Hosp Infect*, 2003; 54: 115-9.
15. Cappelli G, Sereni L, Scialoja MG, Morselli M, Perrone S, Ciuffreda A et al. Effects of biofilm formation on haemodialysis monitor disinfection. *Nephrol Dial Transplant*, 2003; 18: 2105-11.
16. Brasil, Leis e Decretos. Resolução RDC nº154 de 15 de junho de 2004. Estabelece o Regulamento Técnico para funcionamento dos Serviços de Diálise. Disponível em <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=22875&word>>. Acesso em 29 de dezembro de 2006.
17. American Public Health Association. Standard Methods for the examination of Water and Wasterwater. 20<sup>a</sup> ed. Baltimore: United Book Press, Inc; 1998.
18. Pessoa GVA, Silva EAM. Meios de Rugai e lisinamotilidade combinados em um só tubo para identificação presuntiva de enterobactérias. *Rev Inst Adolfo Lutz*, 1972; 32: 97-100.

# Determinação de basicidade em produtos alisantes de cabelos contendo guanidina e hidróxido de cálcio em sua formulação

## Alkalinity determination in guanidine and hydroxide-containing hair straightening creams

RIALA6/1125

Maria Cristina SANTA BARBARA\*, Lígia Luriko MIYAMARU, Jaim LICHITIG

\*Endereço para correspondência: Instituto Adolfo Lutz, Divisão de Bromatologia e Química, Seção de Cosméticos e Produtos de Higiene, Av. Dr. Arnaldo, 355 CEP. 01246-902 São Paulo/ SP. e-mail: [mbarbara@ial.sp.gov.br](mailto:mbarbara@ial.sp.gov.br)  
Recebido: 26/03/2007 – Aceito para publicação: 20/08/2007

### RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo determinar a basicidade em cremes alisantes para atender a legislação vigente que permite no máximo 7,0% p/p expresso em hidróxido de cálcio. Este estudo realizou a comparação entre dois métodos duas técnicas analíticas titulométricas. Foram utilizadas amostras “brancas” (sem princípio ativo) enriquecidas com hidróxido de cálcio nas concentrações de 3,0%, 6,0% e 8,0% (p/p); sendo oito replicatas para cada concentração. A determinação de basicidade foi efetuada por titulação direta de íons cálcio na amostra, pesou-se a amostra equivalente a 0,1500 g de hidróxido de cálcio, diluiu-se em água e ácido clorídrico, sob agitação e aquecimento, resfriou-se e titulou-se com EDTA 0,0500 mol/L, utilizando azul de hidroxinaftol como indicador. A titulação direta por neutralização de íons OH<sup>-</sup> com HCl e fenolftaleína mostrou que a recuperação não foi satisfatória o que atribuímos aos íons OH<sup>-</sup> estarem adsorvidos na mistura do creme. A precisão do método foi de 0,03 a 1,3% no intervalo de 2,9-8,0 % Ca(OH)<sub>2</sub> (p/p). A recuperação foi obtida no intervalo de 96,0-100,5%. O método do *Food Chemicals Codex 4<sup>a</sup>* edição foi utilizado em comparação ao método adaptado no laboratório. Os testes t e F mostraram que os dois métodos são equivalentes.

**Palavras-chave.** basicidade, cabelo, alisantes.

### ABSTRACT

The purpose of the present investigation was to determine the alkalinity hair straightening creams, in order to accomplish the directives of the enforced law, which allows the maximum concentration of 7.0% w/w of calcium hydroxide. Two titrametric analytical techniques were compared. Two “blanks” (without active principle) were supplemented with calcium hydroxide at the concentrations of 3.0%, 6.0%, and 8.0% (w/w), and eight replicates for each concentration were prepared. Alkalinity determination was carried out by means of direct titration of calcium ions in samples. A sample corresponding to 0.1500 g calcium hydroxide concentration was diluted in solution containing water and hydrochloric acid under shaking and heating. After cooling, this samples was with 0.0500 mol/L EDTA, and hydroxynaftol blue was employed as indicator. Direct titration by means of OH<sup>-</sup> ions neutralization with HCl and phenolphthaleine showed that the recovery was unsatisfactory; this fact could be caused by the adsorption of OH<sup>-</sup> ions into cream mixture. The method precision ranged from 0.03 to 1.3% in the interval from 2.9 to 8.0% Ca(OH)<sub>2</sub> (w/w). The recovery was obtained within the interval from 96.0% to 100.5%. For the present study the *Food Chemical Code 4<sup>th</sup>* edition technique was used and compared with the modified technique in the laboratory. The statistics T and f tests showed that both techniques are analytically equivalent.

**Key words.** alkalinity, hair, straightening products.

## INTRODUÇÃO

O progresso na tecnologia relacionado aos alisantes de cabelo tem proporcionado, em indivíduos com cabelos ondulados ou crespos, mudar naturalmente o aspecto do fio capilar e conseguir em instantes o seu objetivo com satisfação<sup>1</sup>.

O cabelo é constituído de queratina formada pelo folículo piloso contendo três camadas celulares concêntricas de fora para dentro: a cutícula, a raiz (ou córtex) e a medula (ou medular). A cutícula é formada por grandes placas, escamas transparentes e centralizadas, recobrando umas às outras; este invólucro protege a raiz que representa a parte essencial do cabelo, formada por grandes células contendo queratina, pigmentadas e unidas entre si por uma substância intercelular; cada célula apresenta microfibrilas (0,1µm de diâmetro)<sup>2,3</sup>. A queratina é uma proteína, ou seja, uma molécula formada pelo encadeamento de um grande número de aminoácidos, unidos por ligações peptídicas, ligações covalentes e, portanto, fortes e difíceis de romper. Os aminoácidos assumem as características físicas de longas fibras chamadas de cadeias protéicas, sendo que a queratina é constituída de muitas dessas fibras, que estão dispostas em paralelo e enroladas em torno uma das outras. Na queratina, cuja coesão é assegurada por ligações de enxofre e por pontes de hidrogênio, característica da estrutura queratínica, que se formam entre dois átomos de enxofre (-S-S-), são as ligações mais fortes que podem ser estabelecidas entre as cadeias polipeptídicas. Estas ligações sendo oxidantes são sensíveis aos agentes redutores<sup>4,5</sup>.

O alisamento consiste na quebra das ligações cruzadas de dissulfeto entre as cadeias de polipeptídios; o alto teor de enxofre indica que há mais ligações a serem quebradas. O cabelo dos indivíduos negros é idêntico ao dos brancos quanto ao seu conteúdo de aminoácidos, mas possui diâmetro levemente superior, menor conteúdo de água e forma anatômica diferente, quando visto em corte transversal. Nos indivíduos brancos, o cabelo possui formato simétrico e redondo, permitindo que os fios fiquem lisos e retos, enquanto que nas pessoas negras têm formato elíptico e achatado<sup>6,7</sup>.

Os alisantes/relaxantes são formados por três componentes principais: agente alcalino, fase oleosa e fase aquosa. Os agentes alcalinos mais utilizados são os hidróxidos de sódio, de lítio, de potássio ou hidróxido de guanidina conhecido como produto “sem soda” que contém a mistura de 4,0% a 7,0% p/p de hidróxido de cálcio em creme e carbonato de guanidina. Quando se misturam as duas partes são produzidos carbonato de cálcio e hidróxido de guanidina, sendo este último o que tem a propriedade de alisar o cabelo<sup>8,9</sup>.

Os alisantes precisam de um componente alcalino forte (pH= 12,5 a 13,9) que intumescce o cabelo, abrindo a cutícula; isto permite que o agente alcalino penetre na fibra capilar e se espalhe até a endocutícula; uma vez no córtex, o alisante reage com a queratina quebrando as ligações estruturais do cabelo<sup>10</sup>.

Os compostos usados com hidróxidos em elevadas concentrações possibilitam alisar os cabelos em um tempo muito curto, porém aumenta-se o risco de produzir danos à fibra do cabelo e devem ser manipulados com cuidado, pois podem ser irritantes para o couro cabeludo<sup>11,12,13</sup>. O objetivo deste trabalho foi estabelecer uma metodologia para determinar a basicidade em cremes alisantes à base de guanidina para atender a Legislação vigente que permite no máximo de 7,0% (p/p) expresso em hidróxido de cálcio<sup>14</sup>, e não se encontra na literatura referências para esta determinação em produtos alisantes a base de guanidina, os relatos encontrados são relacionados às dermatites causadas pelo uso de produtos alisantes.

## MATERIAIS E MÉTODOS

A amostra da matéria-prima utilizada de hidróxido de cálcio identificada com o n°. de lote k30273947 apresentou grau de pureza de 96,9%p/p.

Nas amostras brancas (sem princípio ativo) foi determinado o teor de hidróxido de cálcio utilizando os dois métodos: modificado no laboratório e o baseado no *Food Chemicals Codex* 4ª edição<sup>15</sup>.

### Método analítico modificado

O procedimento analítico utilizado para as análises das amostras foi modificado a partir do *Food Chemicals Codex* 4ª edição<sup>15</sup>, com o emprego de três amostras contendo hidróxido de cálcio nas concentrações de 3,0%, 6% e 8% p/p. Para cada concentração, pesou-se o equivalente a 0,1500g de hidróxido de cálcio. Foram efetuadas 8 replicatas para cada concentração. Cada tomada de ensaio foi transferida para um erlenmeyer contendo água deionizada e adicionou-se 3,0mL de ácido clorídrico a 10%V/V e, para melhor dissolução, colocou-se em agitador magnético com aquecimento a 70°C. Após resfriamento da amostra a temperatura ambiente, adicionou-se 30 mL de EDTA 0,0500mol/L, 15mL de hidróxido de sódio 1,0mol/L e 300mg de indicador azul hidroxinaftol, dando-se continuidade à titulação com EDTA 0,0500mol/L até ponto final (coloração azul persistente).

### Método *Food Chemicals Codex* 4ª edição<sup>15</sup>

Para comparar com o método adaptado em laboratório utilizou-se a metodologia do *Food Chemicals Codex* 4ª edição, na amostra de concentração 6,0% por ser a concentração mais próxima das encontradas no comércio que é em torno de 5,0% p/p de hidróxido de cálcio e ser a média das concentrações das amostras preparadas em laboratório. Procedeu-se pesando quantitativamente o equivalente a 0,1500g de hidróxido de cálcio na amostra de 6% p/p, transferiu-se para cápsula de porcelana, secou-se em chapa elétrica em temperatura baixa para evitar perda da amostra, em seguida queimou-se a amostra em bico de bunsen e levou-se para mufla a 800°C, por 24 horas

até transformação em cinzas. Em erlenmeyer, as cinzas foram diluídas em ácido clorídrico a 10% V/V, onde foram adicionadas água deionizada, 30mL de EDTA 0,0500mol/L e 15mL de hidróxido de sódio 1,0mol/L e 300mg de indicador azul hidroxinaftol, dando-se continuidade à titulação com EDTA 0,0500mol/L até ponto final (coloração azul persistente).

Nos dois métodos o cálculo foi efetuado considerando que cada mL de EDTA equivale a 3,705mg de hidróxido de cálcio.

Além dos métodos acima apresentados também se verificou o método da titulação por neutralização utilizando a amostra contendo 8,0% p/p escolhida aleatoriamente, titulando com HCl 1,0mol/L e fenolftaleína como indicador.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para avaliar a metodologia adaptada em laboratório foram selecionados alguns atributos da validação descritos para a categoria titulometria<sup>16,17</sup>.

Foi verificada a exatidão adicionando-se quantidades conhecidas do princípio ativo à amostra branca em três concentrações diferentes 3%,6% e 8%p/p além da amostra branca e padrão. As análises foram realizadas em 8 replicatas para as três concentrações, conforme Tabela 1. A reportagem dos resultados de exatidão se deu através da equação que se segue.

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{Concentração} \times 100\%}{\text{Concentração teórica}}$$

No teste de precisão foi avaliado o critério repetibilidade através da obtenção do desvio padrão e o coeficiente de variação

que não deve ser superior a 2% e foram calculados através do programa Excel da Microsoft<sup>®18</sup>.

Em relação ao atributo linearidade, não se percebem diferenças significativas entre os métodos. Todos apresentaram uma correlação linear entre concentrações obtidas e concentrações teóricas.

A validação é um dos principais instrumentos da garantia da qualidade e, com este intuito, este trabalho buscou validar uma metodologia simples que produza resultados satisfatórios, em um intervalo de tempo razoável.

De maneira geral, os dois métodos poderiam ser adotados para a quantificação do hidróxido de cálcio em amostras de produtos alisantes a base de guanidina; no entanto, o método descrito no *Food Chemicals Codex* 4ª edição, cujos resultados estão apresentados na Tabela 2, apresentou uma recuperação menor em relação ao método adaptado no laboratório.

O método com aquecimento a seco é mais demorado, pois a queima da amostra deve ser lenta, em razão da possibilidade de ocorrência de perdas por eventuais explosões devido à presença de óleo mineral na maioria das formulações comercializadas.

Além da comparação entre os dois métodos, também, foram efetuados testes na amostra de concentração 8% p/p, escolhida aleatoriamente, para a determinação do hidróxido de cálcio por titulometria de neutralização, utilizando solução de ácido clorídrico 1,0N e fenolftaleína como indicador. Os resultados demonstrados na Tabela 3 evidenciam que a recuperação média obtida de 88,1% foi inferior quando comparada aos outros dois métodos, que apresentaram 97,5% de recuperação, em média, resultado que atribuímos à presença de íons OH<sup>-</sup> adsorvidos na mistura do creme.

**Tabela 1.** Amostras dos produtos “alisante” em diferentes concentrações 3,0%, 6,0% e 8,0% (p/p) de hidróxido de cálcio e sua faixa de recuperação, após titulação com EDTA 0,0500 mol/L.

Amostra	Concentração 3% (p/p)		Concentração 6% (p/p)		Concentração 8% (p/p)	
	Concentração	Recuperação%	Concentração	Recuperação%	Concentração	Recuperação%
1	2,88	96,0	5,99	99,8	7,80	98,0
2	2,93	98,0	6,03	100,5	7,72	97,0
3	2,90	97,0	6,02	100,3	7,75	97,0
4	2,87	96,0	6,00	100,0	7,79	97,4
5	2,87	96,0	6,02	100,3	7,85	98,1
6	2,99	99,6	6,00	100,0	7,75	96,9
7	2,90	97,0	5,99	99,8	7,80	98,0
8	2,93	98,0	5,99	99,8	7,81	98,0
Média	2,90	97,2	6,01	100,1	7,78	97,6
DP	0,04		0,01		0,04	
CV(%)	1,57		0,26		0,53	

DP: desvio padrão; CV: coeficiente de variação.

**Tabela 2.** Recuperação de hidróxido de cálcio na concentração de 6,0%(p/p) em produtos alisantes obtido pelo método da titulação com EDTA 0,0500 mol/L e o método recomendado pelo Food Chemicals Codex<sup>14</sup>.

Amostra	Concentração 6,0% (p/p)	Recuperação %	Concentração Food Chemicals Codex.	
			6,0% (p/p)	Recuperação %
1	5,99	99,8	5,75	96,0
2	6,03	100,5	5,75	96,0
3	6,02	100,3	5,82	97,0
4	6,00	100,0	5,70	95,0
5	6,02	100,3	5,74	97,0
6	6,00	100,0	5,81	97,0
7	5,99	99,8	5,81	97,0
8	5,99	99,8	5,86	98,0
Média	6,01	100,1	5,78	96,6
DP	0,01		0,05	
CV(%)	0,26		0,91	

DP: desvio padrão; CV: coeficiente de variação.

**Tabela 3.** Recuperação de hidróxido de cálcio na concentração de 8,0% p/p em produtos alisantes obtido pela titulação direta utilizando HCl e fenolftaleína como indicador.

Amostra	Concentração 8 % p/p	Recuperação (%)
1	7,02	87,70
2	7,11	88,90
3	7,03	87,80
4	7,07	88,30
5	7,07	88,30
6	7,01	87,62
7	7,06	88,20
8	7,02	87,70
Média	7,05	88,10
DP	0,03	
CV (%)	0,49	

DP: desvio padrão; CV: coeficiente de variação.

## CONCLUSÃO

O método estabelecido na Seção de Cosméticos e Produtos de Higiene do Instituto Adolfo Lutz mostrou ser simples, rápido e preciso para determinação de hidróxido de cálcio em amostras de produtos alisantes a base de guanidina e será utilizado como rotina nesta Seção e fornecer subsídios junto a Vigilância Sanitária.

## REFERÊNCIAS

1. Callender VD, McMichael AJ, Cohen GF. Medical and surgical therapies for alopecias in black women. *Dermatol Ther*. 2004; 17 (2): 164-76.
2. Callender VD, Young CM. Cabelos étnicos e distúrbios do couro cabeludo. *Cosmet toilet* 2006; 18 (5): 56-9.

3. Leonardi GR, Matheus LGM, Kurebayashi AK. Cabelos. Leonardi GR, Matheus LGM, Kurebayashi AK, editores: *Cosmetologia Aplicada*. São Paulo: Ed Medfarma; 2004.p. 33-47.
4. Peyrefitte G, Martini MC, Chivot M. Biologia da pele. In: Peyrefitte G, Martini MC, Chivot M, editores: *Cosmetologia Biologia Geral Biologia da Pele*. São Paulo: Ed Organização Andrei Ltda; 1998. p.362-80.
5. Trueb RM. Aging of hair. *J Cosmet Dermat* 2005; (4): 60-72.
6. Prista LN, Bahia MFG, Vilar E. *Champôs*. Prista LN, Bahia MFG, Vilar E, Editores: *Dermofarmácia e cosmética*, Porto: Associação Nacional de Farmácias; 1995. p. 374-380.
7. Pavani LC, Joekes I. Estudo de degradação de cabelo por espectroscopia no infravermelho. *Aerosol cosmét* 1991; (72): 2-8.
8. Obukowho P, Birman M. Alisantes para cabelos: Avaliação da função, da química e da fabricação. *Cosmet toilet* 1996; (8): 44-9.
9. Dias TCS, Baby AR, Kaneko TM, Velasco MVR. Relaxing/Straightening of afro-ethnic hair: historical overview. *J Cosmet Dermat* 2007; 6(1): 1-5.
10. Oliveira V. Modificadores estruturais do cabelo. *Cosmet toilet* 2000, (12): 59-69.
11. Burmeister F, Bollatti D, Brooks G. Cabelos Etnicos: hidratação após alisamento. *Cosmet toilet* 1992, (4): 23-6.
12. Draelos, ZD. *Cosméticos Étnicos*. Draelos, ZD. Editor: In: *Cosméticos em dermatologia*. 2<sup>nd</sup> ed. Rio de Janeiro: Revinter Ltda. 1999; 210-7.
13. Paola MUVR, Ribeiro ME, BedinV, Bonzanini VV. Cabelos étnicos. *Cosmet toilet* 1999; (11): 36-44.
14. Brasil. Resolução RDC nº215 de 25 de jul de 2005 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Dispõe sobre a aprovação do regulamento técnico e 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*, Brasília, DF, 26 de jul 2005. Seção 1, p.06.
15. Chair SMT, Fletcher JP, Terry DL. *Food Chemicals Codex*. 4<sup>th</sup> ed., National Washington DC: Academic Press. 1996.p.61.
16. Instituto Nacional de Metrologia [INMETRO]. DOQ-CGCRE -008, de 2003: Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. São Paulo; 2003. 01-35.
17. Cass QB, Degani ALG. Desenvolvimento de métodos por HPLC: fundamentos, estratégias e validação. São Paulo: Universidade Federal São Carlos, 2001.
18. Causon R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis. *J Chromatogr B* 1997; (689): 175-80.

