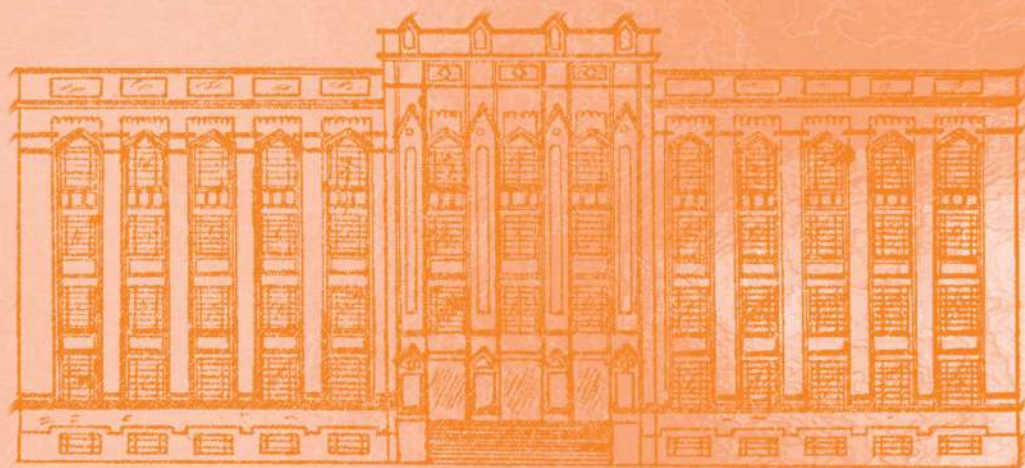


REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ

ISSN 0073-9855
RIALA6



Volume 66 número 1, 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 1, 2007

ISSN 0073-9855

Janeiro – Abril - 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 Atuí

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.
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.

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 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 (1)

ISSN 0073-9855
RIALA 6

CDD₁₆ 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

INSTRUÇÃO AOS AUTORES

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

8. Preparação do manuscrito ou artigo

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

Estrutura

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Artigos em revistas

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

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

Número com suplemento

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

Volume com suplemento

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

Instituição como autor

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

No prelo (forthcoming)

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

Livros e outras monografias

Indivíduo como autor

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

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

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

Instituição como autor e editor

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

Capítulo num livro

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

Resumo/Trabalho de congresso publicado

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

Dissertação/Tese

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

Material legal

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

Os elementos essenciais são: competência (país, estado ou cidade ou nome da entidade ou órgão no caso de se tratar de normas), título (especificação da legislação, número e data), ementa e título da publicação oficial, local da publicação oficial (cidade), data (dia, mês abreviado e ano), seção e paginação. Exemplos: Brasil. Portaria n° 695 de 1998 da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 30 mar. 1998. Seção 1, n° 60-E, p. 5-6.

Brasil. Resolução n°16, de 13 de dez.1984 do Conselho Federal de Educação. Dispõe sobre reajustamento de taxas, e altera a redação do artigo 5 da Resolução n.1 de 14/1/83. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 13 dez. 1984. Seção 1, p. 190-1.

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

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

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

Material Eletrônico

Artigo de revista em formato eletrônico:

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

Monografia em formato eletrônico:

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

Arquivo de computador:

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

Patente

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

Abreviaturas: devem ser evitadas ou usadas apenas as oficiais.

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

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

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

Da Publicação

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

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

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

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

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

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

Da Distribuição

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

INSTRUCTION FOR AUTHORS

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

SUMÁRIO/CONTENTS

Artigos de Revisão/Review Articles

- 1095 **Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão.**
Phenolic compounds in foods – A brief review.
Priscila Milene ANGELO, Neuza JORGE 1-9
- 1096 **Formação de óxidos de colesterol e alteração dos ácidos graxos em produtos cárneos.**
Formation of cholesterol oxides and modification of fatty acids in meat products.
Sueli R BAGGIO, Neura BRAGAGNOLO 10-17

Artigos Originais/ Original Articles

- 1097 **Comparação da eficiência dos caldos *Escherichia coli* e caldo verde brilhante lactose bile na enumeração de coliformes termotolerantes em leite e sorvete de massa.**
Efficiency of *Escherichia coli* liquid culture medium and brilliant green-bile salt lactose broth for counting thermotolerant coliforms in milk and ice cream samples.
Roberta Teresa RIZZO-BENATO, Cláudio Rosa GALLO 18-25
- 1098 **Análises microbiológicas de alimentos processados na Baixada Santista, envolvidos em doenças transmitidas por alimentos, no período de 2000 – 2006.**
Microbiological analyses in foodborne diseases associated - foods processed in Baixada Santista area, São Paulo- Brazil, during 2000 - 2006.
Jussara da Silva FAUSTINO, Estevão de Camargo PASSOS, Ana Ruth Pereira de MELLO, André Luis Monteiro ARAÚJO, Cícero Vagner de SOUZA, Luzia Ilza Ferreira JORGE, Liliana Aparecida ZAMARIOL 26-30
- 1099 **Isolamento de *Salmonella* de produtos de frango e perfil de suscetibilidade dos isolados a antimicrobianos.**
Salmonella isolation from poultry products and antimicrobial susceptibility profile.
Rita de Cássia dos Santos da CONCEIÇÃO, Andréa HENTGES, Ângela Nunes MOREIRA, Flávia Aleixo VASCONCELLOS, Ida Maria Ramos ÂNGELO, José Beiro CARVALHAL, José Antônio Guimarães ALEIXO, Cláudio Dias TIMM 31-34
- 1100 **Eficácia de meios ágar M-PA-C e ágar Cetrimide no isolamento de *Pseudomonas aeruginosa* em amostras de água mineral.**
Cetrimide and M-PA-C agar media efficiency for isolating *Pseudomonas aeruginosa* from mineral water samples.
Marise SIMÕES, Maria Angela Garnica PRANDI, Maria Helena MARTINI, Paulo Flávio Teixeira CHIARINI, Edson Zangiacomi MARTINEZ 35-39

- 1101 **Avaliação da qualidade de óleos e gorduras utilizados para fritura no comércio da região metropolitana da Baixada Santista, Estado de São Paulo.**
Assessment of food frying-oils and -fats marketed in Santos metropolitan area, São Paulo State.
Mário TAVARES, Eduardo GONZALEZ, Maria de Lourdes Paixão da SILVA, Roberto Carlos Fernandes BARSOTTI, Edna Emy KUMAGAI, Miriam Solange Fernandes CARUSO, Sabria AUED - PIMENTEL, Valter RUVIERI, Daniela Lambert de SOUZA 40-44
- 1102 **Avaliação do valor de TBARS em coxas de frangos irradiadas.**
TBAR values assessment in irradiated chicken legs.
Luciana MIYAGUSKU, Marcelo THOMAZINI, Arnaldo Y. KUAYE, Carmen J. Contreras CASTILLO 45-49
- 1103 **Refino de óleos de corvina (*Micropogonias furnieri*) provenientes dos processos de ensilagem ácida e termomecânico de farinha.**
Refinement of corvine (*Micropogonias furnieri*) oil manufactured by means of acid ensilage procedure and thermo treatment processing for meal production.
Valéria T CREXI, Fernanda L. GRUNENVALDT, Leonor A.S. SOARES, Luiz A. A. PINTO 50-56
- 1104 **Occurrence of aflatoxins M₁ and M₂ in goat milk marketed commercialized in the region of Ribeirão Preto-SP, Brazil.**
Ocorrência de aflatoxinas M₁ e M₂ em leite de cabra comercializado na região de Ribeirão Preto - SP, Brasil.
Maria Helena IHA, Lucile Tiemi ABE, Marina Miyuki OKADA, Rosa Maria Duarte FÁVARO 57-62
- 1105 **Freqüência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em mulheres, atendidas nas unidades da rede de saúde pública da região metropolitana de São Paulo (2001-2005)**
Frequency of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in women attended at public health center network of São Paulo metropolitan region (2001-2005).
Massami KAWARABAYASHI, Débora Picanço AURELIANO, Maria Lúcia RAYMUNDO, Rosângela Aparecida GARCIA, Thaís Alves da COSTA-SILVA, Katia Gomes CASTELLÃO, Helena Hilomi TANIGUCHI, José Eduardo TOLEZANO, Roberto Mitsuyoshi HIRAMOTO 63-67
- 1106 **Otimização e avaliação do ensaio de imunofluorescência indireta para pesquisa de anticorpos anti-herpesvírus humano 8 (HHV-8) usando sangue colhido em papel de filtro.**
Standardization of the indirect immunofluorescence assay to search for human herpesvirus 8(HHV8) antibodies using blood collected on filter paper.
Joyce Matie Kinoshita SILVA, Mariana Cavalheiro MAGRI, Fabrício JACOB, Elizabeth de los SANTOS-FORTUNA, Adele CATERINO-DE-ARAUJO 68-72
- 1107 **Cutaneous secretion from the giant African snail, *Achatina fulica*, as a source of Antileishmanial compounds.**
Secreção cutânea do caramujo gigante africano, *Achatina fulica*, como fonte de compostos anti-*Leishmania*.
André Gustavo TEMPONE 73-77

Relato de Caso/Case report

- 1108 **Deteção de células atípicas de *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* observadas em líquido cefalorraquidiano.**
Atypical *Cryptococcus neoformans* cells isolated from cerebrospinal fluid samples
Regina C PASCHOAL, Márcia SC MELHEM, Tamara GUELLI, Maria Walderez SZESZS 78-80

Comunicação Breve/Brief Communication

- 1109 **Variedades de *Cryptococcus neoformans* isoladas de pacientes com AIDS em hospital da cidade de São Paulo durante 1996-1999.**
Cryptococcus neoformans varieties isolated from patients with aids referred to a hospital of São Paulo city during 1996-1999.
Regina C PASCHOAL, Alvaro. M NAKASHITA, Ana L LIMA, Marilena A MARTINS, Wilma A IULIANO, Mara CSM PAPPALARDO 81-84
- 1110 **Avaliação microbiológica de esponjas contendo agentes bactericidas usadas em cozinhas de unidades de alimentação e nutrição da região de Campinas/SP, Brasil.**
Microbial survey of sponges containing bactericide agents used in kitchens of food and nutrition units from Campinas region/SP, Brazil.
Silvana Mariana SREBERNICH, Maria Magali Stelato Rocha SOARES, Sônia Maria Ferreira da SILVA, Thayane Carla Rodrigues Costa CAOBIANCO 85-88

Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão

Phenolic compounds in foods – A brief review

RIALA6/1095

Priscila Milene ANGELO¹, Neuza JORGE²

* Endereço para correspondência: UNESP – Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos, Rua Cristóvão Colombo, 2265 - Jd. Nazareth 15054-000, São José do Rio Preto/SP. Telefone (17) 3221-2200 Ramal: 2715, e-mail: pmileneangelo@yahoo.com.br.

¹ Mestranda em Engenharia e Ciência dos Alimentos, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, Bolsista FAPESP*.

² Prof^a. Dr^a. do Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista.

Recebido: 27/01/2006 – Aceito para publicação: 17/07/2006

RESUMO

Os compostos fenólicos são estruturas químicas que apresentam hidroxilas e anéis aromáticos, nas formas simples ou de polímeros, que os confere o poder antioxidante. Esses compostos podem ser naturais ou sintéticos. Quando presentes em vegetais podem estar em formas livres ou complexadas a açúcares e proteínas. Dentre eles, destacam-se os flavonóides, os ácidos fenólicos, os taninos e os tocoferóis como os antioxidantes fenólicos mais comuns de fonte natural. Considerando-se a importância dos compostos fenólicos, o presente trabalho apresenta uma revisão sobre os fenólicos mais comuns em plantas e as principais metodologias usadas em análises de alimentos, na identificação e quantificação desses compostos. Há ainda a necessidade de estabelecer uma investigação sistemática para preparação de amostra e na determinação de fenólicos em alimentos, uma vez que as metodologias correntemente utilizadas para a análise de fenólicos não são totalmente padronizadas, tampouco divulgadas por órgãos oficiais.

Palavras-chave. compostos fenólicos, flavonóides, ácidos fenólicos, análises de fenólicos.

ABSTRACT

Phenolic compounds are chemical structures that are composed of hydroxyls and aromatic rings, in a simple or polymery forms, which confer antioxidant characteristic. These products can be natural or synthetic. Phenolic compounds may be found in vegetables, and in free form or bound to sugars and proteins. Among them, flavonoids, phenolic acids, tannins, and tocopherols are pointed out as the most common natural source of anti-oxidant phenolics. Taking into account of the importance of phenolic antioxidants, this study presents a review on the most common phenols in plants as well as the main methodologies to be employed for identifying and quantifying those compounds in foods. Furthermore, it is still under the necessity of a systematic investigation for performing phenolic sample preparation and for determining phenolic compounds in foods, since the methodologies currently used for analyzing phenolic component have not been totally standardized, and have not been made public by official organizations.

Key words. phenolic compounds, flavonoids, phenolic acids, phenolic analyses.

INTRODUÇÃO

Várias fontes de antioxidantes naturais são conhecidas e algumas são amplamente encontradas no reino vegetal. Diversos extratos de ervas como alecrim¹, coentro², sálvia³, tomilho e manjeriço⁴ têm sido estudados devido o poder antioxidante, que pode ser atribuído ao seu conteúdo de compostos fenólicos⁵.