# Influência da qualidade das culturas de *Mycobacterium tuberculosis* nos resultados negativos dos testes da pirazinamidase

## Influence of *Mycobacterium tuberculosis* cultures quality conditions on negative results on pyrazinamidase testing

RIALA6/1126

Jonas Umeoka YAMAUCHI<sup>1</sup>, Marina Shinobu HAYASHI<sup>1</sup>, Suely Yoko Mizuka UEKI<sup>1</sup>, Carmen Maria Saraiva GIAMPAGLIA<sup>1</sup>, Rosângela Siqueira OLIVEIRA<sup>1</sup>, Fábio Oliveira LATRILHA<sup>1</sup>, Maria Alice da Silva TELLES<sup>1</sup>, Maria Conceição MARTINS<sup>1\*</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Instituto Adolfo Lutz, SP. Seção de Bacteriologia, Setor de Micobactérias. Av. Dr. Arnaldo, n° 351 9° andar, CEP01246-902, São Paulo/SP, e-mail: mcmartin@ial.sp.gov.br  
Recebido: 28/03/2007 – Aceito para publicação: 01/06/2007.

### RESUMO

A Organização Mundial da Saúde recomenda o uso do teste da pirazinamidase (PZAse) como método alternativo para determinação da resistência do *Mycobacterium tuberculosis* à pirazinamida, por ser um teste rápido e de fácil execução. Foram objetivos deste estudo: verificar a reprodutibilidade dos resultados negativos do teste da pirazinamidase quando realizado a partir das culturas originais e de seus subcultivos e relacioná-los com a qualidade das culturas originais e com os perfis de suscetibilidade à estreptomicina (S), isoniazida (I), rifampicina (R) e etambutol (E). Foram analisadas 115 culturas de *Mycobacterium tuberculosis* cujos cultivos originais apresentaram resultados negativos no teste da PZAse, o que representa resistência à pirazinamida. A qualidade das culturas foi avaliada, anotada e um segundo teste foi realizado a partir de subcultivos jovens e abundantes. A concordância entre os resultados do primeiro e do segundo teste foi de 72,2% e a qualidade das culturas mostrou correlação com os resultados ( $p < 0,001$ ). O teste da pirazinamidase é útil quando utilizado juntamente com técnicas de detecção de suscetibilidade às drogas S,I,R,E, desde que seja realizado a partir de cultivos com boa qualidade, que permitam a utilização de inóculo abundante.

**Palavras-chave.** *Mycobacterium tuberculosis*, pirazinamidase, resistência às drogas, qualidade da cultura.

### ABSTRACT

The pyrazinamidase is a fast and easy to perform assay, recommended by the World Health Organization as an alternative technique to determine pyrazinamide resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains. This study aimed to assess the reproducibility of negative results on pyrazinamidase assay using both primary cultures and respective subcultures, and to correlate them with original cultures quality, as well as their susceptibility profile to streptomycin (S), isoniazid (I), rifampin (R) and ethambutol (E). A total of 115 *Mycobacterium tuberculosis* cultures were analyzed, which the original growth produced negative results on pyrazinamidase assay, implying a resistance to pyrazinamide. The cultures quality was assessed and recorded; a second testing was performed using recent and abundant subcultures. Results from the first and the second tests demonstrated an agreement rate of 72.2%, and the cultures quality showed correlation with the results ( $p < 0.001$ ). Pyrazinamidase testing is useful when it is combined with other techniques for analyzing mycobacteria susceptibility to S, I, R, E since it is performed with high quality cultures which allow the use of abundant inocula.

**Key words.** *Mycobacterium tuberculosis*, pyrazinamidase, drug resistance, culture quality.

## INTRODUÇÃO

Na fase inicial do regime de tratamento da tuberculose, a isoniazida e a rifampicina têm como função a eliminação rápida de bacilos ativos e a pirazinamida a destruição dos bacilos semidormentes situados no interior dos macrófagos. Como são poucas as drogas eficientes, disponíveis para o tratamento da tuberculose, o surgimento de resistência a uma dessas drogas pode representar o desenvolvimento de doença potencialmente sem tratamento. A multidroga resistência (MDR), que é a resistência simultânea do *M. tuberculosis* à isoniazida e rifampicina, é preocupante, pois essas duas drogas representam a mais potente combinação contra o bacilo da tuberculose.

A detecção bacteriológica da resistência às drogas, além de permitir o monitoramento dos pacientes com tuberculose, é uma das ferramentas de avaliação do Programa de Controle da Tuberculose.

O monitoramento da resistência à pirazinamida, feito simultaneamente às demais drogas, requer um procedimento mais complexo. No Brasil, o método amplamente utilizado para detecção dessa resistência é o das proporções, que além de exigir a acidificação do meio Löwenstein-Jensen para promover a atividade da pirazinamida, tem sua eficácia limitada pelo longo tempo de crescimento do *Mycobacterium tuberculosis*, que é de aproximadamente 30 dias<sup>1</sup>.

Em 1986 a Organização Mundial da Saúde-OMS<sup>2</sup> indicou a detecção da enzima pirazinamidase (PZase) como método alternativo ao das proporções, por ser mais simples e rápido.

As cepas de *M. tuberculosis* suscetíveis à pirazinamida apresentam atividade da pirazinamidase (PZase), enzima que converte a pirazinamida em ácido pirazinóico (POA) que é bactericida para essa espécie. A pirazinamidase é codificada pelo gene *pncA* e diversos estudos têm demonstrado que a mutação desse gene leva à ausência de atividade da enzima e, conseqüentemente, resistência à pirazinamida<sup>3,4,5,6,7,8</sup>.

Shikama et al<sup>9</sup>, em estudo piloto para implantação da técnica da PZase em Sorocaba/São Paulo, demonstraram sensibilidade de 96,4% e especificidade de 87,9% ao compararem os resultados obtidos com esta técnica e com o método das proporções. Os autores relataram que a técnica é de fácil execução e que possibilita o fornecimento do resultado após quatro dias de incubação. No entanto, deve-se ter o cuidado de utilizar inóculo bacilar abundante, proveniente de cultivos em fase exponencial de crescimento<sup>2,9</sup>, para evitar resultados falso-negativos no teste da PZase que indicariam resistência à pirazinamida.

Há estudos demonstrando a associação estatística entre a qualidade das culturas de *M. tuberculosis* e os resultados dos testes de identificação e de suscetibilidade às drogas<sup>8,10</sup>. Zhang et al<sup>8</sup> relataram diferenças de resultados dos testes da resistência à PZA efetuados com subcultivos de uma mesma cultura, em dois momentos diferentes, após duas *semanas de crescimento* e após dois meses de crescimento. Martins et al.<sup>10</sup> verificaram que a qualidade inadequada de cultivos, seja por utilização de meios de cultura com validade

expirada ou por incubação prolongada, interfere nos resultados dos testes de suscetibilidade às drogas.

O Setor de Micobactérias do Instituto Adolfo Lutz recebe culturas de micobactérias dos laboratórios de Saúde Pública do estado de São Paulo, para a realização dos testes de identificação das espécies e de suscetibilidade às drogas. Para agilizar a liberação dos resultados, os testes são realizados a partir das culturas originais (independentemente da qualidade da mesma), desde que contenham massa bacilar suficiente e que não apresentem contaminação por outros microrganismos.

Foram objetivos deste estudo: verificar a reprodutibilidade dos resultados do método da PZase, quando realizado a partir das culturas originais e de seus subcultivos, e relacioná-los com a qualidade das culturas originais e com os perfis de suscetibilidade à estreptomicina (S), isoniazida (I), rifampicina (R) e etambutol (E).

## MATERIAL E MÉTODOS

Entre janeiro de 2003 e dezembro de 2004, cepas de *M. tuberculosis* recebidas pelo Setor de Micobactérias do Instituto Adolfo Lutz foram submetidas ao teste de suscetibilidade à pirazinamida, pela detecção da atividade da enzima pirazinamidase<sup>2,11</sup>. O teste da pirazinamidase é realizado em meio de ágar adicionado de caldo Dubos, piruvato de sódio e pirazinamida distribuído, na quantidade de 5ml, em tubos com tampa de rosca (16X125mm) e solidificado na posição vertical. Após quatro dias da inoculação de massa bacilar abundante e incubação a 37°C pode-se evidenciar, pela revelação com solução de sulfato de ferro amoniacal, a presença de ácido pirazinóico na forma de um anel rosa na superfície do meio. A presença do ácido pirazinóico indica que o bacilo foi capaz de hidrolizar a pirazinamida e portanto, é suscetível a essa droga.

Nesse período, todas as culturas originais que apresentaram resultados negativos no teste da pirazinamidase (indicação de resistência à pirazinamida) foram subcultivadas em meio de Löwenstein-Jensen, para repetição do teste. De cada uma dessas culturas foram anotados o resultado do teste de suscetibilidade às drogas S,I,R,E e a avaliação da qualidade da cultura efetuada na data de recebimento, levando em conta os aspectos microscópicos e macroscópicos do crescimento em frascos padronizados quanto ao tamanho e quantidade de meio de cultura. O crescimento e o meio de cultura foram avaliados de acordo com o proposto por Martins et al<sup>10</sup> como segue: Boa = crescimento adequado, em frasco com capacidade para 30ml com 15ml de meio ou em tubo de 16 ou 18X180mm com 6-8ml de meio de qualidade adequada; Regular = crescimento adequado em frascos com meios adequados, mas com quantidade de meio menor que a recomendada; Inadequada = crescimento insuficiente, em meio ácido ou alcalino, ou seco, ou em frascos com presença de água de condensação ou de outros microrganismos.

Todos os resultados foram armazenados em um banco de dados no Epi-info 6, para análise posterior.

## RESULTADOS

Foram incluídas no estudo 115 culturas de *M. tuberculosis*, recebidas dos laboratórios de Saúde Pública do Estado de São Paulo, que apresentaram resultado negativo no teste da pirazinamidase.

Na avaliação da qualidade, essas culturas foram classificadas como: Boa = 32 (27,8%), Regular = 43 (37,4%) e Inadequada = 40 (34,8%). No segundo teste da pirazinamidase, efetuado com o

crescimento obtido no subcultivo, 83 (72,2%) confirmaram o primeiro resultado e 32 (27,8%) discordaram por apresentarem atividade da enzima.

A avaliação da qualidade das culturas originais e a correlação com o resultado da pirazinamidase, estão demonstradas na Tabela 1.

Da Tabela 2, constam o perfil de suscetibilidade às drogas S, I, R, E e os resultados do primeiro e do segundo teste da pirazinamidase.

**Tabela 1.** Qualidade das culturas originais e resultados de dois testes da pirazinamidase realizados com as culturas originais e com seus subcultivos.

Qualidade da cultura original	Pirazinamidase				Total N°
	Testes concordantes: 1° (-) 2° (-)		Testes discordantes: 1° (-) 2° (+)		
	N°	%	N°	%	
Boa	26	81,2	6	18,8	32
Regular	36	83,7	7	16,3	43
Inadequada	21	52,5	19	47,5	40
Total	83	72,2	32	27,8	115

Boa= crescimento adequado, em frasco com capacidade para 30ml com 15 ml de meio ou em tubo de 16 ou 18X180mm com 6-8ml de meio de qualidade adequada, Regular= crescimento adequado em frasco e meios adequados, com quantidade de meio menor que a recomendada, Inadequada= crescimento insuficiente, em meio ácido ou alcalino ou seco ou em frascos com presença de água de condensação ou contaminantes.

(-) = resultado negativo (ausência de pirazinamidase-pirazinamida resistente)

(+) = resultado positivo (presença de pirazinamidase-pirazinamida sensível)

N° = número, %= porcentagem

**Tabela 2.** Perfil de suscetibilidade às drogas S, I, R, E e resultados de dois testes da pirazinamidase realizados com as culturas originais e com seus subcultivos.

Perfil de suscetibilidade às drogas S,I,R,E		Pirazinamidase				Total N°	
		Testes concordantes:		Testes discordantes:			
		1° (-)	2° (-)	1° (-)	2°(+)		
		N°	%	N°	%		
Suscetíveis	MDR		4	16,0	21	84,0	25
		IR	36	92,3	3	7,7	39
		IRE	15	83,3	3	16,7	18
		SIR	10	100,0	0	0,0	10
		SIRE	13	92,8	1	7,2	14
Outras resistências		5	55,6	4	44,4	91	
Total		83	72,2	32	27,8	15	

N° = número, %= porcentagem

(-) = resultado negativo (ausência de pirazinamidase-pirazinamida resistente)

(+) = resultado positivo (presença de pirazinamidase-pirazinamida sensível)

S = estreptomicina, I=isoniazida,, R= rifampicina, E= etambutol

MDR = multidroga resistência (resistência simultânea a pelo menos isoniazida e rifampicina.)

## DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

A concordância dos resultados do primeiro teste feito com a cultura original e do segundo feito com o subcultivo foi de 72,2%, o que demonstra boa reprodutibilidade da técnica.

Na Tabela 1 observa-se que a porcentagem de discordância entre os resultados dos dois testes foi de 47,5% quando as culturas originais foram classificadas como inadequadas. Nesse caso, a atividade da enzima só foi evidenciada por ocasião do segundo teste, feito com o subcultivo de boa qualidade.

Neste estudo observou-se correlação entre a qualidade das culturas e os resultados dos testes de pirazinamidase ( $p < 0,001$ ) confirmando as observações de estudos anteriores sobre a influência da qualidade de culturas originais nos testes de suscetibilidade às drogas<sup>8,10</sup>.

A análise dos resultados dos testes de pirazinamidase comparados com o perfil de suscetibilidade às drogas (S,I,R,E), apresentados na Tabela 2, mostrou que a maioria (84%) dos resultados discordantes ocorreu com as cepas suscetíveis às drogas. Entre as cepas MDR ou com outro tipo de resistência, a concordância dos resultados dos dois testes foi alta (87,8%). Essas observações alertam para o fato de que as cepas submetidas ao teste de suscetibilidade às drogas, que se revelem resistentes apenas à pirazinamida (sem atividade da pirazinamidase), devem ser subcultivadas e ter o teste repetido para confirmação dessa resistência.

Esta técnica, rápida e de fácil execução, possibilita a obtenção dos resultados no curto prazo de quatro dias de incubação sendo um bom método alternativo aos convencionais que, além de necessitarem meios com pH ácido para ação da pirazinamida, necessitam de um período de incubação mais longo.

Concluimos que a técnica é útil para uso conjunto com os métodos de detecção de suscetibilidade às drogas S, I, R, E mas, sugerimos que os resultados de resistência à PZA sejam confirmados com a repetição do teste feito a partir de inóculos abundantes provenientes de cultivos jovens.

## REFERÊNCIAS

1. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Centro de Referência Professor Hélio Fraga. Manual de Bacteriologia da Tuberculose. 3ª ed. Edição comemorativa. Rio de Janeiro. 2005. 240p
2. OPAS-OMS. Manual de normas y procedimientos tecnicos para la bacteriologia de la tuberculosis. Parte III. Sensibilidad del *Mycobacterium tuberculosis* a las drogas. La identificación de micobactérias. Nota técnica 28. Buenos aires, Argentina: Centro Panamericano de Zoonosis, 1986.
3. Aono A, Hirano K, Hamasaki S, Abe C. Evaluation of BACTEC MGIT 960 PZA medium for susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide (PZA): compared with the results of pyrazinamidase assay and Kyokuto PZA test. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002; 347-52.
4. Cheng SJ, Thibert L, Sanchez T, Heifets L, Zhang Y. *pncA* Mutations as a Major Mechanism of Pyrazinamide Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Spread of a Monoresistant Strain in Quebec, Canada. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44(3): 528-32.
5. Miyagi C, Yamane N, Yogesh B, Ano H, Takashima T. Genetic and phenotypic characterization of pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates in Japan. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004; 48:111-6.
6. Rodrigues VFS, Telles MA, Ribeiro MO, Cafrune PI, Rossetti MLS, Zaha A. Characterization of *pncA* Mutation in Pyrazinamide-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Brasil. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49(1): 444-6.
7. Scorpio A, Lindholm-Levy P, Heifets L, Gilman R, Siddiqi S, Cynamon M, Zhang Y. Characterization of *pncA* Mutations in Pyrazinamide-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41(3): 540-3.
8. Zhang Y, Permar S, Sun Z. Conditions that may affect the results of susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide. *J Med Microbiol* 2002; 51:42-9.
9. Shikama ML, Farrapo ACX, Nogueira CF, Silva RFM, Sousa MS, Pini MIT, Amorim ABR, Errera MC, Sato DN. Avaliação preliminar da suscetibilidade do *Mycobacterium tuberculosis* à pirazinamida pela detecção da pirazinamidase. *Bol Inst Adolfo Lutz*. 2002; 12(2): 11.
10. Martins MC, Ueki SYM, Giampaglia CMS, Credidio RA, Butuem IV, Ferrazoli L. Impacto da qualidade das culturas de micobactérias no resultado dos testes de identificação das espécies e de suscetibilidade às drogas. *News Lab* 2003; 58:70-8.
11. Collins CH, Grange JM, Yates MD. *Tuberculosis Bacteriology: Organization and Practice*, London: Butterworth Heinemann 2<sup>nd</sup> ed. 1997. 139p.

# Avaliação do diagnóstico da leishmaniose visceral canina com a utilização de teste rápido com antígeno recombinante K39 em regiões endêmicas do estado de São Paulo.

Assessment of canine visceral leishmaniasis diagnosis by means of a rapid test using recombinant antigen K39 in endemic regions of São Paulo state, Brazil.

RIALA6/1127

Márcia C BISUGO<sup>1\*</sup>, Maria de Fátima L ARAÚJO<sup>1</sup>, Helena H TANIGUCHI<sup>1</sup>, Elaine ACUNHA<sup>1</sup>, Andréa A SANTOS<sup>1</sup>, Mário SPESSOTO JUNIOR<sup>2</sup>, Carlos N KANETO<sup>3</sup>, Cristiane VO CAMARGO<sup>2</sup>, Milson A POLIZEL<sup>4</sup>, Marco AN VIGILATO<sup>5</sup>, Cláudia MS NEGREIROS<sup>6</sup>, Mashami OKAGIMA<sup>7</sup>, Nilton M GONÇALVES<sup>8</sup>, Larissa P LUNDSTEDT<sup>9</sup>, Andréa M ANDRADE<sup>10</sup>, Valéria MF LIMA<sup>3</sup>, J Eduardo TOLEZANO<sup>1</sup>.

\*Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Instituto Adolfo Lutz, Seção de Parasitoses Sistêmicas, Av. Dr. Arnaldo, 355 São Paulo/SP, CEP 01246-902, e-mail: mdcbisugo@hotmail.com.; <sup>2</sup> Instituto Adolfo Lutz- Laboratório Regional de Araçatuba, SP; <sup>3</sup>Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus de Araçatuba, SP; <sup>4</sup>Secretaria Municipal de Buritama, SP; <sup>5</sup>Secretaria Municipal de Saúde de Birigui, SP; <sup>6</sup>Secretaria Municipal de Promissão, SP; <sup>7</sup>Secretaria Municipal de Saúde de Pereira Barreto, SP; <sup>8</sup>Secretaria Municipal de Mirandópolis, SP; <sup>9</sup>Secretaria Municipal de Penápolis, SP; <sup>10</sup>Secretaria Municipal de Araçatuba, SP; Recebido: 25/04/2007 – Aceito para publicação: 30/08/2007

## RESUMO

Em inquéritos caninos, realizados em municípios paulistas com autoctonia de leishmaniose visceral americana (LVA), o desempenho do teste rápido imunocromatográfico (formato “dipstick”) empregando antígeno recombinante K39 (rK39) foi realizado em amostras de sangue total e soro de cães. Este teste foi comparado com a técnica de RIFI e com ELISA as quais foram realizadas em amostras de soro. As amostras foram colhidas de 1.333 cães, sendo 1199 selecionados por sorteio em municípios com transmissão de LVA. O grupo controle foi constituído de amostras de 134 cães portadores de outras patologias ou residentes em áreas indenes para LVA, para avaliar a especificidade do teste rápido anti-rK39. Nos cães selecionados por sorteio, a positividade do teste rápido anti-rK39 foi de 31,3% nas amostras de soro e de 17,4% no sangue total; a RIFI e o ELISA detectaram anticorpos anti-*Leishmania* em 25,1% e 27,2% das amostras, respectivamente. Todas amostras do grupo controle apresentaram resultados negativos no teste rápido. O teste rápido realizado em amostras de soro apresenta-se como ensaio simples, rápido, de baixo custo e, portanto, adequado para ser empregado como técnica alternativa de triagem diagnóstica em função de sua especificidade para as espécies do complexo *Leishmania donovani*, responsáveis pela leishmaniose visceral.

**Palavras-chave.** Leishmaniose Visceral, proteínas recombinantes/imunologia, técnicas imunológicas, *Leishmania chagasi*.

## ABSTRACT

Canine visceral leishmaniasis (CVL) coexists with human visceral leishmaniasis (HVL) in Brazil. Dogs play an important role as reservoir of etiological agent, and for CVL dissemination. For diagnosing CVL, IFA and ELISA have been routinely employed. These assays have not been suitable for diagnosis studies owing to low sensitivity and/or specificity. The CVL diagnosis in different regions of São Paulo was assessed, comparing the performance of a immunochromatographic dipstick – based rapid test using K39 recombinant antigen (rK39RT) on whole blood and serum samples, and with IFI and ELISA on serum samples. The 1,333 samples dogs were tested including 1,199 samples from randomly selected dogs from eight municipalities with CVL transmission. The control group was comprised by samples

from 134 animals living VL-free area or from dogs with other diseases. Of 1,199 samples, 31.3% were positive by rK39RT on sera, and 17.4% on whole blood. Anti-*Leishmania* antibodies were detected in 25.1% and 27.2% of samples on IFA and ELISA, respectively. rK39RT revealed a low performance on whole blood, however on dog serum higher number of positive samples were detected. All samples from 47 dogs with other diseases were negative on rK39RT. The rK39RT is a simple, rapid, inexpensive, specific and sensitive, and suitable as an alternative screening testing.

**Key words.** Visceral leishmaniasis, recombinant protein/immunology, immunological techniques, *Leishmania chagasi*.

## INTRODUÇÃO

As leishmanioses são zoonoses causadas por diversas espécies de protozoários do gênero *Leishmania*<sup>1</sup>, que podem afetar o homem. Animais silvestres e domésticos são os reservatórios mais comuns do parasita, que têm como vetores, insetos dípteros, da família Psychodidae, sub-família Phlebotominae.

A leishmaniose visceral (LV) apresenta ampla distribuição no Velho e no Novo Mundo, situando-se entre as sete endemias prioritárias de atenção da Organização Mundial da Saúde; afeta 500 mil pessoas por ano e, aproximadamente, 90% de todos os casos notificados no mundo provêm de Bangladesh, Brasil, Índia, Nepal e Sudão<sup>2</sup>. No Novo Mundo a doença é conhecida como calazar neotropical ou leishmaniose visceral americana (LVA).

A LVA tem como agente etiológico a *Leishmania (Leishmania) chagasi*, e em praticamente todas as áreas de ocorrência da doença, *Lutzomyia longipalpis*<sup>3</sup> é identificado como espécie vetora<sup>4</sup>.

A doença é restrita ao Novo Mundo e ocorre em 11 países: Brasil, Venezuela, Guiana Francesa, Suriname, Panamá, México, Belize, Guatemala, Paraguai, Bolívia, Colômbia.

De um padrão de epidemia tipicamente rural, vem assumindo perfis epidemiológicos distintos, sendo apontada como uma doença emergente, atingindo com maior frequência e intensidade, áreas urbanas e suburbanas de várias capitais e cidades de médio porte do país<sup>5,6,7</sup>.

No Brasil, a transmissão autóctone de LVA está registrada em 20 dos 27 estados em aproximadamente 1.600 municípios. Até meados da década de 1990 cerca de 90% dos casos humanos ocorriam na região nordeste<sup>8</sup>. A partir de então, as outras regiões geográficas mostraram significativo aumento do número de novos casos anuais. Assim, no ano de 1993, enquanto a região nordeste foi responsável por 93,7% da LVA notificados no país, 3,3% foram da região norte, 0,7% do centro-oeste e 2,3% da região sudeste. Com a expansão da transmissão para diferentes áreas do território brasileiro, em 2004, de um total de 3267 notificações, 53,2% procediam do nordeste, 16,1% do norte, 8,0% do centro-oeste e 22,6% do sudeste do Brasil<sup>9</sup>.

As ações do Programa de Controle da Leishmaniose Visceral no Brasil visam os três elementos da cadeia de transmissão: o vetor, o reservatório principal (o cão doméstico) e o homem doente<sup>10,11</sup>.

O cão doméstico é a principal fonte de infecção de *Leishmania*, pode apresentar alto parasitismo cutâneo o que facilita a infecção dos flebotomíneos<sup>12,13</sup>, exercendo papel fundamental na introdução da doença em áreas novas<sup>6,14</sup>. Diante de sua importância no ciclo de transmissão da LVA, a principal medida de controle, no Brasil, tem sido sua eliminação quando identificado como infectado e/ou soropositivo<sup>2,15</sup>.

No Brasil a LV canina coexiste com a LV humana em todos os focos conhecidos e ela precede a ocorrência de casos humanos<sup>16,17,18</sup>.

Os cães infectados e/ou com títulos de anticorpos específicos podem não apresentar sintomas da doença, mas o parasitismo de vísceras e de pele pode ser intenso, tornando-os bons reservatórios mesmo em fase precoce da infecção<sup>11</sup>.

Na LV canina, a detecção do parasita pode ser feita no baço, fígado, medula óssea, linfonodo e pele aparentemente sadia, já que os parasitas podem ser facilmente encontrados nas células do sistema fagocítico mononuclear (SFM), porém a sensibilidade pode variar de acordo com a condição clínica, densidade parasitária, material biológico, técnica diagnóstica e qualidade da coleta<sup>18</sup>.

As técnicas moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), têm sido descritas como sensíveis para a detecção de *Leishmania*, porém não tem aplicação na rotina diagnóstica ou em larga escala.

Na impossibilidade de realizar provas para detecção do parasita nos inquéritos epidemiológicos recomenda-se a utilização de métodos de detecção de anticorpos específicos, empregando-se métodos sorológicos, entretanto, em situações de gravidade da LV canina, Ashford et al.<sup>19</sup> descreveram a ausência de anticorpos. A experiência clínica em países onde a doença é endêmica, também evidenciou que muitos animais infectados podem permanecer soronegativos<sup>20</sup>.

Diversas técnicas têm sido avaliadas ou utilizadas na detecção de anticorpos no diagnóstico do calazar canino: imunoenzimáticas<sup>21,22,23,24</sup>, testes de aglutinação direta (DAT)<sup>25</sup> e testes imunocromatográficos e imunoenzimáticos que utilizam como antígenos, proteínas recombinantes derivadas de leishmanias, como a K39<sup>26,27,28,29</sup>.

Contudo, a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e o ensaio imunoenzimático (ELISA) continuam sendo as provas sorológicas mais utilizadas. Ambas são consideradas limitadas quanto à especificidade e reprodutibilidade: devido apresentarem reatividade cruzada com outras patologias como

a leishmaniose tegumentar americana (LTA) e doença de Chagas; por utilizarem parasitas íntegros ou solúveis como antígeno que limitam a padronização dos testes sorológicos; impossibilitando o diagnóstico da infecção durante o período de soroconversão e em cães infectados em que não esteja estimulada a produção de anticorpos específicos. Outrossim, os resultados da RIFI são influenciados pela subjetividade na leitura das reações<sup>30,31,32</sup>.

Em decorrência da dificuldade em implementar ações contra os vetores para o controle da LVA no Brasil, os Programas de Controle priorizam a eliminação de fontes de infecção, após a realização de inquéritos sorológicos em populações caninas em áreas com transmissão da infecção. O diagnóstico é realizado em amostras de soro ou em eluatos de sangue colhidos em papel de filtro, utilizando-se “Kits” de RIFI e ELISA fornecidos pelo Ministério da Saúde. Todos os cães soropositivos devem ser apreendidos e eutanasiados<sup>33,34</sup>.

A superposição de áreas de ocorrência da LVA com LTA e doença de Chagas; o intervalo de tempo longo entre a coleta de material e o retorno dos resultados dos exames laboratoriais para os municípios com transmissão; a presença de cães que não soroconverteram na ocasião dos inquéritos soroepidemiológicos e os dados subestimados ou superestimados da prevalência e incidência da LV canina, interferem nos programas de vigilância, no conhecimento do risco da transmissão de *Leishmania* à populações humanas e caninas e no tempo de permanência dos cães infectados em áreas endêmicas.

Em 1997, pela primeira vez foi detectada a presença de *L. longipalpis* em área urbana do município de Araçatuba, na região noroeste do Estado de São Paulo e, em 1998 foram encontrados cães com quadro clínico e confirmação parasitológica de leishmaniose visceral, sendo posteriormente identificada a circulação de *L. (L.) chagasi*. Em 1999 foi relatado o primeiro caso humano autóctone no Estado de São Paulo<sup>34</sup>.

Em São Paulo, a RIFI é utilizada nas investigações de foco e para a confirmação das amostras reagentes pelo ELISA. O ELISA é utilizado ainda para a triagem de amostras para identificação de resultados negativos em inquéritos caninos amostrais. Os “kits” utilizados para a realização destes testes pelos Laboratórios de Saúde Pública são fornecidos pelo Ministério da Saúde, os quais são produzidos pelo Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio-Manguinhos da Fundação Oswaldo Cruz<sup>34</sup>.

Neste contexto, face às limitações apontadas para a RIFI e o ELISA como testes padrão para o diagnóstico da LV canina, faz-se necessário o desenvolvimento ou padronização de novas técnicas com níveis adequados de sensibilidade e especificidade, de fácil execução e interpretação em campo e/ou em laboratório, eficiência elevada e que possibilitem a redução do custo operacional do diagnóstico da infecção na realização de inquéritos caninos.

Para Badaró et al.<sup>35</sup>, o melhor caminho para melhorar a especificidade dos testes sorológicos é o uso de antígenos específicos. Os antígenos recombinantes, espécie-específicos, como o K39 e K26 são utilizados em ensaios imunoenzimáticos e em testes imunocromatográficos rápidos (dipsticks) no diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral em campo e em laboratório na África e Índia<sup>29,36</sup>.

O antígeno K39 é uma proteína recombinante, de peso molecular de 39kDa, localizada no DNA do cinetoplasto de *Leishmania*, constituinte de uma proteína de 230 kDa da família Kinesina. A proteína rK39 apresenta seqüência idêntica em sete espécies de *Leishmania*. A conservação de uma seqüência de 39 aminoácidos repetitivos confere a esta proteína epitopos de alta densidade e identidade específica com as espécies *L. donovani*, *L. infantum* e *L. chagasi*. A reatividade com outros tripanossomatídeos mostrou-se negativa e a presença de anticorpos anti-rK39 indicaria a infecção ativa. O ELISA com o emprego do antígeno rK39, apresentou 100% de especificidade e 98% de sensibilidade na detecção de anticorpos específicos no calazar na África e na LVA<sup>29,35,37,38</sup>.

Há poucos estudos que relatam o uso do teste imunocromatográfico rápido anti-rK39 no diagnóstico da LV canina em inquéritos caninos. Genaro et al.<sup>27</sup>, França-Silva<sup>42</sup> e Rocha<sup>44</sup> referiram sensibilidade e especificidade variáveis do teste rápido em estudos realizados em áreas endêmicas para LVA em Minas Gerais, Brasil.

No presente estudo, pretendeu-se avaliar o diagnóstico da LV canina em condições similares ao Programa de Vigilância e Controle da LVA do Estado de São Paulo, utilizando o teste rápido anti-rK39 realizado com sangue total, em condições de campo e com soro, em laboratório em inquéritos amostrais aleatórios realizados em municípios com transmissão de LVA no Estado de São Paulo; comparar o desempenho desse teste imunocromatográfico com os métodos RIFI e ELISA e; discutir a relevância e a viabilidade de seu emprego nos Programas de Controle.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Regiões e cães incluídos no estudo

A presença de anticorpos anti-*Leishmania* foi pesquisada em amostras de sangue de 1333 cães, sendo 1199 amostras colhidas aleatoriamente por sorteio em municípios com transmissão autóctone de LVA da região noroeste do Estado de São Paulo. Os demais 134 animais compuseram grupos controle para a avaliação da especificidade do teste rápido dos quais 47 cães de município autóctone para leishmaniose tegumentar americana (LTA) e sem registro de transmissão da LVA, porém com registro da presença de *L. longipalpis*; 40 cães de município autóctone para LTA, mas sem registros de transmissão da LVA e da presença do vetor e; 47 cães portadores de outras patologias (erliquiose, babesiose, dirofilariose, toxoplasmose e LTA) (Quadro 1).

**Quadro 1.** Distribuição dos cães cujas amostras foram analisadas por meio do teste rápido para pesquisa de anticorpos anti-rK39 para o diagnóstico da LV canina.

MUNICÍPIO	N <sup>o</sup> DE CÃES EXAMINADOS	POPULAÇÃO CANINA ESTIMADA EM 2002 (*)	% DE ANIMAIS EXAMINADOS
<b>CÃES ESCOLHIDOS POR SORTEIO EM MUNICÍPIOS COM AUTOCTONIA DE LVA E REGISTRO DA PRESENÇA DE <i>L. longipalpis</i></b>			
Araçatuba	451	28.000	1,61
Guararapes	100	9.000	1,11
Mirandópolis	99	6.000	1,65
Pereira Barreto	99	5.000	1,98
Penápolis	100	8.000	1,25
Birigui	150	14.000	1,07
Promissão	100	8.000	1,25
Buritama	100	3.000	3,33
<b>SUB-TOTAL</b>	<b>1199</b>	<b>81000</b>	<b>1,48</b>
MUNICÍPIO	N <sup>o</sup> DE CÃES		
<b>CÃES DOMICILIADOS EM MUNICÍPIOS AUTÓCTONES PARA LTA SEM TRANSMISSÃO DE LVA</b>			
Itupeva (com registro da presença de <i>L. longipalpis</i> )	47		
Caraguatatuba e Ubatuba (sem registro da presença de <i>L. longipalpis</i> )	40		
<b>CÃES PORTADORES DE OUTRAS PATOLOGIAS - babesiose, erliquiose, dirofilariose, toxoplasmose e LTA por <i>Leishmania (V.) braziliensis</i></b>			
47			
<b>TOTAL GERAL</b>	<b>1333</b>		

(\*) Informações fornecidas pelos Centros de Zoonoses Municipais.

LVA: Leishmaniose visceral americana. LTA: Leishmaniose tegumentar americana.

### Amostras de sangue

As amostras de sangue foram obtidas por punção da veia cefálica dos cães, em tubos secos sem anticoagulante. Em condições de campo, de cada amostra foi retirada uma alíquota de sangue total (20-30 µl) que foi utilizada no teste rápido anti-rK39 e o restante do material foi transportado até o laboratório para a realização do teste rápido anti-rK39, RIFI e ELISA no soro dos animais.

### Teste rápido anti-rK39

Foi utilizado o “Kit” de reagentes Kalazar Detect™ Rapid Test - InBios Inc-Seattle, WA-USA para a detecção de anticorpos para leishmaniose visceral nas amostras. A reação foi realizada segundo as instruções do fabricante. A reação final ocorre entre 1 – 10 minutos e a leitura é realizada após este período.

O teste rápido anti-rK39 com sangue total foi realizado nas 1199 amostras dos cães dos municípios autóctones para LVA e nas amostras de cães domiciliados em municípios autóctones para LTA (87); o teste rápido anti-rK39 com soro foi realizado em 1190 amostras dos cães dos municípios autóctones para LVA e nas 47 amostras dos cães portadores de outras patologias.

### RIFI

Foi utilizado o “Kit” de reagentes IFI – Leishmaniose visceral canina produzido pelo Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio-Manguinhos da Fundação Oswaldo Cruz, que utiliza como antígeno, formas promastigotas íntegras de *Leishmania*. A pesquisa de anticorpos foi realizada nas 1179 amostras de soro de cães escolhidos por sorteio em municípios

autóctones para LVA. Os soros com título 1:40 foram considerados reagentes.

### ELISA

Foi utilizado o “Kit” de reagentes EIE - Leishmaniose visceral canina, produzido pelo Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos BioManguinhos da Fundação Oswaldo Cruz, que utiliza antígeno solúvel purificado de formas promastigotas de *Leishmania*, para a pesquisa de anticorpos em 997 amostras de soro dos cães escolhidos por sorteio em municípios autóctones para LVA. Os soros com títulos 1:100 foram considerados positivos.

### Aspectos éticos

As coletas das amostras dos animais foram realizadas por técnicos especializados que empregaram material laboratorial apropriado e descartável, respeitando-se os princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), bem como solicitado o Termo de Consentimento livre e esclarecido dos responsáveis pelos animais. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz – CEPIAL em 9 de janeiro de 2006.

## RESULTADOS

O teste rápido anti-rK39 apresentou intensidade de reatividade positiva variável podendo ser forte ou fraco.

O teste rápido anti-rK39 foi sempre negativo nas amostras de cães domiciliados nos municípios autóctones para LTA e em cães portadores de outras patologias.

Ao final do estudo observou-se que o nível de positividade para anticorpos anti-Leishmania nos cães escolhidos por sorteio e domiciliados em regiões com transmissão de LVA variou em função do tipo de amostra, da técnica diagnóstica utilizada e também do município (Tabela 1).

O teste rápido realizado com soro detectou anticorpos para Leishmania em 31,3% do total das amostras processadas. Pelo ELISA, o percentual foi 27,2% e pela RIFI, 25,1%.

Em condições de campo, o teste rápido realizado com sangue total não demonstrou boa performance em detectar anticorpos anti-Leishmania em comparação ao teste rápido realizado em laboratório, com soro sanguíneo, à RIFI e ELISA. O percentual de positividade desse teste foi de apenas 17,4%, 44,4% menor do que os 31,3% verificados no teste rápido realizado no soro sanguíneo (Tabela 1).

A soropositividade canina variou de 3% a 38% entre os oito municípios com transmissão de LVA, tanto em função do tipo de teste diagnóstico como da amostra utilizados.

Em alguns municípios foram observados resultados com alto grau de discordância entre as metodologias e/ou técnicas diagnósticas utilizadas, tendo como referência, as proporções observadas nos resultados totais obtidos na pesquisa de anticorpos anti-Leishmania (Tabela 1).

**Tabela 1.** Resultados obtidos nos testes diagnósticos utilizados na pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania* realizados nas amostras dos cães selecionados por sorteio domiciliados em municípios do estado de São Paulo com transmissão de LVA.