Os compostos fenólicos são originados do metabolismo secundário das plantas, sendo essenciais para o seu crescimento e reprodução, além disso se formam em condições de estresse como, infecções, fermentos, radiações UV, dentre outros⁶.

Os antioxidantes podem ser divididos em duas classes: a dos com atividade enzimática e a dos sem essa atividade. Na primeira, estão os compostos capazes de bloquear a iniciação da oxidação, ou seja, as enzimas que removem as espécies reativas ao oxigênio. Na segunda classe, estão moléculas que interagem com as espécies radiculares e são consumidas durante a reação. Nesta classificação, incluem-se os antioxidantes naturais e sintéticos como os compostos fenólicos⁷.

Esses compostos encontram-se largamente em plantas e são um grupo muito diversificado de fitoquímicos derivados de fenilalanina e tirosina. Os fenólicos, em plantas, são essenciais no crescimento e reprodução dos vegetais, além de atuarem como agente antipatogênico e contribuírem na pigmentação⁸. Em alimentos, são responsáveis pela cor, adstringência, aroma⁹ e estabilidade oxidativa⁶.

As principais fontes de compostos fenólicos são frutas cítricas, como limão, laranja e tangerina, além de outras frutas à exemplo da cereja, uva, ameixa, pêra, maçã e mamão, sendo encontrados em maiores quantidades na polpa que no suco da fruta. Pimenta verde, brócolis, repolho roxo, cebola, alho e tomate também são excelentes fontes destes compostos¹⁰.

Quimicamente, os fenólicos são definidos como substâncias que possuem anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais⁴. Possuem estrutura variável e com isso, são multifuncionais. Existem cerca de cinco mil fenóis, dentre eles, destacam-se os flavonóides, ácidos fenólicos, fenóis simples, cumarinas, taninos, ligninas e tocoferóis⁸.

Os fenólicos englobam desde moléculas simples até moléculas com alto grau de polimerização. Estão presentes nos vegetais na forma livre ou ligados a açúcares (glicosídeos) e proteínas¹¹.

Ribéreau-Gayon¹² classificou estes compostos em três categorias: pouco distribuídos na natureza, polímeros e largamente distribuídos na natureza.

Na família dos compostos fenólicos pouco distribuídos na natureza, encontra-se um número bem reduzido, embora com certa frequência. Neste grupo estão os fenóis simples, o pirocatecol, a hidroquinona e o resorcinol. Pertencem ainda a esta família os aldeídos derivados dos ácidos benzóicos, que são constituintes dos óleos essenciais, como a vanilina¹³.

Os polímeros são alguns fenólicos que não se apresentam na forma livre nos tecidos vegetais, esta família engloba os taninos e as ligninas.

Na família dos compostos largamente distribuídos na natureza estão os fenólicos encontrados geralmente em todo reino vegetal, mas às vezes podem estar localizados em uma só planta. Este grupo, pode-se dividir em flavonóides (antocianinas, flavonóis e seus derivados) e ácidos fenólicos (ácidos benzóico, cinâmico e seus derivados) e cumarinas¹⁴.

De acordo com seu modo de ação, os antioxidantes, podem ser classificados em primários e secundários. Os primários atuam interrompendo a cadeia da reação através da doação de elétrons ou hidrogênio aos radicais livres, convertendo-os em produtos termodinamicamente estáveis e/ou reagindo com os radicais livres, formando o complexo lípido-antioxidante que pode reagir com outro radical livre. Os antioxidantes secundários atuam retardando a etapa de iniciação da autooxidação, por diferentes mecanismos que incluem complexação de metais, seqüestro de oxigênio, decomposição de hidroperóxidos para formar espécie não radical, absorção da radiação ultravioleta ou desativação de oxigênio singlete¹⁵.

Os compostos fenólicos são incluídos na categoria de interruptores de radicais livres, sendo muito eficientes na prevenção da autooxidação¹⁶.

Os antioxidantes fenólicos interagem, preferencialmente, com o radical peroxil por ser este mais prevalente na etapa da autooxidação e por possuir menor energia do que outros radicais, fato que favorece a abstração do seu hidrogênio¹⁷. O radical fenoxil resultante, embora relativamente estável, pode interferir na reação de propagação ao reagir com um radical peroxil, via interação entre radicais. O composto formado, por ação da luz ultravioleta e temperaturas elevadas, poderá originar novos radicais, comprometendo a eficiência do antioxidante, que é determinada pelos grupos funcionais presentes e pela posição que ocupam no anel aromático, bem como, pelo tamanho da cadeia desses grupos^{16,18}.

Este mecanismo de ação dos antioxidantes, presentes em extratos de plantas, possui um papel importante na redução da oxidação lipídica em tecidos, vegetal e animal, pois quando incorporado na alimentação humana não conserva apenas a qualidade do alimento, mas também reduz o risco de desenvolvimento de patologias, como arteriosclerose e câncer^{19,20}.

A atividade anticarcinogênica dos fenólicos tem sido relacionada à inibição dos cânceres de cólon, esôfago, pulmão, fígado, mama e pele. Os compostos fenólicos que possuem este potencial são resveratrol, quercetina, ácido caféico e flavonóis¹⁰.

Considerando a abundância na natureza e a importância dos compostos fenólicos devido a sua influência na qualidade dos alimentos, este trabalho apresenta uma revisão sobre compostos fenólicos e as principais metodologias usadas em análises de alimentos.

Tipos de compostos fenólicos

A diversidade estrutural dos compostos fenólicos deve-se à grande variedade de combinações que acontece na natureza e os compostos resultantes são chamados de polifenóis. Estas combinações fenólicas podem ser categorizadas em várias classes como mostradas na Tabela 1^{21,22}. Dentre os fenólicos, destacam-se os flavonóides, os ácidos fenólicos, os taninos e os tocoferóis como os mais comuns antioxidantes fenólicos de fonte natural¹⁴.

Tabela 1. Classe de compostos fenólicos em plantas.

Classe	Estrutura
Fenólicos simples, benzoquinonas	C ₆
Ácidos hidroxibenzóicos	C ₆ -C ₁
Acetofenol, ácidos fenilacéticos	C ₆ -C ₂
Ácidos hidroxicinâmicos, fenilpropanóides	C ₆ -C ₃
Nafitoquinonas	C ₆ -C ₄
Xantonas	C ₆ -C ₁ -C ₆
Estilbenos, antoquinonas	C ₆ -C ₂ -C ₆
Flavonóides, isoflavonóides	C ₆ -C ₃ -C ₆
Lignanas, neolignanas	(C ₆ -C ₃) ₂
Biflavonóides	(C ₆ -C ₃ -C ₆) ₂
Ligninas	(C ₆ -C ₃) _n
Taninos condensados	(C ₆ -C ₃ -C ₆) _n

Os flavonóides são compostos largamente distribuídos no reino vegetal, encontram-se presentes em frutas, folhas, sementes e em outras partes da planta na forma de glicosídeos ou agliconas. São compostos de baixo peso molecular, consistindo em 15 átomos de carbono, organizados na configuração C₆-C₃-C₆²².

A estrutura química dos flavonóides consiste em dois anéis aromáticos, denominados anel A e B, unidos por três carbonos que formam um anel heterocíclico, denominado anel C (Figura 1). O anel aromático A é derivado do ciclo acetato/malonato, enquanto o anel B é derivado da fenilalanina²³. Variações em substituição do anel C padrão resultam em importantes classes de flavonóides, como flavonóis, flavonas, flavanonas, flavanóis (ou catequinas), isoflavonas e antocianidinas²⁴. Substituições dos anéis A e B originam diferentes compostos dentro de cada classe de flavonóides²⁴. Estas substituições podem incluir oxigenação, alquilação, glicosilação, acilação e sulfatação²⁴.

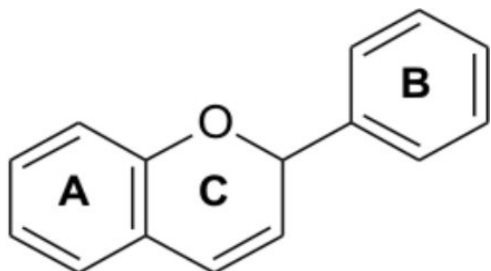
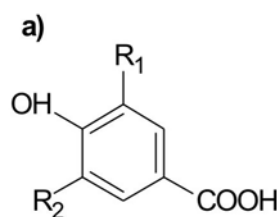


Figura 1. Estrutura química dos flavonóides.

Os ácidos fenólicos caracterizam-se por terem um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos de hidroxila e/ou metoxila na molécula, conferindo propriedades antioxidantes para os vegetais¹³.

Os ácidos fenólicos consistem em dois grupos, derivados do ácido hidroxibenzóico e derivados do ácido hidroxicinâmico (Figura 2). Os ácidos hidroxibenzóicos incluem os ácidos gálico, p-hidroxibenzóico, protocatecuico, vanílico e siríngico, que têm estrutura comum, C₆-C₁²⁶; enquanto os ácidos hidroxicinâmicos, são compostos aromáticos com três carbonos que formam uma cadeia lateral (C₆-C₃), como os ácidos caféico, ferúlico, p-cumárico e sináptico, sendo os mais comuns¹¹.

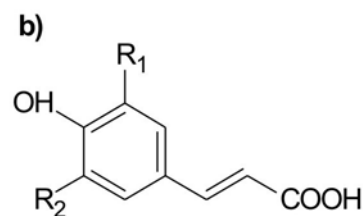


Ácido p-hidroxibenzóico: R₁ = R₂ = H

Ácido protocatecuico: R₁ = OH, R₂ = H

Ácido vanílico: R₁ = OCH₃, R₂ = H

Ácido siríngico: R₁ = R₂ = OCH₃



Ácido p-cumárico: R₁ = R₂ = H

Ácido caféico: R₁ = OH, R₂ = H

Ácido ferúlico: R₁ = OCH₃, R₂ = H

Figura 2. Estrutura química dos ácidos hidroxibenzóicos (a) e hidroxicinâmicos (b).

Os ácidos sinápticos, ferúlico e p-cumárico são antioxidantes mais ativos do que os derivados do ácido benzóico, tais como ácido protocatecuico, siríngico e vanílico²⁶. Isso se deve à dupla ligação presente na molécula dos derivados do ácido cinâmico, que participa da estabilidade do radical por ressonância de deslocamento do elétron desemparelhado, enquanto que os derivados do ácido benzóico não apresentam essa característica²⁷.

Os taninos possuem o peso molecular relativamente alto, constituem uma classe de polifenóis e, segundo a estrutura

química, são classificados em taninos hidrolisáveis e taninos condensáveis²⁸.

Os taninos condensáveis, denominados proantocianidinas, são oligômeros e polímeros de flavan-3-ol (catequina) e/ou flavan-3,4-diol (leucocianidina), produtos do metabolismo do fenilpropanol (Figura 3). As proantocianidinas, assim denominadas, provavelmente pelo fato apresentarem pigmentos avermelhados da classe das antocianidinas, como cianidina e delphinidina, apresentam uma rica diversidade estrutural, resultante de padrões de substituições entre unidades flavânicas, diversidade de posições entre suas ligações e estereoquímica de seus compostos²⁹.

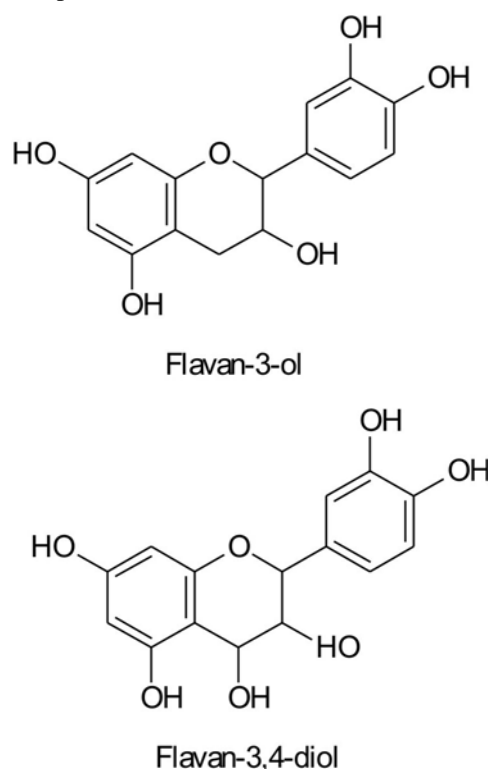


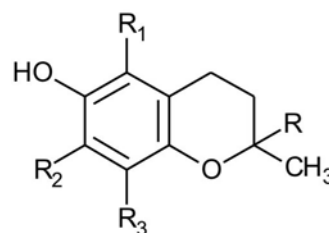
Figura 3. Estrutura química de flavan-3-ol e flavan-3,4-diol.

Os taninos hidrolisáveis são ésteres de ácidos gálico e elágicos glicosilados, formados a partir do chiquimato, onde os grupos hidroxilas do açúcar são esterificados com os ácidos fenólicos. Os taninos elágicos são muito mais frequentes que os gálicos, e é provável que o sistema bifenílico do ácido hexaidroxidifenílico seja resultante da ligação oxidativa entre dois ácidos gálicos^{14,30,31}.