MUNICÍPIO	TESTE RÁPIDO ANTI-rK39 - SANGUE TOTAL		TESTE RÁPIDO ANTI-rK39 SORO			RIFI SORO			ELISA SORO		
	POSITIVO (%)	NEGATIVO (%)	POSITIVO (%)	NEGATIVO (%)	NÃO REALIZADO	POSITIVO (%)	NEGATIVO (%)	NÃO REALIZADO	POSITIVO (%)	NEGATIVO (%)	NÃO REALIZADO
ARAÇATUBA (451)	88 (19,5%)	363 (80,5%)	167 (37,0%)	279 (61,9%)	5 (1,1%)	152 (33,8%)	297 (65,8%)	2 (0,4%)	87 (19,3%)	167 (37,0%)	197 (43,7%)
PEREIRA BARRETO (99)	15 (15,1%)	84 (84,9%)	12 (12,1%)	87 (87,9%)	-	34 (34,3%)	65 (65,7%)	-	16 (16,1%)	83 (83,9%)	-
BIRIGUI (150)	25 (16,7%)	125 (83,3%)	54 (36,0%)	95 (63,3%)	1 (0,7%)	8 (5,3%)	128 (85,3%)	14 (9,4%)	21 (14,0%)	127 (84,7%)	2 (1,3%)
BJURITAMA (100)	3 (3,0%)	97 (97,0%)	25 (25,0%)	75 (75,0%)	-	8 (8,0%)	92 (92,0%)	-	34 (34,0%)	66 (66,0%)	-
GUARARAPES (100)	35 (35,0%)	65 (65,0%)	30 (30,0%)	68 (68,0%)	2 (2,0%)	38 (38,0%)	58 (58,0%)	4 (4,0%)	32 (32,0%)	67 (67,0%)	1 (1,0%)
MIRANDÓPOLIS (99)	18 (18,1%)	81 (81,9%)	33 (33,3%)	66 (66,7%)	-	29 (29,3%)	70 (70,7%)	-	29 (29,2%)	70 (70,8%)	-
PENÁPOLIS (100)	21 (21,0%)	79 (79,0%)	20 (20,0%)	79 (79,0%)	1 (1,0%)	15 (15,0%)	85 (85,0%)	-	27 (27,0%)	71 (71,0%)	2 (2,0%)
PROMISSÃO (100)	4 (4,0%)	96 (96,0%)	31 (31,0%)	69 (69,0%)	-	12 (12,0%)	88 (88,0%)	-	25 (25,0%)	75 (75,0%)	-
<b>TOTAL (%)</b>	<b>209 (17,4%)</b>	<b>990 (82,6%)</b>	<b>372 (31,3%)</b>	<b>818 (68,7%)</b>	<b>9 (0,7%)</b>	<b>296 (25,1%)</b>	<b>883 (74,9%)</b>	<b>20 (1,7%)</b>	<b>271 (27,2%)</b>	<b>726 (72,8%)</b>	<b>202 (16,8%)</b>
<b>TOTAL</b>	<b>1199</b>		<b>1190</b>		<b>9</b>	<b>1179</b>		<b>20</b>	<b>997</b>		<b>202</b>
			<b>1199</b>			<b>1199</b>			<b>1199</b>		

Entretanto, em sete municípios, foi verificado que o teste rápido anti-rK39 realizado com soro, detectou maior ou similar quantidade de amostras reagentes em relação ao ELISA

## DISCUSSÃO

O conhecimento da prevalência real da infecção canina é essencial para a definição de estratégias de controle, adequadas e adaptadas, aos diferentes perfis epidemiológicos regionais. Em virtude da inexistência ou implementação de outras medidas que impeçam a infecção do vetor ou dos hospedeiros vertebrados, a realização de inquéritos caninos e eutanásia de cães soropositivos, até o momento, tem sido a única estratégia de controle disponível direcionada à população canina e adotada para execução em larga escala, embora limitada quanto à operacionalização e resultados efetivos.

Assim, testes diagnósticos mais sensíveis, específicos e de simples execução são imprescindíveis para os programas de vigilância e controle da LV canina e humana<sup>39</sup>.

No presente estudo, níveis de positividade foram diferentes entre os municípios paulistas em que foram realizados os inquéritos amostrais. Este achado poderia ser explicado pelas variações da prevalência da LV canina em cada região.

Grandes variações de prevalência encontradas entre populações caninas separadas por poucos quilômetros, podem ser influência das condições ecológicas distintas que determinariam a abundância de flebotomíneos dentro de uma área endêmica, pela sobreposição da LTA ou ainda resultante das medidas de controle adotadas<sup>39,40,41,42,43</sup>.

Entretanto, em alguns municípios, os valores de soropositividade verificados para os diferentes testes utilizados na detecção de anticorpos anti- *Leishmania* e tipo de amostra diferiram consideravelmente da positividade observada no total de amostras processadas (Tabela 1). Assim, no município de Pereira Barreto, a RIFI detectou aproximadamente o dobro de cães soropositivos comparada às outras técnicas; em Buritama os percentuais de positividade foram respectivamente de 3%, 8%, 34% e 25% no teste rápido realizado com sangue total, na RIFI, no ELISA e no teste rápido realizado com soro.

É lícito pensar que a existência de diferenças regionais e temporais na concentração de animais em distintos estágios clínicos da infecção e/ou distintos espectros imunitários possam ter atuado como interferentes explicando os achados acima registrados.

Tanto o teste rápido anti-rK39 realizado em amostras de sangue total e soro, quanto a RIFI e ELISA apresentam variações relativas à especificidade e a sensibilidade frente a diferentes antígenos e estágios da infecção<sup>27,44</sup>.

A RIFI como técnica para a detecção de anticorpos anti-*Leishmania* pode apresentar limitações quanto à capacidade de identificação da soroconversão em cães naturalmente infectados, demandando em algumas situações um intervalo de até oito meses de história<sup>45</sup>.

Neste trabalho, o teste rápido anti-rK39 realizado em condições de campo, com sangue total, apresentou baixo desempenho em detectar cães soropositivos em comparação ao teste rápido realizado em laboratório, com soro e à RIFI e ELISA, corroborando os resultados obtidos por Genaro et al.<sup>27</sup> e Rocha<sup>44</sup>. É relevante que o “Kit” utilizado neste estudo é recomendado para amostras de soro de cães.

Rocha<sup>44</sup> empregou o mesmo “kit” utilizado neste trabalho para a pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania*. Os resultados revelaram baixa especificidade e alta fração de falso-positivos. A autora considerou a possibilidade de algum componente do sangue interferir na formação dos complexos dos anticorpos anti-*Leishmania* com a proteína-A ouro coloidal e/ou na sua migração até a região onde o antígeno K39 encontra-se fixado (linha teste); e também relatou a migração exagerada de hemácias na fita quando colocada uma amostra excedente de sangue, que dificultou a interpretação dos resultados. Porém, em nossa investigação, a concentração de hemácias nas fitas do teste rápido, realizado com alíquotas de 20-30 $\mu$ l de sangue total, não dificultou a observação dos resultados.

O teste rápido anti-rK39 realizado no soro detectou o maior percentual de cães soropositivos (31,3%), mas não muito superior daqueles encontrados na RIFI (25,1%) e ELISA (27,2%).

Badaró et al.<sup>35</sup> e Genaro et al.<sup>27</sup> referem o antígeno rK39 como indicador da presença de LV canina aguda e altamente específico, sendo que os primeiros autores avaliaram o teste ELISA-rK39 e Genaro et al.<sup>27</sup>, o teste rápido anti-rK39 (TRALd). Entretanto, Rocha<sup>44</sup>, verificou que mais de 89% dos cães assintomáticos, parasitologicamente positivos, apresentaram-se positivos no ELISA-rK39, no TRALd-campo e no TRALd-laboratório.

No Mediterrâneo, Chicharro et al.<sup>46</sup> investigaram 930 cães e encontraram 91 (9,8%) animais reativos no teste rápido anti-rK39. Destes, 42/91 (46%) eram sintomáticos; em 50/91 (56%) foram possíveis a detecção de DNA de *Leishmania infantum* e os parasitas foram isolados em 20/91 (22%) cães sintomáticos e em 14/91 (15,4%) assintomáticos.

Segundo Scalone et al.<sup>32</sup>, a eficácia do rK39 em detectar assintomáticos é diferente entre LV canina e humana. Os autores verificaram que o tempo de soroconversão e os resultados obtidos na RIFI e no ELISA com antígeno rK39 foram altamente concordantes no seguimento de um grupo de cães naturalmente infectados que fizeram parte de um estudo que envolveu 6368 animais.

Sendo assim, a superioridade e/ou a similaridade do teste rápido anti-rK39 realizado no soro na detecção de anticorpos anti-*Leishmania* frente a RIFI e ELISA, constatada nesta investigação, sugere que a presença de anticorpos contra o antígeno recombinante k39 foi comum nos variados espectros imunológicos da LV canina.

A ausência de positividade nos cães residentes em municípios com transmissão autóctone de LTA ou portadores de outras patologias reforçam a indicação do teste rápido anti-rK39 como específico.

Muitos autores compararam a sensibilidade e a especificidade da RIFI e do ELISA no diagnóstico da LV canina, mas alguns resultados são contraditórios, inclusive quanto ao desempenho de uma mesma técnica diagnóstica e em função da localidade estudada. De um modo geral, os estudos disponíveis na literatura, caracterizam-se por incluir um número reduzido de amostras e animais comprovadamente infectados e/ou soropositivos, ou ainda em condições que não são reproduzidas em laboratórios que processam um grande número de amostras durante a realização de inquéritos caninos.

Ferrer et al.<sup>20</sup> e Courtenay et al.<sup>47</sup> atribuem baixa sensibilidade à RIFI, porém em muitos países do Mediterrâneo, a RIFI é considerada o teste padrão-ouro para o diagnóstico da LV canina e reconhecida como o teste mais sensível e específico<sup>48</sup>.

Com base na literatura científica, na orientação (bula) que acompanha os “kits” de reagentes Bio-Manguinhos/Fundação Oswaldo Cruz - LV canina para RIFI e ELISA, é informado que o desempenho da RIFI para amostras de soro oscila em torno de 90% de sensibilidade e 80% de especificidade.

Para os cálculos de sensibilidade e especificidade do ELISA, a RIFI foi considerada o teste padrão e os seguintes índices foram obtidos: sensibilidade de 94,5% e 91,7% de especificidade para amostras de soro; 79,4% de sensibilidade e especificidade de 90,24% para amostras de eluato de sangue colhido em papel de filtro.

Em São Paulo, Camargo-Neves<sup>40</sup> verificou que a RIFI (“Kit” Bio-Manguinhos) foi pouco sensível em inquéritos realizados no município de Araçatuba entre 1999 e 2001, porém a técnica apresentou alta especificidade na detecção de animais infectados, visto que os resultados apresentaram boa concordância com o exame parasitológico.

Lira et al.<sup>49</sup> avaliaram a performance dos “Kits” Bio-Manguinhos para a RIFI e ELISA. O ELISA revelou sensibilidade de 72% e a RIFI, 68%; a especificidade foi de 87,5% para as duas técnicas diagnósticas. Esses percentuais ficaram aquém dos valores referidos pelo fabricante dos “Kits”.

No presente estudo foi observada similaridade no percentual de positividade na detecção de anticorpos anti-*Leishmania* entre a RIFI e ELISA no total geral das amostras processadas, sendo que em seis, dos oito municípios incluídos no estudo, os percentuais de soropositividade do ELISA foram próximos ou superiores aos resultados obtidos com a RIFI. Relato semelhante foi descrito por Guimarães et al.<sup>50</sup> em estudo conduzido em duas vilas com casos de LVA, no Maranhão, em que o “Kit” Biomanguinhos foi utilizado apenas para a RIFI.

## CONCLUSÕES

O teste rápido anti-rK39 realizado com sangue total, em condições de campo, apresentou baixo desempenho na detecção de anticorpos anti-*Leishmania* em cães, quando comparado ao teste rápido realizado com soro, à RIFI e ELISA.

No entanto, o teste rápido realizado com soro, apresentou-se como um método adequado tanto para o diagnóstico complementar como para a triagem de amostras na realização de inquéritos caninos em áreas endêmicas para LV canina. Considerando-se ainda que no mínimo, o teste foi capaz de detectar cães soropositivos tanto quanto as técnicas diagnósticas utilizadas pelo Programa de Controle da LVA, e permite o processamento de um grande número de amostras, com poucas exigências técnicas e com tempo e custo operacional reduzido.

## REFERÊNCIAS

1. Ross R. Further notes on leishman's bodies. *Brit Med J* 1903; 2: 1401.
2. WHO. World Health Organization. The 17<sup>th</sup> Programme Report of the UNICEF/UNDP/World Bank/ WHO Special Programme for Research & Training in Tropical Diseases 2006. [Acesso em 13/09/2006]. Disponível em: <http://www.who.int/tdr/leishmaniasis.htm>
3. Lutz A, Neiva A. Contribuição para o conhecimento das espécies do gênero *Phlebotomus* existentes no Brasil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1912; 4: 84-95.
4. Lainson R, Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peter W. Killick-Kendrick r. Ed. *The leishmaniasis in biology and medicine*. London, Academic Press; 1987 v.1.
5. Gontijo CMF, Melo MN. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Rev Bras Epidemiol* 2004; 7(3): 338-48.
6. Ministério da Saúde do Brasil. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Brasília (DF); 2003.
7. Vieira JBF, Coelho GE. Leishmaniose Visceral ou Calazar: aspectos epidemiológicos e de controle. *Rev Soc Bras Med Trop* 1998; 31 Supl 2: 85-92.
8. Simplício ACR, Furtado JBV, Monteiro OS, Garret D. Leishmaniose Visceral no Brasil. Análise epidemiológica nos últimos 16 anos. *Rev Soc Bras Med Trop* 2002; 35(I): 298.
9. Ministério da Saúde do Brasil. Sistema Único de Saúde –SUS. Indicadores de morbidade e fatores de risco. [Acesso em 02/04/07]. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br>
10. Costa CHN, Vieira JBF. Mudanças no controle da leishmaniose visceral no Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2001; 30 (1): 223-8.
11. Ministério da Saúde do Brasil. Fundação Nacional de Saúde. Coordenação de Controle de Doenças Transmitidas por Vetores. Controle, diagnóstico e tratamento da Leishmaniose Visceral (calazar) – normas técnicas. Brasília (DF); 1996.

12. Deane LM, Deane MP. Infecção experimental do *Phlebotomus longipalpis* em raposa (*Lycalopex vetulus*) naturalmente infectada pela *L. donovani*. Hospital 1954; 46: 651-3.
13. Deane LM, Deane MP. Observações preliminares sobre a importância comparativa do homem, do cão e da raposa (*Lycalopex vetulus*) como reservatórios de *Leishmania donovani* em área endêmica de calazar no Ceará. Hospital 1955; 48: 61-76.
14. Marzochi MCA, Marzochi KB. Leishmanioses em áreas urbanas. Rev Soc Bras Med Trop 1997; 30 (I): 162-4.
15. Monteiro OS, Lacerda MM, Arias JR. Controle da Leishmaniose Visceral no Brasil. Rev Soc Bras Med Trop 1994; 27 (Supl 3): 67-72.
16. Alencar JE. Leishmaniose Visceral no Brasil. Rev Med Univ Fed Ceará 1978; 17-18: 129-48.
17. Deane, LM. Leishmaniose Visceral no Brasil. Estudos sobre os reservatórios e transmissores realizados no Estado do Ceará. Serviço Nacional de Educação Sanitária. Rio de Janeiro; 1956.
18. Marzochi MCA, Coutinho SG, Souza WJS, Toledo LM, Gimaldi Jr G, Momen H, Pacheco RS, Sabroza PC, Souza MA, Rangel Jr FB, Tramontano NC. Canine Visceral Leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. Clinical, parasitological, therapeutical and epidemiological findings (1977-1983). Mem Inst Oswaldo Cruz 1985; 80 (3): 349-57.
19. Ashford DA, Bozza M, Freire M, Miranda JC, Sherlock I, Eulálio C, Lopes U, Fernandes O, Degraive W, Barker JR, Badaró R, David JR. Comparison of the polymerase chain reaction and serology for the detection of canine visceral leishmaniasis. Am J Trop Med Hyg 1995; 53 (3): 251-5.
20. Ferrer L, Aisa M, Roura X e Portus M. Serological diagnosis and treatment of canine leishmaniasis. Vet Rec 1995; (136): 514-6.
21. Aisa MJ, Castillejo S, Galleo M, Fisa R, Riera MC, Colmenares M et al. Diagnostic potential of western blot analysis of sera from dogs with leishmaniasis in endemic areas and significance of the pattern. Am J Trop Med Hyg 1998; 58(2): 154-9.
22. Ashford DA, Badaró R, Eulálio C, Freire M, Miranda C, Zalis M e David Jr. Studies on the control of Visceral leishmaniasis: validation of the Falcon assay screening test-enzyme linked immunosorbent assay screening (FAST-ELISA) for field diagnosis of canine visceral leishmaniasis. Am J Trop Med Hyg. 1993; (48):1-8.
23. Dietze R, Falqueto A, Valli, LCP, Rodrigues TP, Boulos M, Correy R. Diagnosis of canine Visceral leishmaniasis with a dot-enzyme-linked immunosorbent assay. Am J Trop Med Hyg 1995; (53): 40-2.
24. Gulnara P, Cabrera B, Silva VO, Costa RT, Reis AB, Mayrink W, Genaro O, Palatnik-de-Souza CB. The fucose-mannose ligand-ELISA in the diagnosis and prognosis of canine Visceral leishmaniasis in Brazil. Am J Trop Med Hyg 1999;61 (2), 296-301.
25. El Harith A, Slappendel RJ, Reiter I, Van Knapen F, Korte P, Huigen E, Kolk AH. Application of a direct agglutination test for detection of specific anti-Leishmania antibodies in the canine reservoir. J Clin Microbiol 1989; 27(10): 2252-7.
26. Arias JR, Monteiro PS, Zicker F. The reemergence of visceral leishmaniasis in Brazil. Emerg Infect Dis. 1996; 2: 145-6.
27. Genaro O, Costa RT, França Silva JC, Reis AB, Vieira EP, Arias JR et al. Evaluation of an immunochromatographic assay for the diagnosis for dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania chagasi* in Brazil. Acta Parasitol Turcica 1997; 21(I): 93.
28. Jelinek T, Eichenlaub S, Loscher T. Sensitivity and specificity of a rapid immunochromatographic test for diagnosis of visceral leishmaniasis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1999; (9): 669-70.
29. Sundar S, Reed SG, Singh VP, Kumar PC, Murray HW. Rapid accurate field diagnosis of Indian visceral leishmaniasis. Lancet 1998; 351(9102): 563-5.
30. Badaró, R. Desenvolvimento e utilização de um antígeno recombinante específico de *Leishmania chagasi* (rK39) no diagnóstico sorológico da leishmaniose visceral. [Tese de doutorado]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, 1996.
31. Dye C, Vidor E, Dereure J. Serological diagnosis of leishmaniasis: on detecting infection as well as disease. Epidemiol Infect 1993; 103: 647-56.
32. Scalone A, De Luna R, Oliva G, Baldi L, Satta G, Vesco G, Mignone W, Turilli C et al. Evaluation of the Leishmania recombinant k39 antigen as a diagnostic marker for canine leishmaniasis and validation of a standardized enzyme-linked immunosorbent assay. Vet Parasitol 2002; 104: 275-85.
33. Ministério da Saúde do Brasil. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral. Brasília (DF); 2006.
34. Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Superintendência de Controle de Endemias – SUCEN e Coordenadoria de Controle de Doenças – CCD. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral Americana do Estado de São Paulo. São Paulo; 2006.
35. Badaró R, Benson D, Eulálio MC, Freire S, Cunha S, Netto EM, Pedral-Sampaio D, Madureira C, Burns JM, Houghton RL, David JR, Reed SG. rK39: A cloned antigen of *Leishmania chagasi* that predicts active visceral leishmaniasis. J Infect Dis 1996; 173: 758-61.
36. Nakatani M, Miranda-Badaró R, Meireles A, Trigo J, Netto EM, Badaró R. Avaliação da sensibilidade do teste rápido (TRALd) para detecção de anticorpos anti-

- Leishmania* com o novo antígeno K26 adicionado ao K39. *Rev Bras Med Trop* 2001; Suplemento: 10.
37. Burns JM Jr, Shreffler WG, Benson DR, Ghalib HW, Badaró R, Reed S. Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. *Proc Natl Acad Sci* 1993; 90: 775-9.
38. Zijlstra EE, Daifalla NS, Kager PA, Khalil EAG, El-Hassan AM, Reed SG et al. Rk39 enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Leishmania donovani* infection. *Clin Diag Lab Immunol* 1998; 5: 717-20.
39. Gradoni L. Epizootiology of canine leishmaniasis in southern Europe. In Killick-Kendrick, R. (ed). *Canine leishmaniasis: an update*. Hoechst Roussel Vet, Wiesbaden; 1999: pp. 32-6.
40. Camargo – Neves VLF. Aspectos epidemiológicos e avaliação das medidas de controle da leishmaniose visceral americana no Estado de São Paulo, Brasil. [Tese de doutorado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, 2004.
41. Dye C, Killick-Kendrick R, Vitutia MM, Walton R, Harith AE, Killick-Kendrick M et al. Epidemiology of canine leishmaniasis: prevalence, incidence and basic reproduction number calculated from a cross-sectional serological survey on the island of Gozo, Malta. *Parasitology (Lond)* 1992; 105: 35-41.
42. França-Silva JC, Costa RT, Siqueira AM, Machado-Coelho GL, Costa CA, Mayrink W, Vieira EP, Costa JS, Genaro O, Nascimento E. Epidemiology of canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Montes Claros Municipality, Minas Gerais State, Brazil. *Vet parasitol* 2003; 111: 161-73.
43. Solano-Galego L, Morell B, Arboix M, Alberola J, Ferrer L. Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in the area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 560-3.
44. Rocha MF. Validação do teste rápido para detecção de anticorpos anti-*Leishmania donovani* no diagnóstico da leishmaniose visceral canina em Montes Claros, Minas Gerais, Brasil. [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina; 2002.
45. Quinzel, RJ, Courtenay O, Garcez L, Dye C. The epidemiology of canine leishmaniasis: transmission rates estimated from a cohort study in Amazonian Brazil. *Parasitology* 1997; 115: 143-56.
46. Chicharro C, Nieto J, García E, Cruz I, Cañavate C, Flores M, Cuadrado J, Alvar J. Epidemiologia de la leishmaniasis canina em Ibiza (Islas Baleares): estudio comparativo de diferentes métodos de diagnóstico. *Enf Emerg* 2004; 6 (3): 189-200.
47. Courtenay O, Quinzel RJ, Garcez LM, Shaw JJ, Dye C. Infectiousness in a cohort of Brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. *J Infect Dis* 2002; 186(9):1314-20.
48. Gradoni, L. The diagnosis of canine leishmaniasis. In: *Canine leishmaniasis: moving towards a solution*. Proceedings of the 2<sup>nd</sup> International Canine Leishmaniasis Forum, 2002. Intervet International by, Boxmeer, The Netherlands.
49. Lira RA, Cavalcanti MP, Nakazawa M, Ferreira AGP, Silva ED, FGC Abath, Alves LC et al. Canine visceral leishmaniasis: A comparative analysis of the EIE-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Maguinhos and the IFI-leishmaniose-visceral-canina-Bio-Maguinhos Kits. *Vet Parasitol* 2006; 137: 11-6.
50. Guimarães KS, Batista ZS, Dias EL, Guerra RMSNC, Costa ADC, Oliveira AS, Calabrese KS et al. Canine visceral leishmaniasis in São José de Ribamar, Maranhão, Brazil. *Vet Parasitol* 2005; 131: 305-9.

# Diagnóstico laboratorial da coqueluche: freqüência do isolamento de *Bordetella pertussis* de amostras clínicas, por meio da técnica de cultura realizada nos laboratórios regionais do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brasil.

Pertussis diagnosis: frequency of *Bordetella pertussis* detection from clinical samples by the culture method performed at regional laboratories of the Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brazil.

RIALA6/1128

Rosana B. de OLIVEIRA e SILVA<sup>1</sup>, Eneida G. LEMES-MARQUES<sup>2\*</sup>, Marta I. C. MEDEIROS<sup>3</sup>, Ivete A. Z. C. de ALMEIDA<sup>4</sup>, Maria Regina N. R. ESPER<sup>5</sup>, Maricene GARBELOTTI<sup>6</sup>, Maria LOPES<sup>7</sup>, Salet F. PORTO<sup>8</sup>, Regina R. F. e SILVA<sup>9</sup>, Beatriz P. PREGNOLATTO<sup>10</sup>, Jane P. dos SANTOS<sup>11</sup>, Ângela Maria G. DIAS<sup>12</sup>.

\*Endereço para correspondência: <sup>2</sup>Instituto Adolfo Lutz, Laboratório Regional de Campinas, Setor de Bacteriologia, Rua São Carlos 720 CEP 13035-420, Campinas/ SP, Brasil. Tel.: (19) 3272-7977; fax: (19) 3273-1698; e-mail: eglmarques@ial.sp.gov.br

<sup>1</sup>Instituto Adolfo Lutz, Laboratório Regional de Rio Claro; <sup>3</sup>Laboratório Regional de Ribeirão Preto;

<sup>4</sup>Laboratório Regional de São José do Rio Preto; <sup>5</sup>Laboratório Regional de Presidente Prudente;

<sup>6</sup>Laboratório Regional de Bauru; <sup>7</sup>Laboratório Regional de Taubaté; <sup>8</sup>Laboratório Regional de Marília;

<sup>9</sup>Laboratório Regional de Santo André; <sup>10</sup>Laboratório Regional de Santos;

<sup>11</sup>Laboratório I de Araçatuba, DRS-6; <sup>12</sup>Laboratório Regional de Sorocaba.

Recebido: 09/05/2007 – Aceito para publicação: 16/08/2007

## RESUMO

A coqueluche é uma doença respiratória infecciosa aguda, causada por *Bordetella pertussis*, cocobacilos Gram-negativos fastidiosos com requisitos nutricionais complexos. Recentemente foi descrito em vários países o aumento do número de casos da doença - com o acometimento de populações vacinadas - e da sua incidência em adolescentes e adultos. No Brasil, a coqueluche só se tornou doença de notificação compulsória a partir de 2001. O presente trabalho avaliou o índice de positividade no diagnóstico da coqueluche por meio da técnica de cultura de secreção de nasofaringe, realizada segundo Regan e Lowe, 1997, e também a sua freqüência em diferentes faixas etárias, nas regiões de abrangência dos Laboratórios Regionais do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, no período de 2001 a 2005. Os resultados mostraram aumento no número de amostras positivas a partir de 2004, o que pode ter ocorrido em função da maior conscientização dos profissionais envolvidos na investigação e notificação da doença. O maior número de amostras positivas deu-se na faixa etária de 0 a 6 meses (65,0%), com predomínio da faixa de 1 a 3 meses. A taxa de positividade em adolescentes e adultos foi de 19,4%. Os dados obtidos são relevantes para a melhoria do diagnóstico da coqueluche na região estudada e indicam a necessidade de informações adicionais para dar suporte às estratégias de prevenção e prover um melhor entendimento da doença no país.

**Palavras-chaves.** *Bordetella pertussis*, coqueluche, epidemiologia, diagnóstico laboratorial.

## ABSTRACT

Pertussis or whooping cough is an acute respiratory infectious disease caused by *Bordetella pertussis*, a small Gram-negative coccobacillus which has complex nutritional requirements. Several countries have recently reported an increase in pertussis in immunized populations, accompanied by a significant increase among adolescents and adults. In Brazil, pertussis had its epidemiological surveillance established only in 2001. This study evaluated the indices of positivity on culture method performed according to Regan & Lowe, 1997, for pertussis diagnosis in the regions enclosed by the regional laboratories of the Instituto

Adolfo Lutz - São Paulo state, Brazil, from 2001 to 2005. An increase in the number of positive samples was observed since 2004, which could be due to a better identification of the disease by health workers involved on its investigation, diagnosis, and notification. According to these results, the young infants presented the highest positivity rate (age 0-6 months, 65.0%). The older age groups (adolescents and adults) showed 19.4% of positivity. These data are relevant for monitoring pertussis diagnosis and for conducting epidemiological studies in the studied regions, and also to provide support to prevention programs.

**Key words.** *Bordetella pertussis*, epidemiology, whooping cough, pertussis, laboratory diagnosis.

## INTRODUÇÃO

A coqueluche é uma doença respiratória aguda, infecciosa, causada por *Bordetella pertussis*, cocobacilos ou bacilos curtos Gram-negativos, aeróbios estritos, metabolicamente inativos, com crescimento ótimo em temperatura que varia entre 35° e 37° C<sup>1</sup>. *B. pertussis* produz múltiplos produtos antigênicos e biologicamente ativos que são responsáveis pelas características clínicas da coqueluche. O período de incubação é comumente de 7 a 10 dias, podendo variar de 4 a 21 dias. A doença pode ser dividida em três fases, a primeira, chamada fase catarral (período de maior infectividade), onde ocorre a infecção ou colonização da bactéria no revestimento epitelial respiratório, e que está presente nas crianças e em 6% dos adultos. Tem quadro típico de tosse seca, especialmente noturna, que evolui em uma a duas semanas para a segunda fase, quando ocorre a doença propriamente dita - fase paroxística - com tosse constante e repetitiva, concluindo cada episódio com um estridor respiratório característico, seguido por vômitos. Por fim, a fase de convalescença, com diminuição em frequência e intensidade da tosse e dos vômitos. O único reservatório de *B. pertussis* conhecido é o homem e a transmissão se dá por contato direto com os indivíduos sintomáticos, através das secreções do trato respiratório e, raramente, por contato indireto com fômites. A doença é altamente contagiosa, e apresenta significativa morbidade, particularmente em crianças<sup>2,3</sup>. Crianças menores de um ano que ainda não completaram o esquema básico de imunização, e adolescentes/adultos compreendem hospedeiros suscetíveis de importância para a doença, com sintomas brandos e atípicos. A imunidade que se segue à infecção parece não ser permanente. A coqueluche não confere imunidade transplacentária e a lactação materna também não protege contra a doença<sup>4</sup>. A antibioticoterapia de escolha são os macrolídeos que eliminam a presença da bactéria nas secreções, o que diminui os riscos de contaminação. É preconizada para todas as pessoas próximas do doente, qualquer que seja sua idade ou seu estado de imunização<sup>5</sup>. A letalidade se deve em geral à pneumonia e, nas crianças menores, à encefalopatia hipóxica. A OMS estima que nos países em desenvolvimento esta letalidade seja de 1% e nos países desenvolvidos de 0,04%<sup>6</sup>. A principal dificuldade na vigilância dessa doença está na confirmação etiológica, pois outras doenças respiratórias agudas, virais ou bacterianas podem provocar a “síndrome

pertussis” ou “doenças coqueluchóides”, podendo então ser confundidas e classificadas como coqueluche<sup>4</sup>.

A imunização tem reduzido a prevalência de *B. pertussis* em muitos países, no entanto, a vacina não confere imunidade completa e permanente, caindo gradualmente com o passar do tempo, não havendo nenhuma proteção evidente após 12 anos<sup>4</sup>. Desta forma, a circulação da bactéria permanece mesmo em países com elevada cobertura vacinal, acometendo crianças não imunizadas (menores de seis meses), adolescentes e adultos que já perderam a imunidade conferida por meio de vacinação prévia ou infecção natural<sup>7,8,9,10</sup>.

Nos anos 80, um aumento no número de casos de coqueluche - com o acometimento de populações vacinadas - e da incidência da doença em adolescentes e adultos foi descrito por vários países como os EUA, Canadá, Reino Unido, França, Finlândia, Alemanha, Suécia, Espanha, Holanda, Rússia, Austrália e Japão<sup>11,12,13,14,15,16</sup>. As razões para este aumento não estão completamente esclarecidas e, além da perda progressiva da imunidade induzida pelas vacinas, entre as possíveis hipóteses surgidas para explicar o aparente ressurgimento da doença, incluem-se:

- Possíveis mudanças genéticas em *B. pertussis*, tornando as vacinas menos efetivas;
- Vacinas com potência diminuída;
- Melhor conhecimento da bactéria;
- Disponibilidade de melhores testes diagnósticos;
- Maior reconhecimento pelos médicos da tosse convulsiva em adolescentes e adultos;
- Melhoria dos sistemas de vigilância epidemiológica, com uma maior capacidade de detecção de casos e conseqüente aumento nas notificações (pseudo-epidemia por aumento de diagnóstico e notificações)<sup>3,6,9,10,17,18,19</sup>.

Como resposta a este aumento, vários países introduziram o uso da vacina acelular para coqueluche em adolescentes e adultos<sup>20</sup>. A vacina celular aplicada em crianças pequenas tornou-se contra-indicada em crianças maiores de 7 anos e adultos pelas graves e freqüentes reações adversas observadas. As vacinas acelulares demonstraram ser significativamente menos reatogênicas em lactentes, o que estimulou a idéia de testá-las também em adultos e adolescentes. No entanto, até onde se sabe, a resposta sorológica às vacinas acelulares se esvai em poucos anos e se ignora o que se sucede com a imunidade celular. Além disso, se desconhece se há algum impacto benéfico da vacina acelular no transporte faríngeo

transitório de *B. pertussis*. Se não houver nenhum, a circulação da bactéria continuará tanto entre vacinados como não vacinados. Estes fatores necessitam ser conhecidos, pois são primordiais para se poder adaptar ao futuro as estratégias vacinais adequadas<sup>8,18</sup>.

No Brasil, a vacinação sistemática das crianças foi iniciada em 1983, aproximadamente trinta anos após o início da vacinação nos países de economia central. A partir desta data o número de casos notificados caiu abruptamente, mantendo desde então uma tendência decrescente. Com base nos dados de notificação compulsória, não existem ainda sinais de reemergência da coqueluche no país<sup>10</sup>. No entanto, com o uso da vacina que não permite reforços acima dos 7 anos, também no Brasil adolescentes e adultos que perderam a imunidade e crianças menores de um ano, que ainda não completaram o esquema básico passam a ser dois reservatórios de suscetíveis com grande importância para o controle da doença<sup>4</sup>. Embora muitos países já tenham abolido a utilização da vacina DTPw, o Brasil ainda a utiliza<sup>9</sup>.

O diagnóstico precoce da coqueluche e o tratamento dos casos com antibióticos podem diminuir a severidade dos sintomas e limitar o período de transmissão. Nos casos em que a suspeita clínica para a doença é baixa (caso esporádico, sem vínculo epidemiológico com um caso confirmado, ausência de paroxismo, etc.), o diagnóstico laboratorial é necessário antes do início do tratamento, da investigação e intervenção<sup>3</sup>. Este diagnóstico pode ser realizado por exames imunológicos, moleculares e microbiológicos, sendo o isolamento de *B. pertussis* a partir de cultura de secreção nasofaríngea em ágar carvão (ágar Regan-Lowe) a técnica recomendada para o diagnóstico da coqueluche, devido à sua elevada especificidade<sup>21</sup>. Tem valor especial em surtos e epidemias, quando o diagnóstico é mais precoce, visto que a maior positividade (80 a 90%) nesta técnica se dá na fase inicial da doença (primeira semana) e antes da introdução da antibioticoterapia<sup>3,4</sup>. Entretanto, exigentes requisitos de crescimento tornam *B. pertussis* difícil de cultivar. O cultivo requer a neutralização de produtos tóxicos emanados de seu metabolismo e seu crescimento é lento, mais lento que o da flora microbiana acompanhante. Daí o emprego de meios com carvão (que é absorvente) para este cultivo, adicionados de antimicrobianos. Além destes fatores, há outros que dificultam o isolamento do microrganismo, como o início da antibioticoterapia antes da coleta da amostra (até 4 dias após o uso de macrólidos ainda se pode detectar *B. pertussis* em 56% dos pacientes, com 7 dias a cultura se negativa completamente) e a demora nesta coleta (após as primeiras 2 semanas do início da doença); o tipo de “swab” utilizado; as condições de coleta e transporte e o tempo decorrido entre a coleta e a semeadura<sup>2,18,22,23</sup>. Sob condições ótimas, 80% dos casos suspeitos podem ser confirmados pela cultura. A caracterização de *B. pertussis* é importante também para se entender a dinâmica da doença, determinar se há relação entre os isolados e a sua sensibilidade aos antibióticos e também prover informações

relacionadas à composição apropriada da vacina a ser usada em cada região<sup>19,24</sup>.

A reação de PCR (“polymerase chain reaction”) é um método rápido, sensível e específico para o diagnóstico da coqueluche. Tem maior sensibilidade que a cultura e continua positiva mesmo com o uso de antimicrobianos, desde 89% até 4 dias até 56% aos 7 dias. Entretanto, resultados falso-positivos podem acontecer por contaminação no laboratório ou durante a coleta da amostra, ou ainda, dependendo da especificidade do segmento amplificado, por similitude genética com outras bordetelas<sup>18</sup>. Além disso, sua performance diminui ao longo da evolução da doença<sup>25</sup> e, embora seja um método já disponível em alguns laboratórios, a técnica utilizada varia entre eles por não haver ainda uma padronização. Desta forma, a PCR pode ser realizada desde que se acompanhe da cultura, não devendo substituí-la<sup>2,6,18,26,27</sup>.

A vigilância epidemiológica da coqueluche no Brasil foi implantada no final do ano 2000, passando a ser considerada doença de notificação compulsória em 2001<sup>28</sup>. Nesse mesmo ano houve a implantação de um sistema de vigilância para a coqueluche no Estado de São Paulo e o Instituto Adolfo Lutz (IAL) com suas unidades, central e regionais, é parte integrante do sistema, realizando o diagnóstico pela cultura da secreção de nasofaringe, método preconizado pelo Ministério da Saúde do Brasil<sup>29</sup>. Até então, os dados disponíveis eram decorrentes do diagnóstico clínico e/ou por métodos laboratoriais não específicos. A técnica de PCR ainda não está implantada como rotina no Brasil<sup>4</sup>.

Este trabalho teve por objetivo avaliar o índice de positividade no diagnóstico da coqueluche pelo método de cultura de casos suspeitos e comunicantes, com a frequência em diferentes faixas etárias, nas regiões de abrangência dos Laboratórios Regionais do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brasil, no período de 2001 a 2005.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas 1912 amostras clínicas de casos e comunicantes com sintomas sugestivos de coqueluche, de pacientes atendidos na área de abrangência dos Laboratórios Regionais do IAL de Campinas, Ribeirão Preto, Sorocaba, Presidente Prudente, São José do Rio Preto, Bauru, Santos, Taubaté, Santo André, Marília, Rio Claro e Laboratório I Araçatuba – DRS-6, no período de janeiro de 2001 a dezembro de 2005.

Coleta de amostras: o Centro de Vigilância Epidemiológica do Estado de São Paulo (CVE) preconiza a coleta do material de casos suspeitos de coqueluche preferencialmente no início dos sintomas característicos da doença (período catarral), antes da antibioticoterapia ou com no máximo 2 ou 3 dias de seu início. Os espécimes nasofaríngeos devem ser obtidos com “swab” de algodão agnatado ou de Dracon<sup>4</sup>. A coleta de material de garganta não

é recomendada, pois *B. pertussis* exibe um tropismo pelo epitélio respiratório ciliado, o qual não é encontrado na faringe<sup>21</sup>.

Transporte de amostras: o meio de transporte de Regan-Lowe<sup>30</sup> suplementado com 10% de sangue desfibrinado estéril de cavalo, e cefalexina na concentração final de 40µg/mL é um meio nutritivo e inibe o crescimento da flora de nasofaringe normal, melhorando deste modo a sobrevivência das bordetelas, sendo o meio de transporte de escolha<sup>21</sup>. Os meios devem ser mantidos em geladeira até a data da coleta. Após a semeadura o meio deve ser enviado ao laboratório o mais rápido possível podendo ser mantido em estufa 35-37°C por um período máximo de 48 horas. O transporte deve ser feito em temperatura ambiente.

Cultura: as amostras recebidas foram semeadas em placas de ágar carvão (Oxoid Ltd., Columbia, Md.) suplementado com 10% de sangue de carneiro ou cavalo, e 40µg/mL de cefalexina, como descrito por Regan e Lowe<sup>30</sup>. As placas foram então incubadas a 35°C em atmosfera úmida, sendo examinadas diariamente por 10 dias consecutivos. As bordetelas são presumivelmente identificadas pela morfologia típica das colônias que aparecem em 3 a 4 dias. As colônias suspeitas foram identificadas segundo Sanden e Weyant<sup>31</sup> e Hoppe e Weiss<sup>23</sup>.

- Projeto aprovado pela CEPIAL (Comitê de Ética em Pesquisa do IAL) - processo CCD-LR n° 31/05.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo, no período estudado foram recebidas 1912 amostras para pesquisa de *B. pertussis*. As regiões cobertas pelos laboratórios regionais de Ribeirão Preto e Campinas foram responsáveis por 60,0% e 12,4% do total de amostras, respectivamente. No total de amostras do laboratório regional

de Campinas estão incluídas também as amostras da região de abrangência do IAL de Rio Claro.

A positividade encontrada dentre as amostras analisadas foi de 9,4%, predominando em todas as regiões estudadas a faixa etária de 0 a 6 meses com 65,0% das amostras positivas, o que está de acordo com a literatura existente<sup>3,4,19</sup>, com maior agrupamento na faixa de 1 a 3 meses (Tabela 1).