Os tocoferóis são compostos monofenólicos, existentes em vegetais, principalmente em sementes oleaginosas e folhas, que possuem atividade antioxidante e de vitamina E. Eles estão agrupados em duas séries de compostos que possuem estrutura química semelhante e recebem o nome genérico de tocóis e tocotrienóis (Figura 4). Os compostos da série tocóis possuem em cadeia saturada ligada ao anel e são denominados tocoferóis, enquanto que os da série tocotrienóis possuem cadeia

insaturada¹⁶. A nomenclatura desses compostos recebem o prefixo de α , β , γ , δ dependendo do número e posição do grupo metila ligado ao anel aromático. O α -tocoferol é o composto que apresenta maior atividade de vitamina E³².

A atividade antioxidante dos tocoferóis decresce do composto δ para o α -tocoferol, assim, o δ -tocoferol é o mais efetivo antioxidante, o β e γ -tocoferol têm atividade intermediária e o α -tocoferol apresenta a mais baixa atividade antioxidante^{32,33}.



α - toco: $R_1 = R_2 = R_3 = CH_3$

β - toco: $R_1 = R_3 = CH_3 = CH_3$; $R_2 = H$

γ - toco: $R_2 = R_3 = CH_3$; $R_1 = H$

δ - toco: $R_1 = R_2 = H_3$; $R_3 = CH$

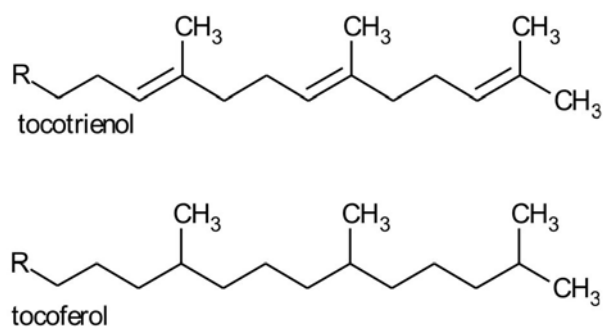


Figura 4. Estrutura química do tocoferol e tocotrienol.

Análise e quantificação de fenólicos

Diversos pesquisadores têm trabalhado na separação, identificação, quantificação e aplicação dos compostos fenólicos em alimentos, enfrentando muitos problemas metodológicos, pois, além de englobarem uma gama enorme de substâncias, são, na maioria das vezes, de grande polaridade, muito reativos e susceptíveis à ação de enzimas¹⁴.

Os métodos realizados em análises de compostos fenólicos podem ser classificados em determinação de compostos fenólicos totais, quantificação individual e/ou de um grupo ou classe de compostos fenólicos³⁴.

A análise de compostos fenólicos é influenciada pela natureza do composto, o método de extração empregado, o

tamanho da amostra, o tempo e as condições de estocagem, o padrão utilizado e a presença de interferentes tais como ceras, gorduras, terpenos e clorofilas⁸.

Ainda não se desenvolveu um método satisfatório para a extração de todos ou de uma classe específica de fenólicos presentes nos alimentos. A solubilidade dos fenólicos varia de acordo com a polaridade do solvente utilizado, o grau de polimerização dos fenólicos e suas interações com outros constituintes dos alimentos. Os solventes mais utilizados para a extração destes compostos são metanol, etanol, acetona, água, acetato de etila, propanol, dimetilformaldeído e suas combinações⁶.

Outro aspecto importante no desenvolvimento de métodos de quantificação de compostos fenólicos é a dificuldade de se encontrar um padrão específico e conveniente, devido a complexidade das substâncias fenólicas presentes nos alimentos e as diferenças de reatividade entre estas substâncias e os reagentes³⁵.

Métodos espectrofotométricos

Vários métodos espectrofotométricos para quantificação de compostos fenólicos em alimentos têm sido desenvolvidos. Esses métodos são baseados em diferentes princípios e são usados para quantificar fenólicos totais^{36,37}, determinar um composto fenólico específico^{37,38} ou uma classe de fenólicos^{39,40}.

O método de Folin-Denis é o mais utilizado para a determinação de fenólicos totais em vegetais⁸. Este método descrito por Swain e Hillis³⁷ baseia-se na redução do ácido fosfomolibdico-fosfotúngstico pelas hidroxilas fenólicas, produzindo um complexo de coloração azul que absorve entre 620 e 740 nm com um comprimento de onda máximo em 725 nm. A reação ocorre em meio alcalino e a solução saturada de carbonato de sódio é a base mais indicada. O método de Folin-Denis, no entanto, não é um método específico, pois determina todos os fenólicos presentes, além de substâncias redutoras adicionadas aos alimentos ou naturalmente presentes que podem interferir nos resultados.

Um aspecto importante a ser considerado neste método é a escolha do padrão. Os mais utilizados têm sido o ácido tânico e a catequina, entretanto, estes compostos apresentam reatividades diferentes frente ao reagente de Folin-Denis⁴¹.

Muitas vezes o reagente de Folin-Denis é substituído pelo de Folin-Ciocalteu⁴². Este último é mais sensível à redução pelos fenóis e diminui a tendência à precipitação. As principais diferenças entre estes dois reagentes é o uso de sulfato de lítio, a presença de ácido hidrocloreídrico e o longo tempo de aquecimento para a preparação do reagente de Folin-Ciocalteu^{39,43}.

Para ambos os testes, o número de grupos hidroxilas ou de grupos potencialmente oxidáveis controla a quantidade de cor formada. O grupo fenólico deve estar na forma de fenolato para os ânions molibdo e tungstofosfato produzirem a oxidação. As moléculas reduzidas são azuis e as não reduzidas são amarelas. Estas últimas se decompõem vagarosamente em pH

alcalino, o qual é necessário para a manutenção do fenol na forma de fenolato⁸.

Este método espectrofotométrico, independente do tipo de reagente utilizado, Folin-Denis ou Folin-Ciocalteu, não é um método específico, pois detecta todos os grupos fenólicos presentes no extrato, incluindo aquelas proteínas extraíveis. Outra desvantagem é a interferência de reduzir substâncias como ácido ascórbico⁶.

Price e Butler³⁶ desenvolveram um método fundamentado na redução do íon férrico a íon ferroso pelas hidroxilas fenólicas, seguido pela formação de um complexo de ferrocianeto ferroso, conhecido como azul da Prússia, que apresenta um máximo de absorção a 720 nm. A habilidade dos compostos fenólicos reduzirem o íon férrico depende da hidroxilação e do grau de polimerização destes compostos. Além da falta de especificidade, este método apresenta problemas como a instabilidade de soluções diluídas de cloreto férrico, aumento da absorbância na presença de solventes orgânicos e a impregnação da cor azul na vidraria utilizada, inclusive nas cubetas do espectrofotômetro.

O teste da vanilina, descrito por Swain e Hillis³⁷, é largamente utilizado para quantificar proantocianinas (taninos condensados) em vegetais⁷, particularmente em grão⁴⁴. Baseia-se na reação da vanilina a 1% com o fenólico em meio fortemente ácido, um composto colorido com máximo de absorção a 500 nm⁴⁵. Este teste é específico para flavan-3-ols, di-hidrochalconas e proantocianinas que possuem uma ligação simples na posição 2-3 e uma hidroxila livre na posição meta do anel B⁴⁶.

Price et al.⁴⁰ estudaram sobre o uso do teste de vanilina para a determinação de taninos. Os autores recomendaram um tempo mais curto na extração das amostras, a redução da concentração da vanilina (0,5%) e do ácido clorídrico (4%), a fixação da temperatura em 30°C e a utilização do extrato o mais rápido possível. Além disso, mostraram que a inclinação da curva na reação entre a catequina e a vanilina é diferente do que entre o tanino e a vanilina e que ao se utilizar a catequina como padrão para a dosagem de taninos estes são superestimados.

Dentre os métodos de dosagem dos taninos que fazem uso da complexação com proteínas, o de Hagerman e Butler⁴⁷ tem sido o mais utilizado. Através da adição de uma solução padrão de proteína ao extrato contendo tanino forma-se um complexo que após separação por centrifugação é dissolvido com dodecil sulfato de sódio (SDS) em meio alcalino. Adiciona-se solução de cloreto férrico que reage com o tanino formando um composto colorido com um máximo de absorção a 510nm. A absorbância é uma função linear do teor de tanino ou de ácido tânico para quantidades que variam de 0,20 a 1,00mg.

Vários estudos foram realizados para desenvolver um método espectrofotométrico UV simples e satisfatório⁴⁸. Os fenólicos simples possuem absorção máxima entre 220 e 280nm⁴⁹, porém sua absorção é afetada pela natureza do solvente empregado e o pH da solução. Além disso, a possibilidade de

interferência dos raios UV sobre proteínas, ácidos nucleicos e aminoácidos devem ser considerados. Diante disso, o desenvolvimento de um UV satisfatório é uma tarefa difícil, além do material a ser analisado. Ambas as técnicas, espectrofotométricas UV e espectroscópicas visíveis, são freqüentemente usados para identificação de combinações fenólicas isoladas, particularmente flavonóides e também para identificar a presença de combinações fenólicas predominantes³⁵.

Métodos eletroquímicos

Os métodos eletroquímicos também são muito úteis na análise de fenólicos em alimentos. Estes métodos podem ser utilizados para determinar o potencial redutor de compostos fenólicos, identificar mecanismos de oxidação, identificar flavonóides através da comparação com um padrão e determinar o potencial redutor de um fenólico desconhecido. O conhecimento do potencial redutor é de grande interesse para a indústria de alimentos, pois fenólicos oxidados podem afetar negativamente a qualidade de vinhos, cervejas, sucos de uva, etc^{8,50,51}.

Métodos cromatográficos

A cromatografia gasosa (CG) e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) são técnicas usadas tanto na separação quanto na quantificação de compostos fenólicos. A elucidação de estruturas tem sido realizada através da combinação de GC e CLAE com a espectrometria de massa, além de outras técnicas relevantes⁸.

Diversas técnicas de CG têm sido empregadas na separação e quantificação de ácidos fenólicos^{52,53}, isoflavonas⁵⁴, aldeídos fenólicos⁵⁵ e monômeros de taninos condensados⁵⁶. Inovações na CG como colunas de alta temperatura, controladores de pressão e detectores eletrônicos melhoraram significativamente a resolução e também têm aumentado o alcance de substâncias de alto peso molecular que podem ser analisadas por GC. A preparação de amostras para CG poder incluir a remoção de lipídios do extrato, liberação de fenólicos de éster e glicosídeo titulados por álcali^{52,53}, ácidos e hidrólises enzimáticas⁵⁴.

Há algumas metodologias descritas para a análise de compostos fenólicos por cromatografia a gás, baseada nas suas características de polaridade. Os ácidos fenólicos, muito presentes em especiarias, são substâncias que possuem alta polaridade e baixa pressão de vapor. Tais características levaram alguns autores a descrever processos distintos para derivatização e condições de análises cromatográficas, objetivando uma melhor técnica de isolamento e caracterização destes compostos⁷.

As técnicas de CLAE são extensamente usadas tanto na separação quanto na quantificação de combinações fenólicas. Várias fases móveis estão disponíveis para a análise de antocianinas, procianidinas, flavononas e flavonóis, flavonas e ácidos fenólicos^{57,58}. A introdução de colunas de fase reversa na CLAE tem consideravelmente realçado a separação de diferentes classes de combinações fenólicas^{59,60}.

Em uvas, vinhos e sucos a análise dos compostos fenólicos individuais é comumente realizada por CLAE^{61,62}.

A CLAE com detector eletroquímico tem sido satisfatoriamente aplicada na detecção, identificação e quantificação de flavonóides e não flavonóides em vinho⁶³. De acordo com Chaviari, Concialini e Galletti⁶⁴, o detector eletroquímico é uma alternativa útil em relação à detecção UV, pois é mais seletivo.

McMurtrey et al.⁶⁵ desenvolveram um método que consiste na aplicação direta de CLAE utilizando coluna de fase reversa e detector eletroquímico para a quantificação de resveratrol em vinhos. Este método mostrou-se bastante sensível para a análise de trans-resveratrol e diminuiu consideravelmente o tempo necessário para a realização das análises já que as amostras não passaram por nenhum pré-tratamento.

Alto desempenho da CLAE em combinação com a espectrometria de massa tem sido comumente utilizado para caracterização estrutural de fenólicos. A espectrometria de massa também tem sido empregada para confirmação estrutural de fenólicos em ameixas, pêssegos, nectarinas⁶⁶, cacau⁶⁷, azeite de oliva⁶⁸ e em outros alimentos, tendo estes trabalhos demonstrados que há complexação de flavonóides com Cu²⁺.

A cromatografia gasosa associada à espectrometria de massa também tem sido utilizada na quantificação de resveratrol em vinhos^{69,70}.

Outras técnicas cromatográficas tais como as cromatografias em papel e em camada delgada são bastante utilizadas na purificação e isolamento de antocianinas, flavonóis e ácidos fenólicos em alimentos^{71,72,73}.

Outros métodos usados para a detecção de fenólicos é a técnica de detecção de reação química⁷⁴ e detector fluorimétrico⁷⁵.

CONCLUSÃO

As diversas publicações sobre análises de fenólicos em alimentos surgiram há muitos anos. Entretanto, não há ainda disponível um método padronizado para preparação de amostra e extração. Portanto, há necessidade de uma investigação sistemática para preparação de amostra e determinação de fenólicos em alimentos, seja quantificação total, individual e/ou de um grupo ou classe de componentes fenólicos. Além disso, as metodologias utilizadas para análise de fenólicos não são totalmente padronizadas, sendo deste modo, de extrema importância o desenvolvimento e divulgação de métodos por órgãos oficiais.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pela bolsa de mestrado, processo 05/52732-9.