A taxa de positividade em adolescentes e adultos foi de 19,4%, o que também está de acordo com a literatura existente<sup>2,6,19,32</sup>. No entanto, é possível que este número seja ainda maior, pois houve um grande número de amostras (109) sem informação da idade do paciente, devido a falhas no preenchimento correto da solicitação do exame, instrumento utilizado para o levantamento de dados neste estudo (Tabela 1). Este fato prejudica a correta distribuição dos casos positivos (15) contidos neste total, nas diversas faixas etárias. É importante lembrar que a dificuldade diagnóstica da coqueluche em adolescentes e adultos, devida à sua apresentação clínica atípica, potencia a disseminação da doença e contribui para a subnotificação<sup>5,6</sup>. Além disso, uma vez que estes freqüentemente têm tosse por várias semanas antes de procurar por atendimento médico, geralmente quando isto acontece é muito tarde para que a cultura seja útil. A melhora no reconhecimento e diagnóstico da doença nos grupos de maior idade em alguns países certamente contribuiu para o aumento recentemente encontrado no número de casos em adolescentes e adultos<sup>2</sup>.

A relação entre a positividade e o número de amostras, em cada regional, foi a seguinte: 2/15 (13,3%) para Marília; 133/1148 (11,6%) para Ribeirão Preto; 23/237 (9,7%) para Campinas; 10/120 (8,3%) para Sorocaba; 6/86 (7,0%) para Santo André; 2/34 (5,9%) para Bauru; 3/92 (3,3%) para

**Tabela 1.** Distribuição numérica de casos e comunicantes<sup>a</sup> de coqueluche, segundo faixa etária, com resultado de cultura para *Bordetella pertussis* realizada nos Laboratórios Regionais do Instituto Adolfo Lutz, no período de 2001 a 2005.

Faixa Etária	Positivos			Negativos		
	Caso	Comunicante	Total	Caso	Comunicante	Total
0-30d	16	1	17	73	2	75
1-3m	78	2	80	355	1	356
3-6m	17	3	20	214	5	219
6-12m	7	0	7	81	8	89
1-5a	2	2	4	129	71	200
5-10a	1	1	2	59	54	113
10-15a	5	1	6	44	64	108
15-20a	8	1	9	44	61	105
Acima 20a	3	17	20	128	245	373
Ignorado	2	13	15	39	55	94
<b>TOTAL</b>	<b>139</b>	<b>41</b>	<b>180</b>	<b>1166</b>	<b>566</b>	<b>1732</b>

<sup>a</sup>Comunicantes: qualquer pessoa exposta a um caso de coqueluche, entre o início do período catarral até três semanas após o início do período paroxístico da doença - período de transmissibilidade (fonte: Ministério da Saúde. Guia de vigilância epidemiológica. 6ª.ed., Brasília. 2005<sup>29</sup>).

Taubaté; 1/106 (0,9%) para São José do Rio Preto; 0/37 (0,0%) para Santos; 0/24 (0,0%) para Araçatuba; 0/13 (0,0%) para Presidente Prudente. Acredita-se que a diferença entre as diversas regiões estudadas, tanto quanto ao número de amostras como quanto à positividade, se deva a diferenças de atuação das vigilâncias em relação à atenção ao diagnóstico laboratorial da coqueluche, e/ou à endemicidade da doença na região.

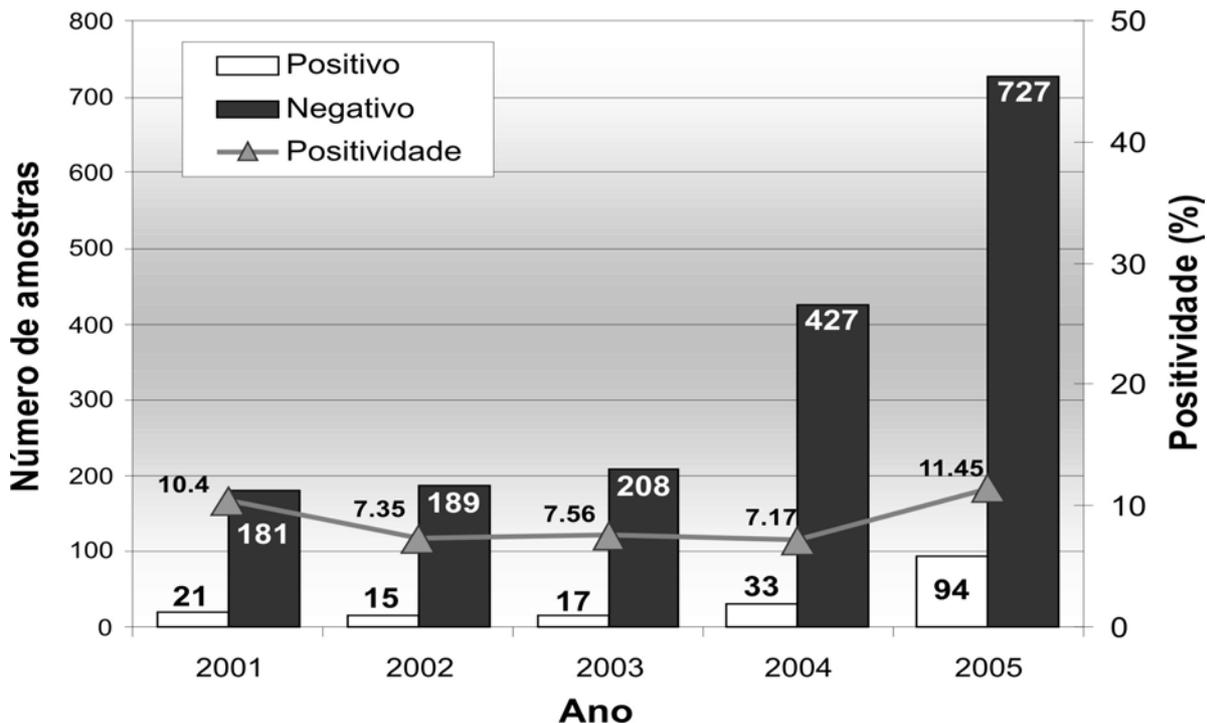
Embora o isolamento de *B. pertussis* de amostras clínicas seja o método recomendado para o diagnóstico da coqueluche devido ao seu alto grau de especificidade, sua sensibilidade pode variar dependendo de um certo número de fatores: método de coleta, meios de transporte e enriquecimento, condições e duração do transporte, escolha dos meios e dos agentes seletivos, e condições de incubação e duração<sup>21</sup>. Embora as vigilâncias das regiões inseridas neste estudo tenham sido treinadas para a coleta e envio de material, muitos problemas foram detectados nas amostras recebidas, como descrito a seguir:

- Preenchimento incorreto ou incompleto dos pedidos de exame;
- Coleta em mais de 4 dias após o início da antibioticoterapia;
- Coleta de material de orofaringe ao invés de nasofaringe;
- Meio de transporte enviado sem “swab” ou com “swab” colocado de forma inadequada no tubo;
- Crescimento de colônias em 24 horas da semeadura no ágar carvão, indicando contaminação na coleta ou durante a colocação do “swab” no meio de transporte.

Assim, a melhoria nas condições de coleta e transporte das amostras e maior critério e rigor no preenchimento das requisições de exames são de crucial importância para a qualidade do diagnóstico da coqueluche. “Swabs” de garganta e da parede nasal anterior têm baixas taxas de recuperação de *B. pertussis*, não sendo indicados para o diagnóstico da doença, de modo que a coleta de material da parede posterior da nasofaringe obtida corretamente é essencial para a qualidade dos resultados. Nos meios de cultura utilizados, *B. pertussis* só apresenta crescimento em média após três dias de incubação; no entanto, todos os laboratórios participantes tiveram culturas com crescimento abundante de outras bactérias em 24 horas (dados não apresentados), o que sugere coleta inadequada, prejudicando ou até mesmo impedindo o crescimento posterior de *B. pertussis*.

Todos estes fatores combinados diminuem a sensibilidade do método de cultura empregado neste estudo, limitando a detecção de casos positivos e, conseqüentemente, aumentando a possibilidade de resultados falso-negativos. Mesmo assim, a casuística estudada neste trabalho apresentou dados suficientes que corroboram com a literatura existente no Brasil<sup>19</sup>.

Gonçalves<sup>19</sup> relata um aumento no isolamento de *B. pertussis* a partir da implantação do sistema sentinela da coqueluche. Em nosso estudo, embora a positividade tenha se mantido entre 7,2 e 11,4% durante o período avaliado, a demanda para o diagnóstico aumentou em torno de quatro vezes - de 202 amostras em 2001 para 821 amostras em 2005 (Figura 1) - o que pode ser devido à maior conscientização dos profissionais envolvidos na investigação e notificação da doença.



**Figura 1.** Distribuição anual de amostras recebidas nos Laboratórios Regionais do Instituto Adolfo Lutz para o diagnóstico da coqueluche, em relação à positividade, no período de 2001 a 2005.

A coqueluche é uma das enfermidades imunopreveníveis com controle epidemiológico deficiente em todo o mundo. No Brasil e em outros países a principal limitação para o diagnóstico precoce desta infecção é o custo e a não disponibilidade de testes diagnósticos em muitos laboratórios<sup>33</sup>, o que reafirma o importante papel do laboratório de saúde pública no sistema de vigilância das doenças de notificação compulsória. Luz et al.<sup>10</sup> questionam o real significado da disparidade existente entre a dinâmica da coqueluche em países desenvolvidos e no Brasil, indagando se em nosso meio a coqueluche estaria sob controle, como parecem indicar os dados de notificação, ou se existiria uma gradual modificação na dinâmica da transmissão, que não tem sido detectada pelos sistemas de vigilância epidemiológica. Não existem estudos no Brasil que possibilitem responder inequivocamente se há ou não reemergência da coqueluche no país. É possível que a doença esteja de fato reemergindo, mas não de forma perceptível, e que continue sub-diagnosticada uma vez que o seu diagnóstico não é rotineiramente feito em pacientes que apresentam doença do trato respiratório superior.

Embora a PCR possa vir a ser um método vantajoso no futuro, a falta de padronização do teste e a sua correlação incerta com a doença limitam a sua utilidade no momento, devendo ser acompanhada da cultura sem substituí-la<sup>2,25</sup>. O isolamento de *B. pertussis* permanece o único método seguro para o diagnóstico da coqueluche, sendo a cultura imprescindível para acompanhar a tendência da doença em diferentes regiões, detectar oportunamente surtos e epidemias, com a adoção de métodos de controle, e monitorar as cepas circulantes, com estudos moleculares e avaliação da sensibilidade a antimicrobianos (por ser a droga de escolha para o tratamento da coqueluche e para a profilaxia de contatos íntimos e familiares, a vigilância da resistência à eritromicina tem papel importante no controle da doença<sup>3</sup>). No entanto, para se aumentar a sensibilidade da cultura é imprescindível a correta definição de casos suspeitos com a coleta cuidadosa de material de nasofaringe. Embora os métodos de coleta e transporte tenham sido padronizados pelo Ministério da Saúde/CVE-SP/IAL desde 2001, é necessário que as equipes de saúde sejam treinadas para a sua correta realização. A mudança freqüente nas equipes de vigilância municipais tem sido um grande entrave neste sentido. Acreditamos que é de extrema importância que estas equipes sejam permanentes e bem treinadas, pois têm papel fundamental no reconhecimento do agravo e correto encaminhamento de amostras para o diagnóstico das doenças de notificação no país.

## REFERÊNCIAS

1. Marcon MJ. *Bordetella*. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, editors. *Manual of Clinical Microbiology* 6<sup>th</sup> ed. Washington, DC: American Society of Microbiology; 1995. p. 566-73.
2. Centers for Disease Control and Prevention. *Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases*. Atkinson W, Hamborsky J, Mc Intyre L, Wolfe S, eds. 10<sup>th</sup> ed. Washington DC: Public Health Foundation; 2007. Chapter 7, p. 81-100.
3. Centers for Disease Control and Prevention. *Manual for the surveillance of vaccine preventable diseases*. 3<sup>rd</sup> ed. Atlanta, GA; 2002. Chapter 8, Pertussis, p. 8-1-17.
4. Divisão de Doenças de Transmissão Respiratória do Centro de Vigilância Epidemiológica do Estado de São Paulo. *Manual de coqueluche - Normas e instruções*; 2000. 20p.
5. Institut Pasteur. Coqueluche. Disponível em: <http://www.pasteur.fr/actu/presse/documentation/coq.htm>
6. Posse CAR; Miceli INP. Evolucion de la coqueluche en la Argentina a finales del siglo XX. *Medicina (Buenos Aires)* 2005;65:7-16.
7. Jenkinson D. Duration of effectiveness of pertussis vaccine: evidence from 10 years community study. *Br Med J* 1988;296:612-4.
8. Institut Pasteur - Communiqué de presse - La coqueluche est toujours là! 26 octobre 2006. Disponível em: <http://www.pasteur.fr/actu/presse/com/communiques/06coqueluche.htm>
9. Carvalho AP, Pereira EMC. Vacina acelarada contra pertussis para adolescentes. *J Pediatr* 2006;82(3 Supl):S15-24.
10. Luz PM, Codeço CT, Werneck GL. A reemergência da coqueluche em países desenvolvidos: um problema também para o Brasil? *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro 2003;19(4):1209-13.
11. Watanabe M, Nakase Y, Aoyama T, Osawa H, Murase Y, Iwata T. Serotype and drug susceptibility of *Bordetella pertussis* isolated in Japan from 1975 to 1984. *Microbiol Immunol* 1986;30(5):491-4.
12. Cherry JD, Grimprel E, Guiso N, Heininger U, Mertsola J. Defining pertussis epidemiology: clinical, microbiologic and serologic perspectives. *Pediatr Infect Dis J* 2005;24(5 Suppl):S25-34.
13. Grimprel E, Guiso N, Bégué P. New aspects of pertussis in France, 26 years after generalized pertussis vaccination. *Biologicals* 1993;21:5-6.
14. Moraga F, Roca J, Mendez C, Rodrigo C, Pineda V, Martinez A, Baraibar R, Boronat M, on behalf of the TOSCA Study Group. Epidemiology and surveillance of pertussis among infants in Catalonia, Spain, during 1997-2001. *Pediatr Infect Dis J* 2005;24(6):510-3.
15. Van Amersfoort SC, Schous LM, Van der Heide HG, Advani A, Hallandes HO, Bonderson K, et al. Analysis of *Bordetella pertussis* populations in European countries with different vaccination policies. *J Clin Microbiol* 2005;43(6):2837-43.
16. Yih WK, Lett SM, des Vignes FN, Carrison KM, Sipe PL, Marchant CD. The increasing incidence of pertussis in Massachusetts adolescents and adults, 1989-1998. *J Infect Dis* 2000;182:1409-16.

17. P Perret C. Vacuna anti-pertussis para uso em adolescentes y adultos. *Rev Chil Infect* 2006;23(3): 257-60.
18. G Cofre J. Coqueluche em adultos y adolescentes. *Rev Chil Infect* 2003;20(Supl 1): S52-8.
19. Gonçalves CR, Vaz TMI, Medeiros MIC, Castro MTF, Rocha MMM, Melles CEA, Irino K. Phenotypical and genotypical characterization of *Bordetella pertussis* strains isolated in São Paulo, Brazil, 1988-2002. *Rev Inst Med trop S Paulo* 2007; 49(2):123-5.
20. Crowcroft NS, Pebody RG. Recent developments in pertussis. *Lancet* 2006; 367 (9526):1926-36.
21. Müller FMC, Hoppe JE, Wirsing von König CH. Laboratory diagnosis of pertussis: State of the art in 1997. *J Clin Microbiol* 1997;35(10):2435-43.
22. Friedman RL. Pertussis: the disease and new diagnostic methods. *Clin Microbiol Rev* 1988;1:365-76.
23. Hoppe JE, Weiss A. Recovery of *Bordetella pertussis* from four kinds of swabs. *Eur J Clin Microbiol* 1987;6:203-5.
24. Douce-Populaire F, Bourgeois N, Charara O, Bellaïche M, Richardin F, Salomon JL, et al. Utilisation en routine de l'amplification génique pour le diagnostic de coqueluche chez l'enfant. *Arch Pediatr* 2002;9(11):1145-52.
25. Sanz Moreno JC, De Ory Manchón F, González Alonso J, de La Torre JL, Salmerón F, Limia A, et al. Diagnóstico de laboratorio de tos ferina. Papel de la serología. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2002;20(5):212-8.
26. Centers for Disease Control and Prevention. National Center for Immunization and Respiratory Disease. Guidelines for the control of pertussis outbreaks. Atlanta, 2000 last modified on February 2006. Chapter 2 - Diagnosis and Laboratory Methods. p. 2-1-15. Disponível em <http://www.cdc.gov/vaccines/pubs/pertussis-guide/guide.htm>
27. Lingappa JR, Lawrence W, West-Keefe S, Gautom R, Cookson BT. Diagnosis of community-acquired pertussis infection: comparison of both culture and fluorescent-antibody assays with PCR detection using electrophoresis or dot blot hybridization. *J Clin Microbiol* 2002;40(8):2908-12.
28. Brasil. Portaria nº 1943 de 18 de outubro de 2001 do Ministério da Saúde. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 24 de outubro de 2001. Seção 1, nº 204, p. 35.
29. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de vigilância epidemiológica 6ª ed. Brasília, DF. Normas e Manuais Técnicos; 2005. 816p.
30. Regan J, Lowe F. Enrichment medium for the isolation of *Bordetella*. *J Clin Microbiol* 1977;6:303-9.
31. Sanden N, Weyant RS. Genus III. *Bordetella*. In: Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT. Ed. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2. New York, Springer, 2005.
32. Senzilet LD, Halperin SA, Spika JS, Alagaratnam M, Morris A, Smith B, and the Sentinel Health Unit Surveillance System Pertussis Working Group. Pertussis is a frequent cause of prolonged cough illness in adults and adolescents. *Clin Infect Dis* 2001;32:1691-7.
33. Jones TC, Gasser M, Erb P, Oechslin H. Cough and fear of sleep: early clinical signs of *Bordetella pertussis* in an adult. *The Brazilian J Infect Dis* 2004;8(4):324-7.

# Riboflavin deficiency in pregnant women in a public institution of São Paulo city, SP, Brazil

## Avaliação da deficiência de riboflavina em gestantes de uma instituição pública da cidade de São Paulo, SP, Brasil

RIALA6/1129

Marilena OSHIRO<sup>1\*</sup>, Karen MIGUITA<sup>1</sup>, Raimundo Antônio Gomes OLIVEIRA<sup>2</sup>, Lorena Kessia de Figueiredo Silva FONSECA<sup>3</sup>, Orlando César de Oliveira BARRETTO<sup>4</sup>

\*Endereço para correspondência: Seção de Hematologia, Divisão de Patologia. Instituto Adolfo Lutz Av. Dr. Arnaldo 351, 7º andar, CEP 01246-902, São Paulo –SP. E-mail: [maoshiro@ial.sp.gov.br](mailto:maoshiro@ial.sp.gov.br)

<sup>1</sup>Seção de Hematologia – Divisão de Patologia – Instituto Adolfo Lutz

<sup>2</sup>Universidade Federal do Maranhão – São Luis- MA

<sup>3</sup>Pós-graduanda da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo

<sup>4</sup>Instituto de Psiquiatria do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Recebido: 22/12/2006 – Aceito para publicação: 24/08/2007

### ABSTRACT

In a prospective study, the riboflavin nutritional status was evaluated in pregnant women to whom varied vitamin doses were given and in women who did not receive any vitamin supplementation during gestation. Riboflavin nutritional determination was assessed by means of glutathione reductase activation coefficient (GR-AC), and the value higher than 1.5 was considered as indicative of riboflavin deficiency. The pregnant women were divided into four groups: 123 pregnant women to whom any vitamin supplementation were not given, 25 who daily received 2.5 to 3.5mg of riboflavin, 53 who were daily supplemented with 1.0 to 1.7mg of riboflavin, and 22 to whom were daily given <0.85mg of riboflavin. The women group daily supplemented with 2.5 to 3.5mg riboflavin showed the lowest riboflavin deficiency, and the other groups (64.5%) presented vitamin deficiency with GR-AC higher than 1.5. These data suggest that the vitamin concentrations found in the commercially available vitamin supplemented – preparations, as well as those found in ingested food were insufficient to provide a good nutritional status for pregnant women. These findings strongly suggest that riboflavin deficiency has in fact been a relevant public health problem in São Paulo city.