REFERÊNCIAS

1. Ramalho V.C. Ação antioxidante de α -tocoferol e extrato de alecrim em óleo de soja submetido à termoxidação [Dissertação de Mestrado]. São José do Rio Preto, São Paulo: Universidade Estadual Paulista, 2005. 154 pp.
2. Melo EA, Mancini-Filho J, Guerra NB, Maciel GR. Atividade antioxidante de extratos de coentro (*Coriandrum sativum* L.). *Ci Tecnol Aliment* 2003; 23 (suppl): 195-9.
3. Lu Y, Foo LY. Antioxidant activities of polyphenols from sage (*Salvia officinalis*). *Food Chem* 2001; 75 (2): 197-202.
4. Lee SJ, Umamo K, Shibamoto T, Lee KG. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. *Food Chem* 2005; 91(1): 131-7.
5. Wettasinghe M, Shahidi F. Evening primrose meal: a source of natural antioxidants and scavenger of hydrogen peroxide and oxygen-derived free radicals. *J Agric Food Chem* 1999; 47 (5): 1801-12.
6. Naczek M, Shahidi F. Extraction and analysis of phenolics in food. *J Chromatogr A* 2004; 1054 (1/2): 95-111.
7. Moreira AVB, Mancini-Filho J. Influência dos compostos fenólicos de especiarias sobre a lipoperoxidação e o perfil lipídico de tecidos de ratos. *Rev Nutr* 2004; 17 (4): 411-24.
8. Shahidi F, Naczek M. Food phenolics: sources, chemistry, effects and applications. Lancaster: Technomic; 1995.
9. Peleg H, Bodine KK, Noble AC. The influence of acid on adstringency of alum and phenolic compounds. *Chem Senses* 1998; 23 (3): 371-8.
10. Pimentel CVMB, Francki VM, Gollücke APB. Alimentos funcionais: introdução às principais substâncias bioativas em alimentos. São Paulo: Varela; 2005.
11. Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutrition significance. *Nutr Rev* 1998; 56 (11): 317-33.
12. Ribéreau-Gayon P. Les composés phénoliques des végétaux. Paris: Dunod; 1968.
13. Soares SE. Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Rev Nutr* 2002; 15 (1): 71-81.
14. King A, Young G. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. *J Am Diet Assoc* 1999; 50 (2): 213-8.
15. Adegoke GO, Vijay Kumar M, Gopala Krishna AG, Varadaraj MC, Sambaiah K, Lokesh BR. Antioxidants and lipid oxidation in food – a critical appraisal. *J Food Sci Technol* 1998; 35 (4): 283-398.
16. Shahidi F, Janitha PK, Wanasundara PD. Phenolic antioxidants. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1992; 32 (1): 67-103.
17. Decker EA. Strategies for manipulating the prooxidative/antioxidative balance of food to maximize oxidative stability. *Trends Food Sci Technol* 1998; 9 (6): 241-8.
18. Jadhav SJ, Nimbalkar SS, Kulkarni AD, Madhavi DL. Lipid oxidation in biological and foods systems. In: Madhavi DL, Deshpande SS, Salunkhe DK, editores. Food antioxidants: technological, toxicological and health perspectives. New York: Marcel Dekker; 1995. p. 5-62.
19. Namiki M. Antioxidants/antimutagens in food. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1990; 29 (4): 273-300.
20. Ramarathnam N, Osawa T, Ochi H, Kawakishi S. The contribution of plant food antioxidants to human health. *Trends Food Sci Nutr* 1995; 6 (3): 75-82.
21. Harborne JB. General procedures and measurement of total phenolics. In: Harborne JB, editor. Methods in plant biochemistry: volume 1 Plant phenolics. London: Academic Press; 1989. p. 1-28.
22. Harborne JB, Baxter H, Moss GP, editores. Phytochemical dictionary: handbook of bioactive compounds from plants. 2nd ed. London: Taylor & Francis; 1999.
23. Merken HM, Beecher GR. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: a review. *J Agric Food Chem* 2000; 48 (3): 577-99.
24. Hollman PCH, Katan MB. Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. *Food Chem Toxicol* 1999; 37 (9/10): 937-42.
25. Pietta PG. Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod* 2000; 63 (7): 1035-42.
26. Balasundram N, Sundram K, Samman S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem* 2006; 99 (1): 191-203.
27. Wanasundara U, Amarowicz R, Shahidi F. Isolation and identification of an antioxidative component in canola. *J Agric Food Chem* 1994; 42 (6): 1285-90.
28. Oszmianski J, Wojdylo A, Lamer-Zarawska E, Swiader K. Antioxidant tannins from Rosaceae plant roots. *Food Chem* 2007; 100 (2): 579-83.
29. Monteiro JM, Albuquerque UP, Araújo EL, Amorim ELC. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. *Quim Nova* 2005; 28 (5): 892-6.
30. Burns RE, Gardner PT, O'Neil J, Crawford S, Morecroft I, McPhail DB et al. Relationship among antioxidant activity, vasodilatation capacity, and phenolics content of red wines. *J Agric Food Chem* 2000; 48 (2): 220-30.
31. Porter LG. Tannins. In: Harborne JB, editor. Methods in plant biochemistry: volume 1 Plant phenolics. London: Academic Press; 1989. p. 389-419.
32. Six P. Current research in natural food antioxidants. *Food Technol* 1994; 5 (6): 679-87.
33. Hemeda HM, Klein BP. Effects of naturally occurring antioxidants on peroxidase activity of vegetable extracts. *J Food Sci* 1990; 55 (1): 184-5.
34. Moure A, Cruz JM, Franco D, Domínguez JM, Sineiro J, Domínguez H et al. Natural antioxidants from residual sources. *Food Chem* 2001; 72 (2): 145-71.

35. Macheix JJ, Fleuriet A, Billot J. Fruit phenolics. Boca Raton: CRC Press; 1990.
36. Price ML, Butler LG. Rapid visual estimation and spectrophotometric determination of tannin content in sorghum grain. *J Agric Food Chem* 1977; 25 (6): 1268-70.
37. Swain T, Hillis WE. The phenolics constituents of *Prunus domestica*: the quantitative analysis of phenolic constituents. *J Sci Food Agric* 1959; 10 (1): 63-8.
38. Burns RE. Method for estimation of tannin in grain sorghum. *Agron J* 1971; 63: 511-2.
39. Brune M, Hallberg L, Skanberg AB. Determination of iron-binding phenolic groups in foods. *J Food Sci* 1991; 56(1): 128-130.
40. Price ML, Van Scoyoc S, Butler LG. A critical evaluation of the vanillin reaction as an assay for tannin in sorghum grain. *J Agric Food Chem* 1978; 26 (5): 1214-8.
41. Coelho JV. Fenólicos totais e taninos durante o desenvolvimento e o armazenamento do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) [Tese de Doutorado]. São Paulo, São Paulo: Universidade de São Paulo, 1987. 151 pp.
42. Singleton VL, Rossi JA. Colorimetric of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic* 1965; 16 (3): 144-6.
43. Maxson ED, Rooney LW. Evaluation of methods for tannin analysis in sorghum grain. *Cereal Chem* 1972; 49: 719-22.
44. Goldstein JL, Swain T. Changes in tannins in ripening fruits. *Phytochemistry* 1963; 2 (4): 371-5.
45. Broadhurst RB, Jones WT. Analysis of condensed tannins using acidified vanillin. *J Sci Food Agric* 1978; 29: 788-90.
46. Sarkar SK, Howarth RE. Specificity of vanillin test for flavonols. *J Agric Food Chem* 1976; 24 (2): 317-9.
47. Hagerman AE, Butler LG. Protein precipitation method for the quantitative determinations of tannins. *J Agric Food Chem* 1978; 26 (4): 809-12.
48. Hoff JF, Singleton KI. A method for determination of tannin in foods by means of immobilized enzymes. *J Food Sci* 1977; 42 (6): 1566-70.
49. Owades JL, Rubin G, Brenner MW. Determination of food tannins by ultraviolet spectrophotometry. *J Agric Food Chem* 1958; 6 (1): 44-8.
50. Aaby K, Hvattum G, Skrede G. Analysis of flavonoids and other phenolic compounds using high-performance liquid chromatography with coulometric array detection: relationship to antioxidant activity. *J Agric Food Chem* 2004; 52 (15): 4595-603.
51. Mattila P, Astola J, Kumpulainen J. Determination of flavonoids in plant material by HPLC with diode-array and electro-array detections. *J Agric Food Chem* 2000; 48 (12): 5834-41.
52. Dabrowski JK, Sosulski FW. Quantitation of free and hydrolyzable phenolic acids in seeds by capillary gas-liquid chromatography. *J Agric Food Chem* 1984; 32 (1): 123-7.
53. Krygier K, Sosulski F, Hogge L. Free esterified and bound phenolic acids. Extraction and purification. *J Agric Food Chem* 1982; 30 (2): 330-4.
54. Liggins J, Bluck LJC, Coward WA, Bingham SA. Extraction and quantification of daidzein and genistein in food. *Anal Biochem* 1998; 264 (1): 1-7.
55. Friedman M, Kozukue N, Harden LA. Cinnamaldehyde content in foods determined by gas chromatography-mass spectrometry. *J Agric Food Chem* 2000; 48 (11): 5702-9.
56. Hemes PJ, Hedges JI. Determination of condensed tannin monomers in environmental samples by capillary gas chromatography of acid depolymerization extracts. *Anal Chem* 2000; 72 (20): 5115-24.
57. Gómez-Alfonso S, Salvador MD, Fregapane J. Phenolic compounds profile of cornicabra virgin olive oil. *J Agric Food Chem* 2002; 50 (23): 6812-7.
58. Senter SD, Robertson JA, Meredith FI. Phenolic compounds of the mesocarp of cresthaven peaches during storage and ripening. *J Food Sci* 1989; 54 (5): 1259-62.
59. Ricardo da Silva JM, Rosec JP, Bourzeix M; Heredia N. Separation and quantitative determination of grape and wine procyanidins by high performance reversed phase liquid chromatography. *J Sci Food Agric* 1990; 53 (1): 85-92.
60. Tarnawski M, Depta K, Grejciun D, Szelepin B. HPLC determination of phenolic acids and antioxidant activity in concentrated peat extract – a natural immunomodulator. *J Pharm Biomed Anal* 2006; 41 (1):182-8.
61. Lamuela-Raventós RM, Romero-Perez AI, Waterhouse AL, Torre-Boronat MC. Direct HPLC analysis of cis and trans-resveratrol and piceid isomers in Spanish red *Vitis vinifera* wines. *J Agric Food Chem* 1995; 43 (2): 281-3.
62. Oszmianski J, Lee CY. Isolation and HPLC determinations of phenolic compounds in red grapes. *Am J Enol Vitic* 1990; 41 (3): 204-6.
63. Woodring PJ, Edwards PA, Chisholm MG. HPLC determination of non-flavonoid phenols in vidal blanc wine using electrochemical detection. *J Agric Food Chem* 1990; 38 (3): 729-42.
64. Chaviari G, Concialini V, Galletti GC. Electrochemical detection in the high performance liquid chromatographic analysis of plant phenolics. *Analyst* 1988; 113 (1): 91-4.
65. McMurtrey KD, Minn J, Pobanz k, Schultz TP. Analysis of wines for resveratrol using direct injection high-pressure liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Agric. Food Chem* 1994; 42 (10): 2077-80.
66. Tomás-Barberán FA, Gil MI, Cremin P, Waterhouse AL, Hess-Pierce B, Kader AA. HPLC-DAD-ESIMS Analysis of phenolic compounds in nectarines, peaches, and plums. *J Agric Food Chem* 2001; 49 (10): 4748-60.
67. Hammerstone JF, Lazarus SA, Mitchell AE, Rucker R, Schmitz HH. Identification of procyanidins in cocoa (*Theobroma cacao*) and chocolate using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *J Agric Food Chem* 1999; 47 (2): 490-6.

68. Romero C, Brenes M, Garcia P, Garrido A. Hydroxytyrosol 4-b-D-glucoside, an important phenolic compound in olive fruits and derived products. *J Agric Food Chem* 2002; 50 (13): 3835-9.
69. Goldberg DM, Yan J, Ng E, Diamandis EP, Karumanchiri A, Soleas G et al. Direct injection gas chromatographic mass spectrometric assay for trans-resveratrol. *Anal Chem* 1994; 66 (22): 3959-63.
70. Martínez-Ortega MV, García-Parrilla MC, Troncoso AM. Comparison of different sample preparation treatments for the analysis of wine phenolic compounds in human plasma by reversed phase high-performance liquid chromatography. *Anal Chem Acta* 2004; 502 (1): 49-55.
71. Mazza G. Anthocyanins and other phenolic compounds of Saskatoon berries. *J Food Sci* 1986; 51 (5): 1260-4.
72. Schmidtlein H, Herrmann K. Quantitative analysis for phenolic acids by thin-layer chromatography. *J Chrom* 1975; 115 (1): 123-8.
73. Schulz JM, Herrmann K. Analysis of hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acids in plant material. I. Sample preparation and thin-layer chromatography. *J Chrom* 1980; 195 (1): 85-94.
74. Pascual-Teresa S, Treutter D, Rivas-Gonzalo JC, Santos-Buelga C. Analysis of flavanols in beverages by high-performance liquid chromatography with chemical reaction detection. *J Agric Food Chem* 1998; 46 (10): 4209-13.
75. Carando S, Teissedre PL, Pascual-Martinez L, Cabanis JC. Levels of flavan-3-ols in french wines. *J Agric Food Chem* 1999; 47 (10): 4161-6.

Formação de óxidos de colesterol e alteração dos ácidos graxos em produtos cárneos

Formation of cholesterol oxides and modification of fatty acids in meat products

RIALA6/1096

Sueli R. BAGGIO¹, Neura BRAGAGNOLO^{2*}

* Endereço para correspondência: Universidade Estadual de Campinas, Departamento de Ciência de Alimentos, (C.P. 6121, CEP 13083-862, Campinas, SP, Brasil, Tel.: +55 19 3521-2160; Fax: +55 19 3521-2153. e-mail: neura@fea.unicamp.br

¹Instituto de Tecnologia de Alimentos - Centro de Química de Alimentos e Nutrição Aplicada

²Universidade Estadual de Campinas, Departamento de Ciência de Alimentos, Campinas, SP, Brasil.

Recebido: 01/02/2007 – Aceito para publicação: 30/04/2007

RESUMO

O processamento dos produtos cárneos pode ocasionar a oxidação do colesterol levando à formação de óxidos de colesterol, os quais estão associados ao surgimento de placas ateroscleróticas e a vários efeitos biológicos indesejáveis. Esta revisão integra dados sobre a presença de óxidos de colesterol, bem como os teores de colesterol, lipídios totais e ácidos graxos em produtos cárneos processados. O efeito do cozimento e do tempo de estocagem dos produtos cárneos na formação de óxidos de colesterol e alteração dos ácidos graxos também são abordados.

Palavras-chave. produtos cárneos, colesterol, óxidos de colesterol, ácidos graxos, revisão.

ABSTRACT

The processing of meat products can result in oxidation of the cholesterol leading to the formation of various compounds associated with the formation of arteriosclerotic plaque and to various undesirable biological effects. This review integrates data on the processing of meat products with those of cholesterol oxidation and the levels of cholesterol, cholesterol oxides, total lipids and fatty acids in processed meat products. The effects of cooking and storage in formation of cholesterol oxides and modification of fatty acids of processed meat products are present too.

Key words. meat products, cholesterol, cholesterol oxides, fatty acids, review.

INTRODUÇÃO

De acordo com a literatura existe uma relação direta entre os teores de colesterol, ácidos graxos saturados e *trans*, presentes na dieta com o nível do colesterol sanguíneo e, conseqüentemente, o desenvolvimento de aterosclerose^{1,2}. Os ácidos graxos *trans* são considerados mais prejudiciais que os saturados porque, além de aumentarem o nível de lipoproteínas de baixa densidade (LDL-colesterol), diminuem o nível de lipoproteínas de alta densidade (HDL-colesterol)³.

O colesterol é instável e passível de sofrer oxidação quando exposto a várias condições como temperaturas elevadas, ar, iniciadores de radicais livres, luz ou à combinação destes fatores. A autooxidação do colesterol é um processo de reações em cadeia, baseada na formação de radicais livres, idêntica à autooxidação dos lipídios insaturados⁴. A presença de ácidos graxos poliinsaturados, mais susceptíveis à oxidação nos alimentos, pode acelerar a oxidação do colesterol.

Os produtos da oxidação do colesterol possuem estruturas semelhantes ao colesterol, com grupos funcionais como hidroxila, cetona e epóxido adicionados no núcleo esterol e de hidroxila na cadeia lateral da molécula. Estes compostos podem entrar na circulação sanguínea como contaminantes de alimentos contendo colesterol ou como resultado da oxidação de lipoproteínas ou ainda como catabolismo intracelular⁵. Embora mais de 80 óxidos de colesterol foram identificados, os mais freqüentemente encontrados em alimentos são os derivados do núcleo esterol (7-cetocolesterol, 7-ceto; 7 α -hidroxicolesterol, 7 α -OH; 7 β -hidroxicolesterol, 7 β -OH; 5,6 α -epoxicolesterol, α -EP; 5,6 β -epoxicolesterol, β -EP e colestanoetriol, triol) e em menor extensão os da cadeia lateral (25-hidroxicolesterol, 25-OH; 20 α -hidroxicolesterol, 20 α -OH)⁶.

A presença de óxidos de colesterol nos alimentos é muito preocupante devido às implicações à saúde. De acordo com Hubbard et al.⁷, estudos realizados com 25-OH, 7 β -OH e triol em animais experimentais e estudos “in vitro” demonstraram efeitos citotóxicos destes óxidos de colesterol. Bössinger et al.⁸ mostraram que o 25-OH e o triol provocaram necroses em 25% das células musculares de aortas de coelhos brancos, dentro de 24 horas, usando uma concentração mínima de 10 μ g/mL destes óxidos em meio de cultura. Além disso, os produtos da oxidação do colesterol alteram as propriedades das membranas celulares como viscosidade, provocando distúrbios na interação entre o colesterol e os fosfolipídios das membranas, afetando as funções básicas das mesmas, como transporte de nutrientes, atividade das enzimas da membrana e equilíbrio osmótico. Os óxidos de colesterol também inibem a atividade da enzima 3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA (HMG-CoA) redutase^{7,8,9,10}.

A modificação oxidativa da LDL é uma hipótese da causa de aterosclerose devido à presença de vários produtos da oxidação do colesterol, tais como, 7-ceto e 7 β -OH^{11,12,13}. Os óxidos de colesterol contribuem para a formação de lesões arteriais “in vivo”, por aumentarem a permeabilidade vascular

à albumina e a outras macromoléculas, estimulando a agregação de plaquetas por alterações no equilíbrio das prostaglandinas e alterando a composição lipídica da LDL^{9,14}. Estes compostos também inibem a expressão dos receptores de LDL¹⁵ e reprimem o relaxamento do endotélio arterial¹⁶. Quantidades significantes de óxidos de colesterol foram identificados em tecidos humanos de aortas, plasma e fígado de indivíduos hipercolesterolêmicos e ateroscleróticos^{17,18,19,20}.

Os óxidos de colesterol também apresentam efeitos mutagênicos e carcinogênicos. Uma correlação positiva entre a formação de epóxidos e a incidência de câncer de ovário em ratas e de pele em ratos foi evidenciada²¹. Estudos “in vitro” também mostraram que os epóxidos apresentam efeito mutagênico²² e um estudo epidemiológico demonstrou a incidência de câncer de colon²³.

Os ácidos graxos também apresentam importante papel no tecido biológico, como constituintes lipídicos das membranas celulares, influenciam diretamente em certas propriedades, tais como, integridade, fluidez, permeabilidade e atividades de ligação enzima-membrana. No entanto, de acordo com o tipo de ácido graxo consumido na dieta, importantes implicações para o coração humano podem ser geradas, aumentando o risco de doenças cardiovasculares²⁴. Os ácidos graxos saturados podem afetar os níveis de lipídios plasmáticos de maneiras diferentes de acordo com o comprimento da cadeia sendo os ácidos láurico (C12:0), mirístico (C14:0) e palmítico (C16:0) considerados os mais preocupantes e hipercolesterolêmicos. Segundo Hayes et al.²⁵ o C14:0 é o mais hipercolesterolêmico e o C16:0 é o menos. O ácido esteárico (C18:0) tem efeito neutro no nível de colesterol sanguíneo, uma vez que é rapidamente convertido em ácido oléico (C18:1 ω 9), um ácido graxo monoinsaturado considerado hipocolesterolêmico. Os ácidos graxos saturados de cadeia curta (<C12) são metabolizados de maneira diferente dos ácidos graxos saturados de cadeia longa e são imediatamente consumidos antes de serem armazenados nos tecidos. A redução de ácidos graxos saturados de cadeia longa na dieta é desejável porque estes ácidos elevam a concentração de colesterol no soro sanguíneo e interferem com os receptores de LDL no fígado²⁶.

Os ácidos graxos insaturados compreendem tanto os ácidos graxos monoinsaturados quanto os poliinsaturados, que são formados pelas famílias de ácidos graxos ω 3, ω 6 e ω 9. A distinção entre eles é baseada na localização da primeira dupla ligação, contando a partir do último grupo metil da molécula de ácido graxo. Os ácidos graxos monoinsaturados são representados pelo ácido oléico (C18:1 ω 9), que pode ser sintetizado por todos os mamíferos, incluindo humanos. Ácidos graxos ω 3 e ω 6 são considerados essenciais, porque os humanos, assim como todos os mamíferos, não podem sintetizá-los e têm que retirá-los de sua dieta. O ácido graxo linoléico (C18:2 ω 6) representa os ácidos graxos ω 6 e o ácido linolênico (C18:3 ω 3) os ácidos graxos ω 3²⁷. O ácido linoléico, em humanos, pode ser convertido para ácido araquidônico (AA, C20:4 ω 6) e o ácido

linolênico, para ácido eicosapentaenóico (EPA, C20:5 ω 3) e ácido docosahexaenóico (DHA, C22:6 ω 3), através de enzimas Δ 6, Δ 5 e Δ 4-desaturases e alongamento de cadeia. Há evidências de que a Δ 6-desaturase decresce com a idade, e estudos afirmam que prematuros, hipertensos e diabéticos têm limitações na conversão de ácido linolênico para EPA e DHA^{28,29}.

Numerosos estudos em animais, investigações epidemiológicas e triagens clínicas têm mostrado que os ácidos graxos poliinsaturados ω 3 são importantes para as funções biológicas normais, e diminuem a quantidade de lipídios séricos^{30,31,32}. Além disso, os benefícios destes ácidos graxos estão associados à manutenção da integridade da membrana celular²⁴. Okuyama et al.³³ associaram a redução de risco ao câncer à suplementação alimentar com EPA e DHA.

Os ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa, como o AA e o EPA, localizados nas membranas celulares, são precursores de diferentes eicosanóides (prostaglandinas, tromboxanas e leucotrienos) que atuam como mensageiros da célula e reguladores metabólicos, cujas funções específicas são importantes no controle de doenças cardiovasculares³⁴.

Deve-se destacar que as duplas ligações dos ácidos graxos apresentam a estrutura conformacional *cis*, isto é, os radicais em relação às duplas ligações estão do mesmo lado. No entanto, quando os ácidos graxos *cis* ou os triacilgliceróis, que os contêm, são submetidos a algum processo enzimático, oxidativo ou de hidrogenação, ocorre a formação de isômeros geométricos em que os radicais relacionados às duplas ligações mudam de posição, ocorrendo a formação dos ácidos graxos *trans*. Nos produtos cárneos e lácteos, os ácidos graxos *trans* são componentes naturais, encontrados em pequenas quantidades, formados pela biohidrogenação através de enzimas (isomerases e hidrogenases) presentes na flora microbiota do rúmen de animais poligástricos³⁵. Em adição, os ácidos graxos *trans* podem estar presentes em quantidades maiores em uma grande variedade de alimentos, como os óleos vegetais, margarinas, gordura hidrogenada e nos alimentos que utilizam estes produtos na formulação.

COLESTEROL E ÓXIDOS DE COLESTEROL EM PRODUTOS CÁRNEOS PROCESSADOS

Colesterol

O colesterol é um componente importantíssimo das membranas celulares dos animais e está presente nas carnes em quantidades variáveis, devido a uma série de fatores, tais como a espécie animal, a raça, o sexo, a idade, o sistema de criação e alimentação.

Produtos processados de carne de peru (“blanquete”, salsicha, presunto, hambúrguer, almôndegas, “roulé”, peito defumado e presunto defumado) apresentaram teores relativamente baixos de colesterol, variando de 32 a 43 mg/100g³⁶. No entanto, King et al.³⁷ encontraram valores muito superiores, variando de 116 a 144 mg/100g, quando analisaram presunto, pastrame e carne de peru moída.

Baggio e Bragagnolo³⁸ obtiveram teores de colesterol em produtos processados de carne de frango (salsicha, lingüiça e mortadela) e de Chester® (mortadela, salsicha, hambúrguer e lingüiça) variando de 31 no hambúrguer a 64mg/100g na salsicha de Chester®, enquanto que Pereira et al.³⁹ encontraram teores de 44mg/100g em lingüiças de frango e de Chester®, e de 51mg/100g em lingüiças tipo comum. No entanto, Zanardi et al.⁴⁰ encontraram valores maiores de colesterol em lingüiça maturada (66-97mg/100g).

Novelli et al.⁴¹ quantificaram colesterol em quatorze amostras de salame tipo Milano e onze amostras de mortadela suína, variando de 34 a 119 mg/100g no salame Milano e de 52 a 138mg/100g na mortadela suína. Por outro lado, Lercker e Rodriguez-Estrada⁴² obtiveram valores de 19,3 a 74,7mg/100g em dez amostras de salame.

Baggio⁴³ analisou amostras de produtos cárneos processados bovinos (almôndega, hambúrguer e “jerked beef”), suínos (lingüiça toscana, presunto e apresuntado) e de composição carne mista (salsicha “hot-dog”, mortadela e salame tipo Italiano) e obtiveram teores de colesterol variando de 29 no hambúrguer a 59 mg/100g no salame tipo Italiano. Em outro estudo, Baggio e Bragagnolo⁴⁴ verificaram que o tempo de armazenamento de 90 dias para as amostras de mortadela e 120 dias para as amostras de “jerked beef” e salame, não alterou o teor de colesterol nestes produtos, apresentando uma variação de 40 a 46 mg/100g no “jerked beef”, de 48 a 57 mg/100g no salame, de 45 a 50 mg/100g na mortadela de frango e de 46 a 53 mg/100g na mortadela de Chester® durante o armazenamento.