**Key words.** Riboflavin malnutrition, riboflavin deficiency, pregnant women, glutathione reductase

### RESUMO

Neste estudo prospectivo foi avaliado o estado nutricional em riboflavina nas parturientes que faziam uso da suplementação vitamínica de variadas concentrações de riboflavina, bem como naquelas que não fizeram uso de qualquer suplementação durante o período gestacional. O recurso utilizado para a avaliação nutricional foi a determinação do coeficiente de ativação da glutathione reductase (CA-GRE). Os valores de CA-GRE acima de 1,5 foram considerados como indicativos de deficiência de riboflavina. Foram analisados quatro grupos de gestantes: 123 parturientes sem suplementação vitamínica; 25 que utilizaram formulação contendo de 2,5 a 3,5mg de riboflavina; 63 parturientes que utilizaram fármacos contendo 1,0 a 1,7mg de riboflavina e o quarto grupo constituído de 22 mulheres que receberam formulação contendo < 0,85mg de riboflavina. O grupo de parturientes que apresentou menor índice de deficiência de riboflavina foi aquele que fez o uso da suplementação vitamínica com as taxas entre 2,5 a 3,5mg de vitamina B<sub>2</sub>. Os demais grupos, com a inclusão daquele que não complementou a dieta com suplementação vitamínica, apresentaram índices de deficiências bem maiores. Esses achados indicam que as quantidades de riboflavina apresentadas nesses fármacos, bem como na dieta alimentar, foram insuficientes para atingir níveis bioquímicos semelhantes ao do grupo controle. No geral, foi encontrada uma incidência de deficiência de riboflavina de 64,4%, o que permite sugerir que a arriboflavinose é um importante problema de Saúde Pública na cidade de São Paulo.

**Palavras-chave.** desnutrição, Riboflavina, gestantes, deficiência, glutathione reductase.

## INTRODUCTION

Riboflavin or vitamin B<sub>2</sub> deficiency during gestational period has been reported to induce some disturbances as anemia and pre-eclampsia, and is also related to the newborn birthweight<sup>1,2,3</sup>.

It is very important in several metabolic pathways and its daily need during gestation increases about 27 % when compared with non pregnant women<sup>4</sup>, due to increased maternal and foetal tissue synthesis and increase in energy requirement<sup>5</sup>.

Riboflavin deficiency during gestation has been reported in several countries<sup>1,2,6,7,8</sup> and a plenty of causes may trigger it, as mal nutrition, mal absorption, hemodilution and increasing foetal needs along the pregnancy<sup>2</sup>. However, the most important factor responsible for the maternal deficiency is a poor diet in nutrients, which has been treated by vitamin supplementation, and better intake of food rich in riboflavin as milk, cheese, meat, liver, cereals, eggs and fresh vegetables<sup>8</sup>.

In order to assess the nutritional status in riboflavin, the degree of activation of erythrocyte glutathione reductase (E-GR) by its coenzyme flavin adenine dinucleotide (FAD) has been employed. Riboflavin is a FAD precursor, and FAD concentration depends directly of riboflavin intake<sup>9</sup>. That being so, initially E-GR is assayed without any FAD addition, what gives the basal activity; when FAD is added to the reagent system, the more activation is obtained the more it is deficient in riboflavin. Aiming to assess the riboflavin deficiency, an activation coefficient (AC) has been designed (AC), calculated by the reason E-GR activity with FAD and E-GR without FAD<sup>10</sup>. The greater the figures obtained, the greater is the deficiency.

Riboflavin deficiency in Brazil has been scarcely ascertained, and in seventies Wilson et al.<sup>11</sup> reported clinical signs of deficiency in 31% of a population, and Barretto et al.<sup>12</sup> reported that 81% of pregnant women were found to be deficient through AC determination.

Riboflavin deficiency has also been related to cancer<sup>14,15,16</sup>, homocysteinemia<sup>13,17</sup>, postpartum depression<sup>18</sup>, and anaemia<sup>19,20</sup>. This present prospective survey has been designed to investigate the nutritional status in pregnant women who were being supplemented with several concentrations of riboflavin and in another group who was not receiving any vitamin supplementation.

## CASUISTICS AND METHODS

A total of 233 pregnant women who looked for a public hospital at labour was investigated. They were 27 ± 6 years old and the gestation was between 35 and 41 weeks.

The women were grouped in the following categories:

- Group A – 25 pregnant women who were taking 2.5 to 3.5 mg riboflavin daily
- Group B- 63 pregnant women who were taking 1.0 to 1.7 mg riboflavin daily

- Group C- 22 pregnant women who were taking < 0.85 mg riboflavin daily
- Group D – 123 pregnant women who were not taking vitamins at all
- A group of 34 non pregnant women ranging from 23 to 48 years old who were not supplemented with vitamins but were fed regularly with meat, milk, cereals and fresh vegetables was taken a control.

The pregnant women were attended at Hospital e Maternidade Leonor Mendes de Barros, a public hospital set at East side of São Paulo city, state of São Paulo, Brazil. Blood was drawn by venous puncture and collected 3:1 in ACD (citric acid, citrate and dextrose) before delivery and kept at 4° C for enzyme assays up to 4 days after drawing.

Blood was centrifuged a 1000 g at 4° C for 10 minutes, the plasma was discarded, and the red cells were washed with saline three times at 1000 g at 4° C. The buffy coat was discarded in order to avoid leucocytes contamination. The packed red cells were lysed 1:20 with hemolysing solution {0.7µM 2-mercaptoethanol, 2µM nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP), 2.7µM ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) pH 7.0}, submitted to freeze and thawing 3 times and centrifuged at 10000g at 4°C for 20 minutes, and the supernatant was employed for enzyme assay .

Glutathione reductase activity at 38°C per minute with and without FAD was assayed according to Beutler<sup>21</sup>, by the glutathione (GSH) oxidation to oxidized glutathione (GSSG), observed by nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP) reduction to NADPH at 340 nm. The activity coefficient (AC) is obtained the following formula:

$$AC = \frac{\text{E-GR activity with FAD}}{\text{E-GR activity without FAD}}$$

The non-parametric Mann-Whitney statistical method was utilized, with a significance level of 5%.

## RESULTS

Table 1 depicts the AC means obtained in the studied groups compared to the control group. This figure was obtained with a control group of non pregnant civil servants of the laboratory who were not taking any vitamin supplementation but were fed with milk, meat, cereals and fresh vegetables. This procedure was necessary as there is a fair diversity of figures in the literature, with thresholds which varies from figures indicating deficiency higher than 1.7<sup>22</sup>, 1.5<sup>23</sup>, 1.4<sup>6</sup>, 1.3<sup>2,8,12</sup> to 1.2<sup>24</sup>. According to our findings, which disclosed a mean value of AC as 1.5 in the control group, we considered deficient the individuals who presented figures higher than AC 1.5 for analyzing the data obtained in studying the pregnant women.

Table 2 shows the frequency of riboflavin deficiency taking AC>1.5 as indicative of deficiency.

**Table 1.** Glutathione reductase activation coefficient (GR-AC) means in the studied groups and comparison with the control group.

	Control group	Pregnant women who were given riboflavin supplementation			Group with no supplementation
		Group A 2.5 - 3.5 mg	Group B 1.7 - 1.0 mg	Group C < 0.85mg	
n	34	25	63	22	123
AC	1.5 ± 0.14	1.49 ± 0.32	1.71 ± 0.49	1.79 ± 0.55	1.76 ± 0.46
p-value		0.841	0.018*	0.004*	0.001*

\*significant p<0,05.

**Table 2.** Glutathione reductase activation coefficient (GR-AC) frequency among the studied groups.

Pregnant women	n	GR-AC < 1,5	GR-AC ≥ 1,5
Group A (2.5 – 3.5mg)	25	16 (64%)	9 (36%)
Group B (1.7 – 1.0 mg)	63	21 (33.3%)	42 (66.7%)
Group C (< 0.85 mg)	22	6 (27.3%)	16 (72.7%)
Total (with supplementation)	110	43 (39.1%)	67 (60.9%)
Group D (no supplementation)	123	40 (32.5%)	83 (67.5%)

## DISCUSSION AND CONCLUSION

In general terms, the lesser is the vitamin concentration in the vitamins supplementation, the greater are the ACs, showing that the degree of GR activation depends on the riboflavin doses. In a matter of fact, the riboflavin supplementation given to groups B and C was insufficient to show the same AC of the control group.

On the other hand, the Table 2 shows that group A who was given 2.5 to 3.5mg exhibited AC similar to the control group, what suggests that this daily supplementation was enough to afford good nutritional status in terms of vitamin B<sub>2</sub> for 64% of this group, but was not sufficient to provide it for 36% . This lack of good response to these doses may be accounted for biological variation among the individuals, to low adherence to the treatment.

However it was occasionally found AC <1.5 in members of groups B, C and D, possibly due to a good intake of food rich in vegetables, milk not reported in the query, due to misunderstanding of low educational level of some women.

The Brazilian Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) adopted the Food and Nutrition Board of the National Research Council from United States of 1.6 mg recommendation for daily riboflavin need, but recently the ANVISA published the RDC no. 269/2005<sup>25</sup> in which there is a recommendation of 1.4mg riboflavin daily (Ingestão Mínima Recomendada–IDR) for pregnant women in Brazil.

As the higher deficiency rates were found in the women who were taking less than 1.7 mg (groups C and D), it is reasonable to suggest that the IDR proposed by ANVISA is not enough to protect the Brazilian pregnant women from vitamin deficiency , as many authors have found 1.6mg daily insufficient<sup>7</sup> . In our country Barretto et al.<sup>12</sup> have already reported that even when were given 3 mg daily for pregnant women along the gestational period an expressive percentage of pregnant women still presented ACs smaller than 1.3, the used lower threshold. It is possible that these figures could be different whether these authors would have used AC of 1.5 instead of 1.3, but the data herein presented agree with their findings, as the only group which presented better figures was that who were given 2.5 to 3.5mg daily. In this report 64.4 %

out the 233 investigated pregnant women presented  $AC > 1.5$ , what indicates a high riboflavin deficiency rate, a similar figure found in Mexico<sup>8</sup> but higher than in Phillipines<sup>7</sup> and Thailand<sup>26</sup>, Italy<sup>27</sup>, Spain<sup>2</sup>, Nepal<sup>6, 28</sup> and Zimbabwe<sup>1</sup>.

The riboflavin deficiency may be due to poor intake of food rich in this vitamin. Velásquez-Meléndez et al.<sup>29</sup> studied the intake of some micronutrients, among them the riboflavin in a community of the metropolitan area of São Paulo city, and among other deficiencies the riboflavin was found to be 1.1mg daily among non pregnant women ranging from 20 to 39 years old, approximately 21% less than the 1.4mg recommended by ANVISA<sup>25</sup>.

In this study the 43 % of pregnant women were not participating of any prenatal assistencial program, a very high rate which did not agree with Ministerio da Saude data reports, between 1995 and 2002 the rate of women who did not receive prenatal medical assistance decreased from 10,73% to 3,77%<sup>30</sup>.

It is well known that maternal and foetal deaths are related to gestation period and labour complications which may be avoided by a careful and efficient pre-natal program<sup>31</sup>. In Rio Grande do Sul state 42% of deaths by complications during the gestation or by the delivery were observed in women who did not have prenatal medical care<sup>32</sup>.

Some surveys have found correlation between poverty and lack of prenatal care, although other factors as maternal school level may also influence the enrolment of pregnant women to prenatal medical care<sup>31,33</sup>.

These factors, poverty and school level, might account for the high rates of prenatal care lack in this study, as most of the population herein presented were poor and even street (dwellers) lodgers.

Although the Programa de Humanização do Pré-Natal e Nascimento do Ministério da Saúde in Brasil has been settled since 2000, low governmental attention on prenatal care, delivery, puerperium as well as to newborn may account for the high rates of neonatal and maternal mortality<sup>30</sup>.

Taking the data obtained in this survey, it is possible to suggest that most of the pregnant women presented riboflavin deficiency, based on the minimum AC of 1.5 to define this deficiency. A minimum of 2.5 to 3.5mg daily riboflavin may be acceptable to give enough protection in terms of riboflavin nutrition, although higher dosages may be also indicated. It is very sad however that a very high rate of women did not receive prenatal medical care.

In conclusion, it must be pointed out that the maternal nutritional status is fundamental for herself as well as for the foetus, and that the prenatal medical care since the conception is essential to provide them a good health.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Dr. Corintio Mariani Neto from the Hospital Leonor Mendes de Barros, for having allowed this research in the hospital.

#### REFERENCES

1. Wacker J, Fruhauf J, Schulz M, Chiwora FM, Volz J, Becker K. Riboflavin deficiency and Preeclampsia. *Obstet Gynecol* 2000; 96(1): 38-44.
2. Sánchez DJ, Murphy MM, Bosch-sabater J, Fernández-Ballart J. Enzymic evaluation of thiamin, riboflavin and pyridoxine status of parturient mothers and their newborn infants in a Mediterranean area of Spain. *Eur J Clin Nutr* 1999; 53: 27-38.
3. Badart-Smook A, van Houwelingen AC, Al MD, Kester AD, Hornstra G. Fetal growth is associated positively with maternal intake of riboflavin and negatively with maternal intake of linoleic acid. *J Am Diet Assoc* 1997; 97(8):867-70.
4. Ribeiro LC, Devincenzi MU, Garcia JN, Sigulem DM. *Nutrição e Alimentação na Gestação*. Planejamento Editorial:Escola Paulista de Medicina; 2001. Disponível em: URL: [http://www.pnut.epm.br/Download\\_Files/CompactaNutGest.pdf](http://www.pnut.epm.br/Download_Files/CompactaNutGest.pdf)
5. Ladipo OA. Nutrition in pregnancy: mineral and vitamin supplements. *Am J Clin Nutr* 2000; 72:280S-90S.
6. Graham JM, person JM, Haskell MJ, Shrestha RK, Brown KH, Allen LH. Erythrocyte riboflavin for the detection of riboflavin deficiency in pregnant Nepali women. *Clin Chem* 2005; 51:2162-65.
7. Kuizon MD, Madriagà JR, Perlas LA, Avena EM, Marcos JM, Desnacido, JA, Fuertes RT, Macapinlac M. Riboflavin requirements of Filipino children and non-pregnant, pregnant and lactating women: Studied by the erythrocyte glutathione reductase activation test. *Asia Pacific J Clin Nutr* 1998; 7(1):41-8.
8. Tovar AR, Torres N, Halhali A, Bourges H. Riboflavin and pyridoxine status in a group of pregnancy mexican women. *Arch Med Res* 1996; 27(2):195-200.
9. Mandula B, Beutler, E. Synthesis of riboflavin nucleotides by mature human erythrocytes. *Blood* 1970; 36(4):491-9.
10. Beutler E. Effect of flavin compounds on glutathione reductase activity: in vivo and vitro studies. *J Clin Invest* 1969; 48:1957-66.
11. Wilson D, Roncada MJ, Martins IS, Villalba FO, Baldo HAPC, Gandra YR. Estudo da riboflavina: exames bioquímico e clínico em comunidades do Estado de São Paulo, Brasil. *Ver Saúde Públ* 1977; 11:13-26.
12. Barreto OCO, Nonoyama K, Martins JAP, Behle I, Zugaib M. Glutathione reductase eritrocitária no par materno-fetal. *Gin Obst Bras* 1980; 3(2): 445-65.
13. Powers HJ. Interaction among Folate, Riboflavin, Genotype, and Cancer, with reference to colorectal and cervical cancer. *J Nutr* 2005; 135: 2960S-66S.
14. Siassi F, Ghadirian P. Riboflavin deficiency and esophageal cancer: a case control-household study in the

- Caspian Littoral of Iran. *Cancer Detect Prev* 2005; 29(5): 464-9.
15. Hernandez BY, McDuffie K, Wilkens LR, Kamemoto L, Goodman MT. *Cancer Causes Control* 2003; 14(9): 859-70.
  16. Pangrekar J, Krishnaswamy K, Jagadeesan V. Effects of riboflavin deficiency and riboflavin administration on carcinogen-DNA binding. *Food Chem Toxicol* 1993; 31(10): 745-50.
  17. Allen LH. Multiple micronutrients in pregnancy and lactation: an overview. *Am J Clin Nutr* 2005; 81(5): 1206S-1212S.
  18. Miyake Y et al. Dietary folate and vitamins B12, B6, and B2 intake and the risk of postpartum depression in Japan: The Osaka Maternal and Child Health Study. *J Affect Disord*. No prelo 2006.
  19. Fishman SM, Christian P, West Jr KP. The role of vitamin in the prevention and control of anaemia. *Public Health Nutr* 2000; 3(2):125-150.
  20. Suprpto B, Widodo, Suhanantyo. Effect of low-dosage vitamin A and riboflavin on iron-folate supplementation in anaemia pregnant women. *Asia Pacific J Clin Nutr* 2002; 11(4): 263-267.
  21. Beutler E. Red cell metabolism – A manual of biochemical methods. 3<sup>rd</sup> ed. Orlando, San Diego, New York, London: Grune & Stratton; 1984.
  22. Blanck HM, Bowman BA, Serdula MK, Khan LK, Kohn W, Woodruff BA. Angular stomatitis and riboflavin status among adolescent Bhutanese refugees living in southeastern Nepal. *Am J Clin Nutr* 2002; 76: 430-5.
  23. Bayoumi RA, Rosalki SB. Evaluation of methods of coenzyme activation of erythrocyte enzyme for detection of deficiency of vitamins B1, B2 and B6. *Clin Chem* 1976; 22(3):327-335.
  24. Toh SY, Thompson GW, Basu TK. Riboflavin status of the elderly: dietary intake and FAD-stimulating effect on erythrocyte glutathione reductase coefficients. *Euro J Clin Nutr* 1994; 48:654-59.
  25. Resolução RDC nº 269, de 22 de setembro de 2005. Aprova o Regulamento Técnico sobre a Ingestão Diária Recomendada de Proteína, Vitaminas e Minerais. ANVISA.
  26. Vudhivai N et al. Vitamin B1, B2 and B6 in relation to anthropometry, hemoglobin and albumin of newborns and their mothers from Northeast Thailand. *Int J Vitam Nutr Res* 1989; 60:75-80.
  27. Fidanza AA, Simonetti MS, Cucchia LM. A nutrition study involving a group of pregnant women in Assis, Italy. *Int j Vitam Nutr Res* 1986; 56(4):381-6.
  28. Jiang T, Christian P, Khatry SK, Wu L, West Jr KP. Micronutrient deficiencies in early pregnancy are common, concurrent, and vary by season among rural Nepali pregnant women. *J Nutr* 2005; 135(5):1106-12.
  29. Velásquez-Meléndez G, Martins IS, Cervato AM, Fornés NS, Marucci MFN. Consumo alimentar de vitaminas e minerais em adultos residentes em área metropolitana de São Paulo, Brasil. *Rev Saúde Pública* 1997; 31(2):157-62.
  30. UNICEF. Situação da Infância Brasileira 2006. Brasília: UNICEF; 2005.
  31. Trevisan MR, De Lorenzi DRS, Araújo NM, Ésber K. Perfil da assistência pré-natal entre usuárias do Sistema Único de Saúde em Caxias do Sul. *Ver Bras Ginecol Obstret* 2002; 24(5):293-99.
  32. Ramos JGL, Martins-Costa S, Vettorazzi-Stucznski J, Brietzle E. Morte materna em Hospital Terciário do Rio Grande do Sul-Brasil: um estudo de 20 anos. *Ver Bras Ginecol Obstret* 2003; 25(6):431-6.
  33. Serruya SJ, Lago TG, Cecatti JG. O panorama da atenção pré-natal no Brasil e o Programa de Humanização do Pré-Natal e Nascimento. *Ver Bras Saúde Matern Infant* 2004; 4(3):269-79.