Rodriguez-Estrada et al.⁴⁵ verificaram o efeito de diferentes métodos de cozimento (assado, microondas, microondas e assado, grelhado, cozido e frito) sobre o teor de colesterol em hambúrguer bovino. O hambúrguer cru apresentou teor de 83 mg/hambúrguer enquanto os hambúrgueres submetidos ao preparo térmico variaram de 49 no hambúrguer cozido a 73 mg/hambúrguer no hambúrguer frito. Larkeson et al.⁴⁶ determinaram teores de colesterol em amostras de almôndegas (50% de carne bovina + 50% de carne suína) e hambúrgueres bovinos crus e pré-fritos. Nas amostras de almôndegas cruas e pré-fritas os teores de colesterol obtidos foram 39 e 33 mg/100g, respectivamente, e encontraram teores de 46 mg/100g nas amostras de hambúrgueres crus e 29 mg/100g nos hambúrgueres pré-fritos. Baggio e Bragagnolo⁴⁷ estudaram o efeito do preparo térmico (assado, grelhado e cozido) sobre o teor de colesterol em produtos cárneos processados bovinos (almôndega e hambúrguer), suíno (lingüiça), de frango (salsicha e lingüiça), de Chester® (salsicha, hambúrguer e lingüiça) e de composição carne mista (salsicha “hot-dog”). Os teores de colesterol, na base seca, apresentaram diferença significativa apenas entre a lingüiça suína crua e grelhada e entre o hambúrguer de Chester® cru e grelhado, sendo menor nas amostras grelhadas. Os teores de colesterol foram sempre maiores nas amostras cruas, embora não significativamente diferentes. Os teores de colesterol

encontrados nas amostras preparadas termicamente variaram de 28 na almôndega bovina assada a 61 mg/100g na salsicha de Chester[®] cozida.

Óxidos de Colesterol

Os óxidos de colesterol podem ser formados durante o processamento e o preparo do alimento quando exposto a temperaturas elevadas, ar, luz, oxigênio, radiação ou à combinação destes fatores⁴⁷. Além disso, pH, atividade de água e a presença de ácidos graxos insaturados são fatores que também influenciam a formação dos óxidos de colesterol durante o processamento e o armazenamento dos alimentos⁴⁸. Em adição, condições impróprias de armazenamento podem facilitar a formação dos produtos da oxidação do colesterol⁴⁹.

Os procedimentos de processamento podem levar à oxidação dos lipídios presentes na carne e em seus produtos processados por várias maneiras. O tratamento térmico tem efeitos negativos na estrutura celular, pois provoca a desnaturação das proteínas, principalmente da globina, deixando o íon ferro⁺² mais susceptível à oxidação com liberação de oxigênio molecular da oximioglobina presente nos músculos, produzindo desta maneira as condições para a produção de peróxidos de hidrogênio. Fragmentando, picando e misturando a carne, desfaz-se a estrutura muscular da mesma, aumentando a superfície de exposição ao oxigênio e a outros catalisadores da oxidação, o que pode dar origem a radicais livres desencadeando as reações de oxidação do colesterol⁴¹.

Novelli et al.⁴¹ encontraram 4 óxidos em amostras de salame tipo Milano e de mortadela suína. O 7 β -OH foi detectado em duas amostras de salame (13,5 e 15,8 μ g/g) e uma amostra de mortadela (6,4 μ g/g); o α -EP foi encontrado em cinco amostras de salame (0,5-9,5 μ g/g) e esteve ausente em apenas uma amostra de mortadela (1,6-6,2 μ g/g); o 7-ceto foi determinado em sete amostras de salame (0,4-2,6 μ g/g) e cinco amostras de mortadela (0,6-18,7 μ g/g) e o 25-OH não foi detectado nas amostras de mortadela, sendo encontrado em apenas três amostras de salame (0,7, 1,4 e 2,6 μ g/g).

Schmarr et al.⁵⁰ estudaram dois tipos de salame (A e B) e encontraram 7 α -OH (2,2 no salame A e 0,4 μ g/g no salame B), 7 β -OH (0,9 no salame A e 0,4 μ g/g no salame B), 20 α -OH (0,3 μ g/g no salame A e não detectado no salame B), α -EP (0,7 μ g/g no salame A e não detectado no salame B), β -EP (0,5 no salame A e 0,4 μ g/g no salame B) e 7-ceto (1,1 no salame A e 0,6 μ g/g no salame B). Valores maiores de 7-ceto foram obtidos em amostras de salame⁴², variando de 0,7 a 4,5 μ g/g.

Rodriguez-Estrada et al.⁴⁵ observaram que o preparo térmico, embora tenha diminuído o conteúdo de 7-ceto em relação à amostra crua (25,2 μ g/g de lipídios), variou de 16,4 no hambúrguer cozido a 22,0 μ g/g de lipídios no hambúrguer preparado pela combinação microondas + assado. Por outro lado, Larkeson et al.⁴⁶ verificaram que os teores de óxidos de colesterol em almôndegas e hambúrguer crus (7,0-10,0 μ g/g de lipídio) aumentaram quando foram fritos (29,0 μ g/g de

lipídio) e estocados no escuro a 4°C por uma e duas semanas (42,0 e 50,0 μ g/g de lipídio, respectivamente).

Osada et al.⁵¹ detectaram 4 óxidos de colesterol em amostras de lingüiça, presunto cru e assado, salame e bacon. Os teores de 7 β -OH + β -EP variaram de 1,1 no bacon a 4,7 μ g/g na lingüiça, o α -EP variou de 0,8 no presunto cru a 3,8 μ g/g na lingüiça, triol variou de 0,5 no presunto cru a 3,7 μ g/g na lingüiça e os teores de 7-ceto variaram de 7,1 no bacon a 12,0 μ g/g no presunto assado. Por outro lado, Baggio et al.³⁶ pesquisaram 7 óxidos em produtos processados de carne de peru ("blanquete", salsicha, presunto, hambúrguer, almôndegas, "roulé", peito defumado e presunto defumado) e encontraram apenas 7-ceto e β -EP com teores variando de 0,3 a 1,8 μ g/g e de 0,8 a 4,5 μ g/g, respectivamente. No entanto, Sander et al.⁵² analisando amostras de carnes liofilizadas de carne de frango, bovina e de peru encontraram além destes óxidos, o 7 β -OH e α -EP e em valores superiores devido provavelmente a baixa atividade de água das amostras que facilita a interação do colesterol com o oxigênio e com os metais.

Torres et al.⁵³ determinaram óxidos de colesterol em amostras de charque preparadas com sal refinado, sal grosso e sal refinado com adição de BHA/BHT após trinta dias de estocagem em temperatura ambiente. No charque preparado com sal refinado encontraram 7-ceto (5,5 μ g/g) e triol (1,8 μ g/g), no charque preparado com sal grosso 7 β -OH (3,2 μ g/g), 7-ceto (5,1 μ g/g) e triol (3,9 μ g/g), no charque preparado com sal refinado + BHA/BHT obtiveram 7 β -OH (0,4 μ g/g), 7-ceto (0,9 μ g/g), 4 β -OH (0,8 μ g/g) e α -EP (1,0 μ g/g). Embora, encontraram um maior número de óxidos nas amostras de charque preparado com sal refinado + BHA/BHT os valores foram menores que no charque preparado com sal refinado sem antioxidante. Baggio⁴³ analisando 126 amostras de produtos cárneos processados, 45 bovinos (almôndega, hambúrguer e "jerked beef"), 36 suínos (lingüiça toscana, presunto e apresuntado) e 45 de composição cárnea mista (salsicha "hot-dog", mortadela e salame tipo Italiano) encontraram apenas 7-ceto em quatro amostras (3,2 μ g/g de hambúrguer bovino; 1,6 e 2,0 μ g/g de salsichas "hot-dog" e 2,6 μ g/g de mortadela).

Baggio e Bragagnolo^{44,47} observaram que tanto no estudo realizado sobre o efeito do preparo térmico, quanto no estudo sobre o efeito do tempo de estocagem, não houve formação de óxidos de colesterol nos produtos cárneos processados analisados. Considerando que o 7-ceto é um indicador do processo oxidativo, pode-se considerar que nas amostras analisadas não ocorreu degradação da fração lipídica devido provavelmente, a presença do antioxidante eritorbato de sódio presente nas amostras. Segundo Tai et al.⁵⁴, o uso de antioxidante nas formulações e também o emprego de embalagens apropriadas, proporcionando uma barreira física ao ar e à luz, podem impedir a formação de produtos de oxidação do colesterol. Park e Addis⁵⁵ também não encontraram óxidos de colesterol nas amostras analisadas de fígado fresco, cérebro fresco, músculo bovino, frango frito, hambúrguer grelhado, "jerked beef" e lingüiça de fígado.

Higley et al.⁵⁶ encontraram valores bem mais elevados de óxidos de colesterol tanto em produtos cozidos como em produtos crus obtendo valores de até 1869µg/g. No entanto, os resultados não foram confirmados por espectrometria de massas. Dentre os trabalhos citados, somente os de Novelli et al.⁴¹, de Schmarr et al.⁵⁰, de Sander et al.⁵², de Baggio et al.³⁶, Baggio⁴³ relatam a realização da confirmação dos óxidos de colesterol através da espectrometria de massas.

LIPÍDIOS TOTAIS E ÁCIDOS GRAXOS EM PRODUTOS CÁRNEOS PROCESSADOS

A relação entre dieta e saúde está amplamente difundida e os clínicos gerais, cardiologistas e nutricionistas recomendam uma dieta equilibrada, ou seja, com baixo teor de lipídios totais e ácidos graxos saturados e maior taxa de ácidos graxos monoinsaturados e poliinsaturados.

Zanardi et al.⁴⁰ encontram valores elevados de lipídios totais em lingüiça variando de 32 a 43g/100 g. Novelli et al.⁴¹ verificaram que os teores de lipídios totais variaram de 26 a 36g/100g no salame tipo Milano e de 23 a 35g/100g na mortadela. Baggio⁴³ obteve teores de lipídios totais variando de 3 no presunto a 25g/100g no salame tipo Italiano quando analisaram amostras de produtos cárneos processados bovinos (almôndega, hambúrguer e “jerked beef”), suínos (lingüiça toscana, presunto e apresuntado) e de composição carne mista (salsicha “hot-dog”, mortadela e salame tipo Italiano). Valores menores foram obtidos por Lercker e Rodriguez-Estrada⁴² em salame, com teores variando de 19 a 25g/100g. No entanto, em amostras de almôndegas (50% de carne bovina + 50% de carne suína) e hambúrgueres bovinos, Larkeson et al.⁴⁶ encontraram teores de lipídios variando de 7 nas almôndegas cruas a 17g/100g nos hambúrgueres. Em produtos processados de carne de frango (salsicha, lingüiça e mortadela) e de Chester® (mortadela, salsicha, hambúrguer e lingüiça), os teores variaram de 8 na salsicha de Chester® a 19g/100g na mortadela de frango³⁸. Por outro lado, valores menores foram encontrados em produtos processados de carne de peru (“blanquete”, salsicha, presunto, hambúrguer, almôndegas, “roulé”, peito defumado e presunto defumado) com teores variando de 1 no peito defumado a 14 g/100g nas almôndegas³⁶. Pereira et al.³⁹ também encontraram teores de lipídios totais menores nas amostras de lingüiça de carne de peru (4g/100g) e maiores nas amostras de lingüiça tipo comum (17g/100g).

O efeito do preparo térmico (assado, grelhado e cozido) causou redução no teor de lipídios totais no hambúrguer bovino, diminuindo de 32 (hambúrguer cru) para 26g/100g (hambúrguer grelhado). Entretanto, nos demais produtos cárneos analisados (salsicha cozida na água, almôndega assada) não houve diferença significativa entre as amostras cruas e preparadas termicamente⁴⁷. Rodriguez-Estrada et al.⁴⁵ também encontraram maiores teores de lipídios nos

hambúrgueres crus (14g/100g) do que nos grelhados e cozidos. Entre os diferentes métodos de cozimento pesquisados (grelhado, cozido e frito) verificaram que tanto para o hambúrguer grelhado como para o cozido (11g/100g) os teores de lipídios foram menores que para o hambúrguer frito (12g/100g).

Baggio e Bragagnolo⁴⁴ observaram que o tempo de armazenamento de três meses para amostras de mortadela de frango e de Chester®, e de quatro meses para as amostras de “jerked beef” e salame Italiano, não alterou o teor de lipídios totais.

Os principais ácidos graxos encontrados em lingüiças tipo comum, lingüiças de carne de frango, Chester® e peru, de acordo com Pereira et al.³⁹, foram C18:1ω9, C16:0, C18:2ω6, C18:0 e C16:1ω7. Baggio⁴³ identificou, além destes, o C14:0 como principais em produtos cárneos bovinos, suínos e de composição mista, sendo que os de produtos processados de carne bovina apresentaram maior teor de C18:0 e menor de C18:2ω6. Torres et al.⁵³ encontraram os mesmos ácidos graxos em charque com exceção do C16:1ω7. Em amostras de produtos processados de carne frango e de Chester^{®38}, o C20:4ω6 e o C18:3ω3, e de produtos processados de peru, o C20:4ω6, foram encontrados também como principais.

Teores de ácidos graxos saturados^{36,38,43}, variando de 10 a 6g/100g, foram encontrados em amostras de salame italiano (composição mista), lingüiça suína, mortadela mista e de frango, almôndega bovina, hambúrguer bovino, salsicha mista. Valores menores que 6 e maiores que 2g/100g foram encontrados em mortadela de Chester®, hambúrguer de peru, almôndega bovina, salsicha de frango, de Chester® e de peru, lingüiça de Chester® e “jerked beef”. Valores menores que 2g/100g foram encontrados em produtos de peru (“blanquete”, “roulé”, peito defumado, presunto, presunto defumado) e presunto suíno.

Os teores de ácidos graxos monoinsaturados^{36,38,43} foram maiores (entre 10 a 6g/100g) nas amostras de salame italiano, mortadela mista, de Chester® e de frango, salsicha suína, hambúrguer bovino, lingüiça de Chester® e almôndega de peru. Valores menores que 6 e maiores que 2g/100g foram obtido em almôndega bovina, hambúrguer de Chester®, salsicha de Chester®, de frango e de peru, lingüiça de frango, presunto de peru defumado, “jerked beef” e “blanquete” de peru. Valores menores que 2g/100g foram encontrados em apresentado suíno e produtos de peru (peito defumado, presunto e “roulé”).

As amostras de salame italiano, mortadela mista, de Chester® e de frango, salsicha mista, lingüiça suína, salsicha de frango e peito de peru defumado apresentaram teores de ácidos graxos poliinsaturados^{36,38,43} variando entre 5 a 3g/100g. Valores menores que 3 e maiores que 1 foram encontrados em hambúrguer bovino, de Chester® e de peru, almôndegas bovinas e de peru, lingüiça de Chester®, apresuntado suíno e salsicha de Chester® e de peru, enquanto que, valores menores que 1g/100g foram obtidos em presunto suíno e “jerked beef”.

Ácidos graxos *trans*^{36,38,43} foram encontrados em quantidades variando de 0,7 a 0,2g/100g em amostras de hambúrguer e almôndega tanto de peru quanto bovina. No entanto, nos demais produtos analisados quantidades abaixo de 0,2 g/100g foram obtidas.

Rodriguez-Estrada et al.⁴⁵ não encontraram diferença significativa nos teores de ácidos graxos saturados (48-49%) e monoinsaturados (48%) entre as amostras de hambúrguer cru e preparadas termicamente, enquanto que os ácidos graxos poliinsaturados sofreram alterações significativas entre as amostras, variando de 3% no hambúrguer cru a 4% no hambúrguer preparado por microondas + assado e no hambúrguer grelhado. Por outro lado, Baggio e Bragagnolo⁴⁷ verificaram que a composição de ácidos graxos não apresentou alteração significativa com o preparo térmico em produtos processados bovinos, suínos, de frango e de Chester[®]. O tempo de armazenamento também não teve efeito na composição de ácidos graxos em produtos cárneos estocados durante 90 e 120 dias⁴⁴.

CONCLUSÃO

Os estudos sobre óxidos de colesterol em produtos cárneos processados são escassos na literatura e os resultados às vezes conflitantes. Em geral pode-se dizer que: 1) entre os óxidos de colesterol formados, o 7-ceto é o de maior predominância; 2) os óxidos de colesterol considerados mais citotóxicos, 25-OH e triol, são encontrados apenas em algumas amostras e 3) diferentes óxidos de colesterol são encontrados, os quais divergem de autor para autor.

Os teores de colesterol em produtos processados de carne variam largamente, no entanto, verifica-se que os teores em carne suína e de peru são os menores, seguidos dos de carne bovina e, por último, os de frango e Chester[®].

Considerando que os produtos que contêm acima de 5g/100g de lipídios totais são classificados como alimentos com alto teor de gordura, a maioria dos produtos cárneos se enquadram nesta classificação.

Os lipídios totais, ácidos graxos saturados e monoinsaturados demonstraram que não são influenciados pelo tratamento térmico e pela estocagem, entretanto, o mesmo não ocorre com os ácidos graxos poliinsaturados, sendo necessário maiores estudos para elucidar melhor as condições que produzem mudanças nestes ácidos graxos e na formação de óxidos de colesterol em alimentos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento e Pesquisa (CNPq), pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

1. Kwiterovich PO. The effect of dietary fat, antioxidants, and pro-oxidants on blood lipids, lipoproteins, and atherosclerosis. *J Am Diet Assoc* 1997, 97(7): 31-43.
2. Roberts WC. Atherosclerosis risk factors are there ten, or is there only one? *Atherosclerosis* 1992, 79: 1146-8.
3. Lambertson G. *Trans* fatty acids topic for Lipidforum. *Am Oil Chem Soc* 1992, 3: 196-207
4. Smith LL. Cholesterol Autoxidation. *Chem Phys Lipids* 1987, 44: 87-125.
5. Morel DW, Chen IL. Cellular biochemistry of oxysterols derived from the diet or oxidation in vivo. *Nutr Biochem* 1996, 7: 495-506.
6. Finocchiaro ET, Richardson T. Sterol oxides in foodstuffs: A Review. *J Food Prot* 1983, 46: 917-29.
7. Hubbard RW, Ono Y, Sanchez A. Atherogenic effect oxidized products of cholesterol. *Progr Food Nutr Sci* 1989, 13: 17-44.
8. Bössinger S, Luf W, Brandl E. Oxysterols: Their occurrence and biological effects. *Int Dairy J* 1993, 3: 1-33.
9. Guardiola F, Codony R, Addis PB, Rafecas M, Boatella B. Biological effects of oxysterols: current status. *Food Chem Toxicol* 1996, 34: 193-8.
10. Peng SK, Morin RG. Effects on membrane function by cholesterol oxidation derivatives in cultured aortic smooth muscle cells. *Nutr Diet* 1987, 14: 85-94.
11. Chisolm GM, Ma GP, Irwin KC, Martin LL, Gunderson KG, Linberg LF, Morel DW, DiCorleto PE. 7b-Hydroxycholesterol a component of human atherosclerotic lesions is the primary cytotoxin of oxidized human low density lipoprotein. *Atheroscler* 1994, 91:11452-65.
12. Dzeletovic S, Breuer O, Lund E, Diczfalusy U. Determination of cholesterol oxidation products in human plasma by isotope dilution – mass spectrometry. *Anal Biochem* 1995, 225: 73-81.
13. Hughes H, Mathews B, Lenz ML, Guyton JR. Cytotoxicity of oxidized LDL to porcine smooth muscle cells is associated with the oxysterol 7-ketocholesterol and 7-hydroxycholesterol. *Arterioscler Thromb* 1994, 14: 1177-91.
14. Rong JX, Rangaswamy S, Shen L, Dave R, Chang YH, Peterson H, Hodis H, Chisolm GM, Sevastian A. Arterial injury by cholesterol oxidation products cause endothelial dysfunction and arterial wall cholesterol accumulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998, 18: 1885-94.
15. Peng SK, Zhang X, Chai NN, Wan Y, Morin RJ. Inhibitory effect of cholesterol oxides on low density lipoprotein receptor gene expression. *Artery* 1996, 22: 61-79.
16. Deckert V, Viens L, Lizard G, Athias A, Lallemand C, Gambert P, Lagrost L. Inhibitors of arterial relaxation among components of human oxidized low-density lipoproteins. Cholesterol derivatives oxidized in position 7 are potent inhibitors of endothelium-dependent relaxation. *Circulation* 1997, 95: 723-31.

17. Bjorkhem I, Oftebro H, Skrede S, Pedersen JI. Assay of intermediates in bile acid synthesis using isotope dilution-mass spectrometry: hepatic levels in the normal state and in cerebrotendinous xanthomatosis. *J Lipid Res* 1981, 22: 191-8.
18. Javitt NB, Kok E, Burstein S, Cohen B, Kutscher J. 26-Hydroxycholesterol. Identification and quantitation in human serum. *J Biol Chem* 1981, 256: 12644-56.
19. Kumar N, Singhal OP. Cholesterol oxides and atherosclerosis: a review. *J Sci Food Agric* 1991, 55: 497-511.
20. Spencer TA, Gayen AK, Phirwa S, Nelson JA, Taylor FR, Kandutsch AA, Erickson SK. 24(S)-, 25-Epoxycholesterol. Evidence consistent with a role in the regulation of hepatic cholesterol-genesis. *J Biol Chem* 1985, 260: 13391-8.
21. Black HS, Douglas DR. A model system for the evaluation of the role of cholesterol oxide in ultraviolet carcinogenesis. *Cancer Res* 1972, 32: 2630-2.
22. Sevanian A, Peterson AR. Cholesterol epoxide is direct acting mutagen. *Proc Nat Acad Sci* 1984, 81: 4198-205.
23. Sevanian A, Peterson AR. The cytotoxic and mutagenic properties of cholesterol oxidation products. *Food Chem Toxicol* 1986, 24: 1103-9.
24. Eder K. Gas chromatographic analysis of fatty acid methyl esters. *J Chromatogr* 1995, 671: 113-31.
25. Hayes KC, Pronczuk A, Lindsey S, Diersen-Schade D. Dietary saturated fatty acids (12:0, 14:0, C16:0) differ in their impact on plasma cholesterol and lipoproteins in nonhuman primates. *Am J Clin Nutr* 1991, 53: 491-502.
26. Sinclair AJ. Dietary and cardiovascular disease: the significance of recent developments for the food industry. *Food Australia* 1993, 45: 226-31.
27. Christie WW. Equivalent chain-lengths of methyl esters derivatives of fatty acids on gas chromatography. *J Chromatogr* 1988, 447: 305-14.
28. Carlson SE, Rhodes PG, Ferguson MG. Docosahexaenoic acid status of preterm infants at birth and following feeding with human milk or formula. *Am J Clin Nutr* 1986, 44: 798-804.
29. De Gomes, Dumm INT, Brenner RR. Oxidative desaturation of alpha-linolenic, linoleic, and stearic acids by human liver microsomes. *Lipids* 1975, 10: 315-7.
30. Greene DHS, Selivonchick DP. Lipid metabolism in fish. *Prog Fish Res* 1987, 26: 53-85.
31. Simopoulos AP. Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. *Am J Clin Nutr* 1991, 54: 438-63.
32. Weaver BJ, Holob BJ. Health effects and metabolism of dietary eicosapentaenoic acid. *Prog Food Nutr Sci* 1988, 12: 111-50.
33. Okuyama H, Kobayashi T, Watanabe S. Dietary fatty acids the n-6/n-3 balance and chronic elderly diseases. Excess linoleic acid and relative n-3 deficiency syndrome seen in Japan. *Prog Lipid Res* 1997, 35(4): 409-57.
34. Metcalfe LD, Schmitz AA, Pelka JR. Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas chromatographic analysis. *Anal Chem* 1966, 38: 514-5.
35. Smith LM, Dunkley WL, Franke A, Daiiking T. Measurement of *trans* and other isomeric insaturated fatty acid in butter and margarine. *J Am Oil Chem.Soc* 1978, 55: 257-61.
36. Baggio SR, Miguel AMR, Bragagnolo N. Simultaneous determination of cholesterol oxides, cholesterol and fatty acids in processed turkey meat products. *Food Chem* 2005, 89: 475-84.
37. King AJ, Paniangvait P, Jones AD, German JB. Rapid method for quantification of cholesterol in turkey meat and products. *J Food Sci* 1998, 63(3): 382-5.
38. Baggio SR, Bragagnolo N. Fatty acids, cholesterol oxides and cholesterol in processed chicken products. *Ital J Food Sci* 2006, 2: 199-208.
39. Pereira NR, Tarley CRT, Matsushita M, Souza NE. Proximate composition and fatty acid profile in Brazilian poultry sausages. *J Food Comp Anal* 2000, 13: 915-20.
40. Zanardi E, Dirigoni V, Badiani A, Chizzolini R. Lipid and colour stability of Milano-type sausages: effect of packing conditions. *Meat Sci* 2002, 61: 7-14.
41. Novelli E, Zanardi E, Ghiretti GP, Campanini G, Dazzi G, Madarena G, Chizzolini R. Lipid and cholesterol oxidation in frozen stored pork, salame milano and mortadella. *Meat Sci* 1998, 48: 29-40.
42. Lercker G, Rodriguez-Estrada MT. Cholesterol oxidation: presence of 7-ketocholesterol in different food products. *J Food Comp Anal* 2000, 13: 625-31.
43. Baggio SR. Óxidos de colesterol, colesterol, lípidios totais e ácidos graxos em produtos cárneos processados. 2004. 199f. Dissertação (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP. 2004.
44. Baggio SR, Bragagnolo N. Cholesterol oxide, cholesterol, total lipid and fatty acid contents in processed meat products during storage. *Lebesm-Wiss u-Technol* 2006, 39: 513-520.
45. Rodriguez-Estrada MT, Penazzi G, Caboni MF, Bertacco G, Lercker G. Effect of different cooking methods on some lipid and protein components of hamburguers. *Meat Sci* 1997, 45: 365-75.
46. Larkeson B, Dutta PC, Hansson I. Effects of frying and storage on cholesterol oxidation in minced meat products. *J Am Oil Chem Soc* 2000, 77: 675-80.
47. Baggio SR, Bragagnolo N. The effect of heat treatment on the cholesterol oxides, cholesterol, total lipid and fatty acid contents of processed meat products. *Food Chem* 2006, 95: 611-9.
48. Dionisi F, Golay PA, Aeschlimann JM, Fay LB. Determination of cholesterol oxidation products in milk powders: Methods comparison and validation. *J Agric Food Chem* 1998, 46: 2227-39.