# Avaliação das condições higiênico-sanitárias do pescado beneficiado em indústrias paraenses e aspectos relativos à exposição para consumo em Belém, Pará.

---

Farias, MCA. **Evaluation of hygienic and sanitary quality of fish processed at industries in Northern Brazil and some aspects of the exposition for selling in Belém city, Brazil.** Belém/PA 2006. [Dissertação de Mestrado – Área de Concentração Ciência Animal - Programa de Pós-Graduação do Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal do Pará]. Orientador: José de Arimatéa Freitas.

---

Peixes, moluscos e crustáceos são alimentos de fácil digestibilidade e elevado valor biológico e matéria-prima destinada ao beneficiamento e elaboração de derivados e sub-produtos. Como alimento e matéria-prima para a indústria, necessitam de adequados procedimentos tecnológicos para manutenção de estabilidade físico-química, sensorial e microbiológica. O pescado pode ser veiculador de patógenos, necessitando também de adequados métodos analíticos que comprovem sua inocuidade como alimento. O estado do Pará é um importante produtor de pescado, beneficia peixes, moluscos e crustáceos em inúmeras indústrias localizadas em seu território e destina a produção ao mercado interno e externo. Com o objetivo de avaliar a qualidade físico-química e microbiológica do pescado beneficiado em indústrias paraenses sob inspeção federal, foi realizado um estudo retrospectivo abrangendo nove meses do período de maio de 2005 a janeiro de 2006 com base nos resultados de análises realizadas segundo métodos analíticos oficiais, levantados em 20 indústrias e relativos a 133 amostras (51 de peixe eviscerado congelado, 54 de filé de peixe congelado, nove de peixe em posta congelado, duas de peixe inteiro congelado, quatro de peixe eviscerado fresco, três de caudas de lagosta congeladas e dez de camarão sem cabeça congelado); avaliadas as condições de exposição e comercialização de 121 amostras de peixe em nove lojas de quatro redes de supermercado; e as condições de exposição e comercialização de 179 amostras de peixe em nove locais (seis mercados e três feiras-livre). Os resultados demonstraram que em elevados percentuais nas análises físico-químicas (determinação de pH, provas de reação de amônia e gás sulfídrico e bases voláteis totais), sensoriais e de verificação de temperatura e microbiológicas (contagem de *Staphylococcus aureus*, NMP de *Vibrio parahaemolyticus*, contagem de coliformes fecais e pesquisa de *Salmonella*), o pescado beneficiado sob inspeção federal foi classificado como de elevada qualidade higiênica e sanitária, revelou ausência de *Salmonella* spp e *Vibrio parahaemolyticus* e resultado dentro do limite estabelecido para bases voláteis totais em todas as amostras analisadas. Os limites estabelecidos para a contagem de coliformes fecais, ainda que em muito baixo percentual, foram ultrapassados em peixe eviscerado congelado, filé de peixe congelado e peixe inteiro congelado, o que indicou para os referidos produtos provável contaminação fecal da água nos ambientes de captura ou indústrias. A ocorrência de *Staphylococcus aureus* em peixe eviscerado congelado e filé de peixe congelado, ainda que também em baixo percentual, indicou provável contaminação cruzada ou manipulação inadequada. Nas provas de cocção, reação de amônia e gás sulfídrico foram ultrapassados os limites em amostras de peixe inteiro congelado. Na exposição para comercialização, os supermercados foram os estabelecimentos que apresentaram adequado índice de conformidade com a legislação pertinente e os mercados e feiras-livre aqueles com maior inadequação aos parâmetros recomendados. O pescado beneficiado em indústrias paraenses sob inspeção federal apresentou elevada qualidade sanitária, em decorrência dos resultados determinados nas análises realizadas. Medidas e ações de vigilância sanitária são necessárias para eliminar as distorções observadas em canais de comercialização como mercados e feiras-livre.

Dissertação disponível na Biblioteca na Universidade Federal do Pará  
E-mail: mariado@click21.com.br

# Monitoramento vetorial e do vírus Dengue, Belo Horizonte, Minas Gerais

---

Avendanha, JS. **Vectorial and Dengue virus monitoring, Belo Horizonte, Minas Gerais.** Belo Horizonte, MG 2006 [Dissertação de Mestrado. Área de Concentração: Epidemiologia - Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária - UFMG]. Orientador: Jenner Karlisson Pimenta dos Reis

---

O vírus dengue, agente da febre do dengue, depende do vetor *Aedes aegypti* para completar seu ciclo clássico homem – vetor – homem. Epidemias de dengue estão associadas a elevadas taxas de infestação pelo vetor, cujo controle é a principal forma de prevenção. O objetivo deste estudo foi avaliar o monitoramento vetorial e o viral por meio dos ovos de *Aedes aegypti* coletados, como ferramentas auxiliares no combate ao mosquito, no controle e na prevenção de epidemias por dengue. Na Pampulha, território monitorado, 205 ovitrampas foram instaladas e, no período compreendido entre a 28ª semana epidemiológica de 2001 e a 27ª de 2005, foram inspecionadas semanalmente para manutenção, coleta de ovos para contagem e eventual especificação. Os três índices obtidos: Índice de Positividade de Ovitrampas (IPO), Índice de Densidade Vetorial (IDV) e Índice de Densidade de Ovos (IDO) foram pareados com as notificações de casos de dengue e analisados em gráficos por séries temporais, o que possibilitou a identificação dos níveis de infestação vetorial associados ao favorecimento da circulação viral. Os índices sugeridos como limite entre situações de risco e controle foram, respectivamente, 40 para IDV e 60 para IPO e IDO. O monitoramento viral, resultante da pesquisa de larvas infectadas, não detectou circulação viral nos vetores amostrados, resultado coerente com os poucos casos de dengue confirmados no período. A associação observada entre os níveis de infestação vetorial e circulação viral confirma esse monitoramento como importante ferramenta de vigilância, pela capacidade demonstrada em indicar risco de epidemia. O acompanhamento contínuo dos níveis de infestação vetorial juntamente com a possibilidade de monitorar a circulação viral através de pesquisa viral nas larvas obtidas dos ovos coletados justificam a implantação e a manutenção desse tipo de monitoramento.

Dissertação disponível na Escola de Veterinária da UFMG  
E-mail: jeravendanha@yahoo.com.br

# Survey of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies by modified agglutination test in chickens slaughtered for consumption in Belém city, Northern Brazil

---

Barbosa, SAA. **Pesquisa de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* pelo teste de aglutinação modificado em soros de frango de corte abatidos para consumo em Belém-Pará, Brasil**, Belém/PA 2007. [Dissertação de Mestrado - Área de Concentração Ciência Animal - Programa de Pós Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Pará, Belém-Pará, Brasil]. Orientador: José de Arimatéa Freitas.

---

The toxoplasmosis is a zoonotic disease caused by the obligatory intracellular parasitic protozoa *Toxoplasma gondii*, that affects the man and domestic animals all over the world. *T. gondii* infects mammals and birds and has the felidae as its definitive host. *T. gondii* infection in birds can be asymptomatic, the most probable form of contamination through the ingestion of oocysts from soil, polluted water and contaminated animals rations. Chicken's meat is the one of the main transmission roads for man. Because serologic diagnostic currently methods of the disease are laborious, hazard or costly the modified agglutination test (MAT) is being employed as a simply and efficient alternative diagnosis method in birds and other animals. With the objective of surveying the occurrence of anti-*T. gondii* antibodies in cut chickens abated for consumption in the metropolitan area of Belém city, 300 serum samples coming from industrial and clandestine slaughtering, were submitted to MAT. Anti-*T. gondii* antibodies were detected in one (1/300, 0,33%) sample coming from clandestine abattoir and none from industrial slaughter house. Although the chicken's meat coming from industrial slaughter house apparently wouldn't offer risk for human contamination by *T. gondii* through ingestion, the adoption of the serologic research is recommended in any type of slaughtering and in the consumption level, as a preventive measure against human risk. Further studies are necessary to determine the importance of free chickens breeding as a step in the epidemiology of the toxoplasmosis in regional environment.

Dissertação disponível na Biblioteca na Universidade Federal do Pará  
E-mail: correnet@ig.com.br

# Methodological optimization for determination of benzo(a)pyrene in cachaças by HPLC with fluorescence detection and evaluation of its occurrence

---

Caruso, MSF. **Otimização de metodologia para determinação de benzo(a)pireno em cachaças por CLAE com detecção de fluorescência e avaliação de sua ocorrência.** São Paulo-SP 2007. [Dissertação de Mestrado – Área de Concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública - Programa de Pós-Graduação da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo] Orientadora: Janete Alaburda.

---

The objectives of the present study were to compare, to adapt and to validate analytical methodology for identification, and quantification of benzo(a)pyrene (BaP) in cachaça samples by HPLC-DFI and confirmation by GC/MS; also, to evaluate the BaP levels in cachaças commercialized in São Paulo's market, and to verify which stages of one production of still cachaça could contribute for BaP contamination. Three distinct methods for BaP extraction were studied: solid phase extraction (SFE), liquid-liquid extraction with cyclohexane (LLE-CHX) and liquid-liquid extraction with N,N-dimethylformamide and cyclohexane (LLE-DMF/CHX). SFE extraction used a C18 cartridge in silica base (500mg, 6 mL) and cyclohexane, while the LLE consisted on sample partition in appropriate solvent and purification by column chromatography on silica gel. The extracts obtained from all extractions were evaporated to dryness, reconstituted in acetonitrile and analyzed by HPLC-DFI. Chromatography separation was carried out on a column C18 (25 cm; 0.45  $\mu$ m; 4.6 mm) using acetonitrile/water (70:30) as mobile phase at a flow rate of 1 mL/min. The response of fluorescence detector was linear for BaP standard solutions ranging from 0.05 to 30 ppb ( $R^2=0.9995$ ). The detection and quantification limits were 0.03 ppb and 0.1 ppb for all methods. Recoveries values at 3 concentration levels (0.1, 1.0, 3.0 ppb) ( $n=3$ ) ranged from 82.9 to 97.0%. The averages of repeatability tests were 0.18 ppb (CV=1.7%) for SFE, 0.15 ppb (CV=2.7%) for LLE-CHX, and 0.18 ppb (CV=2.2%) for LLE-DMF/CHX. All the results were satisfactory, although the SFE presented advantages over LLE: reduced time of analysis, minor use of solvent, residue discarding and analyst exposition, besides lower cost. In the study of the cachaça processing, on the other hand, samples of sugar cane, broth, wine and recently distilled sugar cane spirit were analyzed by LLE-DMF/CHX. The BaP contents in all samples were below detection limit. In this study, 51 brands of cachaça were analyzed for the presence of BaP using SFE. BaP was detected in 27 (53%) analyzed samples, ranging from not detected (LOD, 0.01  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) to 0.86  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Due to BaP carcinogenic and genotoxic potential, these data will subsidy Brazilian authorities in the establishment of BaP maximum limit in cachaças. The strength and contents of methanol and congeners were also determined. Out of 51 samples analyzed, 16% presented strength below the specification (minimum 38%, in volume); 47% contained acetaldehyde above 30mg/100 mL AA, and, in 12%, the higher alcohols concentrations were above 360 mg/100mLAA; all methanol results stood below 20 mg/100mLAA. The drink attainment of superior quality can extend commercial borders and increase Brazilian exportations, generating more capital and jobs.

Dissertação disponível na Biblioteca do Instituto Adolfo Lutz – SP  
Email: micaruso@ial.sp.gov.br

## Caracteres epidemiológicos clínicos e laboratoriais das Estafilococcias em Manaus – AM

---

Carvalho, MAN. **Epidemiologic, clinical and laboratorial characteres of Stafilococcus in Manaus-AM**, AM 2006. [Dissertação de Mestrado – Área de Diagnóstico e Controle de Doenças Faculdade de Ciências da Saúde de Manaus – AM] Orientador : Spartaco Astolfi Filho.

---

O *S. aureus* é um desafio na prática médica, por seu poder de desenvolver resistência aos antibióticos. Descrever a doença e seu agente patogênico na Amazônia se fez necessário devido à gravidade de formas clínicas existentes e um alto grau de resistência entre as cepas. O trabalho identificou 55 pacientes com cultura positiva para *S. aureus* no laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário Getúlio Vargas (HUGV) em um período de 6 meses, no universo de 847 culturas. E através de um estudo prospectivo observacional descreveu as características epidemiológicas, clínicas e laboratoriais desses pacientes, fazendo uma análise comparativa entre os pacientes com *S. aureus* comunitário e *S. aureus* hospitalar. Esse trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas, número 018/2005. E nele, observaram-se os seguintes resultados: maior incidência nos homens 60%, caucasianos 58,2%. Identificou-se 39 pacientes com *S. aureus* hospitalar e 16 com *S. aureus* comunitário. A infecção mais frequente pelo *S. aureus* hospitalar foi a de pele 30,8% e pelo comunitário foi à respiratória 50,0%. O antibiograma mostrou alta resistência aos antibióticos beta-lactâmicos 94,5%, nos dois grupos, e maior incidência 61,5% de *S. aureus* metilicina-resistentes (MRSA) nos pacientes com *S. aureus* hospitalar. Não houve resistência a vancomicina. As infecções por *S. aureus* hospitalar 70,9%, foram mais frequentes que as infecções pelo comunitário 29,1%, com alta incidência de MRSA 61,5%, nos pacientes internados na Unidade de Tratamento Intensivo, 70,5%. Dos 55 pacientes estudados, 9 (16,4%) foram a óbito, todos, por infecção hospitalar, (p-valor < 0,05).

Dissertação disponível na Biblioteca da  
Universidade Federal do Amazonas  
e-mail: auxiliadoraneves@ufam.edu.br

# **Avaliação das expressões imunocitoquímicas das proteínas p16<sup>INK4a</sup> e Ki-67 em esfregaços cérvico-vaginais colhidos em base líquida, com diagnóstico citológico negativo e ASC-US, com Captura Híbrida 2 e/ou PCR positivos para HPV de alto risco**

---

Namiyama,GM. **Assessment of immunocytochemistry of p16<sup>INK4a</sup> and Ki-67 protein in liquid based cervical smears, with negative and ASC-US diagnosis, with high risk HPV positive in Hybrid Capture 2 and/or PCR.** São Paulo, 2007 [Dissertação de mestrado – Programa de Pós-Graduação da Coordenadoria de Controle de Doenças – SES]. Área de Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública. Orientador: Adhemar Longatto Filho.

---

A expressão do oncogene E7 do HPV de alto risco é um dos responsáveis pela carcinogênese cervical, através da sua interferência sobre a via Cdk-Rb-E2F resultando na progressão do ciclo celular anormal e superexpressão das proteínas p16 e Ki-67. O objetivo deste estudo descritivo foi avaliar, em estudo de corte transversal, a positividade das expressões imunocitoquímicas das proteínas p16 e Ki-67 e sua distribuição celular, nas 199 amostras citológicas de base líquida (CBL) de casos com diagnóstico negativo e ASC-US com testes de HPV de alto risco positivo determinados em pelo menos um dos métodos de PCR e/ou HC2. Através da técnica imunocitoquímica, a expressão positiva da proteína p16 foi observada no citoplasma e núcleo enquanto que a proteína Ki-67 foi apenas nuclear, quando comparada aos seus respectivos controles positivos. A proteína p16 foi positiva em 71/101 amostras de citologia negativa e em 12/16 amostras ASC-US, ambas associadas aos testes de HC2 e/ou PCR positivos para HPV de alto risco. A proteína Ki-67 foi positiva em 76/101 amostras de citologia negativa e em 12/16 amostras ASC-US, ambas também associadas aos testes de HC2 e/ou PCR positivos para HPV de alto risco. A proporção de positividade de Ki-67 aumentou em paralelo com o aumento do grau da positividade de p16 ( $p < 0,001$ ). A expressão da proteína p16 e proteína Ki-67 em amostras citológicas cérvico-vaginais colhidas em meio líquido, com HC2 e/ou PCR positivos para HPV de alto risco em casos com diagnóstico citológico negativo ou ASCUS detectou precocemente a presença de DNA-HPV através da imuno-expressão destas proteínas. Concluímos que estes resultados poderão ser utilizados em estratégias de programas de prevenção, e monitorar com eficiência e efetividade pacientes que poderão desenvolver lesões mais graves, através da detecção precoce das alterações do mecanismo de controle do ciclo celular.

Dissertação disponível na  
Biblioteca do Instituto Adolfo Lutz - SP  
Apoio financeiro: Projeto INCODEV  
e-mail: ginamiyama@hotmail.com

## Efeito antioxidante do extrato de gengibre (*Zingiber officinale*) em óleo de soja submetido ao aquecimento

---

Andreo, D. **Antioxidant effect of ginger extract (*Zingiber officinale*) in soybean oil under heating**. São José do Rio Preto-SP. 2007. [Dissertação de Mestrado – Área: Ciência e Tecnologia de Alimentos – Universidade Estadual Paulista – UNESP – São José do Rio Preto]. Orientadora: Dra. Neuza Jorge.

---

Os principais objetivos deste trabalho foram determinar o valor de compostos fenólicos totais e avaliar a atividade antioxidante do extrato etanólico de gengibre adicionado ao óleo de soja, submetido ao teste acelerado em estufa a 60°C e à termoxidação a 180°C, bem como o efeito sinérgico com o antioxidante sintético TBHQ. Rizomas de gengibre *in natura* foram lavados, cortados, desidratados e triturados, para a extração etanólica. Neste extrato, foi determinado o valor de EC<sub>50</sub>, a atividade antioxidante máxima e a quantidade de compostos fenólicos totais. Os tratamentos utilizados nos ensaios de teste acelerado em estufa e termoxidação foram o controle (óleo de soja isento de antioxidantes), o óleo de soja adicionado da concentração de 2.500 mg/kg de extrato etanólico de gengibre, o óleo adicionado de 50 mg/kg do antioxidante sintético TBHQ e o óleo de soja contendo a mistura de 2.500mg/kg de extrato de gengibre e 50 mg/kg de TBHQ. No teste acelerado em estufa, as amostras retiradas nos tempos 0, 3, 6, 9 e 12 dias de aquecimento, foram analisadas quanto ao índice de peróxidos e dienos conjugados. Na termoxidação, as amostras retiradas nos tempos 0, 4, 8, 12, 16 e 20 horas de aquecimento foram analisadas quanto a estabilidade oxidativa, compostos polares totais, índice de peróxidos e dienos conjugados. Os resultados obtidos das determinações analíticas foram submetidos às análises de variância, em esquema fatorial, no delineamento inteiramente casualizado, de modo a determinar a influência dos fatores tratamentos e tempos de aquecimento sobre as alterações nas amostras de óleo. O valor de EC<sub>50</sub>, a atividade antioxidante máxima e a quantidade de compostos fenólicos totais, obtidos foram 42,6µg/mL, 79% e 251mg/g, respectivamente. A concentração de extrato de gengibre selecionada para ser adicionada ao óleo de soja foi 2.500mg/kg, pois apresentou maior estabilidade oxidativa, medida pelo Rancimat a 100°C. No teste acelerado em estufa, os tratamentos em que foram adicionados TBHQ e a mistura dos antioxidantes demonstraram maior eficiência contra a formação de peróxidos e dienos conjugados ao final de 12 dias de aquecimento, com redução de cerca de 90% na formação de peróxidos e cerca de 65% na redução dos dienos conjugados. Na termoxidação a 180°C por 20 horas, os tratamentos em que foram utilizados o extrato de gengibre e a mistura de antioxidantes, apresentaram maior proteção do óleo quanto à estabilidade oxidativa, e à formação de compostos polares totais, peróxidos e dienos conjugados. Ao final deste trabalho foi possível concluir que o extrato etanólico de gengibre pode ser utilizado como antioxidante natural em óleos, gorduras e alimentos gordurosos.

Dissertação disponível na Biblioteca da  
UNESP – Campus de São José do Rio Preto.  
E-mail: deniseandreo@ig.com.br

ISSN 0073-9855



9 770073 985009