49. Paniangvait P, King AJ, Jones AD, German BG. Cholesterol oxides in foods of animal origin. *J Food Sci* 1995, 60(6): 1159-74.
50. Schmarr HG, Gross HB, Shibamoto T. Analysis of polar cholesterol oxidation products: evaluation of a new method involving transesterification, solid phase extraction, and gas chromatography. *J Agric Food Chem* 1996, 44: 512-7.
51. Osada K, Hoshima S, Nakamura S, Sugano M. Cholesterol oxidation in meat products and its regulation by supplementation of sodium nitrite and apple polyphenol before processing. *J Agric Food Chem* 2000, 48: 3823-9.
52. Sander BD, Addis PB, Park SW, Smith DE. Quantification of cholesterol oxidation products in a variety of foods. *J Food Prot* 1989, 52: 109-14.
53. Torres E, Pearson AM, Gray JI, Ku PK. Lipid oxidation in charqui (salted and dried beef). *Food Chem* 1989, 32: 257-68.
54. Tai CY, Chen YC, Chen BH. Analysis, formation and inhibition of cholesterol oxidation products in foods: An overview (Part I). *J Food Drug Anal* 1999, 7 (4): 243-58.
55. Park SW, Addis PB. HPLC determination of C7 oxidized cholesterol derivatives in foods. *J Food Sci* 1985, 50: 1437-44.
56. Higley NA, Taylor SL, Herian AM, Lee K. Cholesterol Oxides in Processed Meats. *Meat Sci* 1986, 16: 174-81.

Comparação da eficiência dos caldos *Escherichia coli* e caldo verde brilhante lactose bile na enumera o de coliformes termotolerantes em leite e sorvete de massa

Efficiency of *Escherichia coli* liquid culture medium and brilliant green-bile salt lactose broth for counting thermotolerant coliforms in milk and ice cream samples

RIALA6/1097

Roberta Teresa RIZZO-BENATO^{1*}, Cláudio Rosa GALLO¹

*Endereço para correspondência: ¹Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutri o - ESALQ/USP Av: Pádua Dias, 11. Cep: 13418-900. C.P. 09. Piracicaba - SP, e-mail: rorizzo@esalq.usp.br
Recebido: 03/03/2006 - Aceito para publica o: 18/05/2006

RESUMO

Foi realizada a compara o entre os caldos *Escherichia coli* - EC (Difco 0314-01-0) e Caldo Verde Brilhante Lactose Bile 2% - CVBLB (Difco 0007-01-2) utilizados como teste confirmativo para a detec o de coliformes termotolerantes em amostras de leite pasteurizado tipo C e sorvete. Com base nos resultados obtidos, pode-se afirmar que houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os dois meios de cultura quanto   contagem do NMP de coliformes termotolerantes. Outrossim, 58,3% das amostras de leite e 19,4% das amostras de sorvetes apresentaram valores de contagem de coliformes termotolerantes em desacordo com os tolerados pela legisla o (ANVISA, 2001), quando as amostras analisadas foram cultivadas em meio de CVBLB. Ao empregar o caldo EC para o cultivo das amostras, 70,8% das amostras de leite e 30,6% das amostras de sorvetes apresentaram NMP de coliformes termotolerantes em desacordo com os permitidos pela legisla o.

Palavras-chave. leite, sorvete, coliformes termotolerantes, caldo *Escherichia coli*, caldo verde brilhante lactose bile 2%, número mais provável.

ABSTRACT

Efficiency of *Escherichia coli* broth - EC (Difco 0314-01-0) and Brilliant Green Bile Lactose broth 2% - BGB (Difco 0007-01-2) used as confirmation testing for detecting thermotolerant coliform in milk and ice cream samples was compared. The total and thermotolerant coliforms counting in analyzed samples were carried out following the Brazilian legislation (ANVISA, 2001). Based on the obtained results, 58.3% of milk samples and 19.4% of ice cream samples analyzed for thermotolerant coliforms counting by culturing on BGB, and 70.8% and 30.6% of respective foods cultivated on EC broth were in disagreement with values established by the Brazilian legislation. A significant difference ($p < 0.05$) between the EC and BGB culture media as for thermotolerant coliforms counting was observed.

Key words. milk, ice cream, thermotolerant coliforms, *Escherichia coli* broth, Brilliant Green Lactose broths 2%, most probable number.

INTRODUÇÃO

O sorvete tornou-se um dos principais produtos das indústrias de leite e de grande interesse público¹.

Ainda hoje, os gelados comestíveis não têm sido considerados como uma séria fonte de infecção bacteriana, por se constituir de um alimento congelado, porém, a resistência de microrganismos ao congelamento é muito variável, pois o congelamento não provoca necessariamente morte de todos os microrganismos presentes e muitos sobrevivem em diferentes estados fisiológicos^{2,3}.

As fontes de contaminação mais comuns são matérias-primas, instalações, equipamentos, utensílios e manipuladores. Os microrganismos contaminantes de um alimento podem ainda se multiplicar por falhas durante o processamento, em etapas anteriores ao congelamento e permanecerem viáveis no produto³.

A microbiota dos sorvetes, antes do tratamento térmico, está relacionada com os ingredientes utilizados, sendo que de acordo com a legislação todos os gelados comestíveis elaborados com laticínios ou ovos serão obrigatoriamente pasteurizados⁴.

Apesar dos sorvetes a base de leite serem um produto que passa pelos processos de pasteurização, maturação no frio, congelação e endurecimento, pode conter microrganismos patogênicos e deteriorantes⁵.

A contaminação do leite pode ocorrer na ordenha e durante toda a cadeia de produção até a distribuição, portanto a qualidade de todos os produtos derivados do leite dependerá, basicamente, das condições microbiológicas da matéria-prima⁶, as quais devem ser tão bem controladas quanto o processo de produção⁵.

Qualquer ingrediente contaminado, utilizado na fabricação do sorvete, pode influenciar na qualidade do produto acabado, principalmente se esta é avaliada pelo número de bactérias que contém, ou por conter espécies de bactérias indesejáveis, tais como os coliformes⁷.

Cerca de 95% dos coliformes existentes nas fezes humanas e outros animais são *E. coli*, e dentre as bactérias de *habitat* reconhecidamente de origem fecal, no grupo dos coliformes termotolerantes, a *E. coli*, embora também possa ser introduzida a partir de fontes não fecais, é o melhor indicador de contaminação fecal conhecido até o momento, pois satisfaz todas as exigências de um indicador ideal. Por estes motivos, as tendências atuais se direcionam no sentido da detecção específica de *E. coli*, com o desenvolvimento de diversos métodos que permitam a enumeração rápida desta espécie diretamente⁸. Sua presença nos alimentos tem um significado importante, indica as condições higiênico-sanitárias dos mesmos⁹.

O presente trabalho teve como objetivo comparar a enumeração e a capacidade de recuperação de coliformes termotolerantes utilizando-se os caldos de cultivo Caldo Verde Brilhante Lactose Bile 2% - CVBLB e caldo *Escherichia coli* - EC, com incubação a 44,5°C/24-48h em sorvetes a base de leite e da matéria-prima leite, verificando como os produtos se

enquadrariam em relação aos padrões microbiológicos exigidos pela legislação nacional vigente¹⁰.

MATERIAL E MÉTODOS

As amostras do leite e do sorvete de massa a base de leite foram coletadas em uma sorveteria artesanal da cidade de Piracicaba, interior do Estado de São Paulo. O leite do tipo C analisado foi coletado em dois erlenmeyer previamente esterilizados de 3L e os sorvetes processados e acondicionados em três embalagens específicas para este alimento, a base de cartão *craft* II revestidas com polipropileno de baixa densidade, totalizando aproximadamente 12 L de sorvete. As amostras foram transportadas em caixas isotérmicas, sob gelo, até o Laboratório de Microbiologia de Alimentos da ESALQ/USP. Foram realizadas 12 coletas quinzenais, para o leite e para o sorvete foram selecionados dois sabores, sendo as coletas de 1 a 6 o sabor creme e as coletas de 7 a 12 o sabor chocolate.

O Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e coliformes termotolerantes foi determinado pelo método clássico de fermentação em tubos múltiplos, através da técnica dos tubos múltiplos de acordo com as recomendações da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT)¹¹.

Essa técnica consta de duas fases: o teste presuntivo, onde se busca a recuperação de células injuriadas e detecta a presença de microrganismos fermentadores da lactose, e o teste confirmativo, onde se determina a real população de coliformes totais e termotolerantes.

No entanto, a norma da ABNT faz um ressalvo nessa técnica para produtos lácteos, onde a prova presuntiva não é efetuada, sendo as inoculações realizadas diretamente em séries de três tubos contendo Caldo Verde Brilhante Lactose Bile 2% (CVBLB) com incubação a 35°C/24-48h.

Após a realização do teste confirmativo para coliformes totais no CVBLB, foi realizado o teste confirmativo para coliformes termotolerantes. A norma da ABNT recomenda que tal teste pode ser efetuado no mesmo caldo de cultivo (CVBLB) prosseguindo a incubação a 44,5°C/24-48h. No presente trabalho, o teste confirmativo para coliformes termotolerantes foi realizado simultaneamente em CVBLB e em caldo *Escherichia coli* (EC), ambos incubados a 44,5°C por 24-48h.

A presença de coliformes termotolerantes foi confirmada pela produção de indol no Caldo Triptona, além da produção de gás nos tubos com CVBLB e com caldo EC, uma vez que a temperatura (44,5°C) e o período de incubação utilizados impedem que outros microrganismos fermentem a lactose com produção de gás.

Mediante a consulta da tabela própria da ABNT¹¹, foi calculado o Número Mais Provável de coliformes totais e termotolerantes por mL de leite e por grama de sorvete para cada amostra.

Os resultados obtidos foram comparados com os padrões vigentes no país para o leite e para o sorvete¹⁰.

Análise estatística

Em vista dos objetivos e do delineamento experimental utilizado (casualizado em blocos), os testes utilizados foram: testes para dados pareados e coeficientes de correlação¹².

Inicialmente os dados foram submetidos aos testes de adequação ao modelo linear e transformados por meio da função *Log 10*. Posteriormente, foram submetidos à análise de dados pareados, pelo PROC UNIVARIATE do programa estatístico Statistical Analysis System (SAS)¹³.

Os coeficientes de correlação foram calculados utilizando-se o coeficiente de correlação de Spearman, objetivando a comparação das médias das análises do NMP para coliformes termotolerantes com o emprego dos caldos CVBLB e EC.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1, estão representados os NMP de coliformes totais presentes no leite e no sorvete. Para cada coleta, foram analisadas 2 amostras de leite, total de 24 amostras e 3 amostras de sorvete, totalizando 36 amostras.

O leite pasteurizado tipo C beneficiado no Brasil, tem sido considerado um produto de baixa qualidade devido ao fato de normalmente ser proveniente de uma matéria-prima contaminada face às deficiências higiênico-sanitárias na produção. Porém, Barros et al.¹⁴ ao analisarem 38 amostras de leite do tipo C provenientes de pequenas fazendas leiteiras, observaram que apenas 6 (16%) apresentaram padrões microbiológicos inaceitáveis.

Em recente pesquisa, Freitas et al.¹⁵ ao analisarem 51 amostras de leite do tipo C, verificaram que 32,2% estiveram em desacordo com os padrões determinados pelo RIISPOA¹⁶, quanto ao NMP de coliformes totais. Semelhantes resultados foram encontrados por Tessari & Cardoso¹⁷ em 50 amostras, das quais 36% estavam em desacordo com o padrão estabelecido¹⁶.

Toda a matéria-prima animal “in natura” utilizada para a fabricação de outros produtos alimentícios possui um certo número de microrganismos contaminantes. Assim, Halász et al.¹⁸ afirmam que dependendo das condições em que a matéria-prima (leite) for tratada, o número de microrganismos poderá aumentar durante o armazenamento e/ou processamento, tornando seus subprodutos inadequados para o consumo.

De acordo com Guadagnoli¹⁹, a matéria-prima é um item importante a ser controlado para prevenir ou eliminar a possibilidade dos ingredientes virem a se tornar veículos de organismos ou resíduos potencialmente danosos; portanto, vigilância constante deve ser mantida sobre os mesmos. Para isso, é necessário ser rígido e seletivo quanto os fornecedores de matérias-primas, garantindo uma qualidade constante.

A Tabela 2 apresenta os valores de NMP de coliformes termotolerantes encontrados nas amostras de leite analisadas, em caldo EC e em CVBLB. Para cada coleta, 2 amostras foram analisadas utilizando-se o CVBLB e 2 amostras utilizando-se o caldo EC, o total de amostras de leite analisadas para coliformes termotolerantes foi de 48.

Tabela 1. Número mais provável (NMP) de coliformes totais por mL de leite e por grama de sorvete.

Análise	Leite (NMP/mL)			Sorvete (NMP/g)			
	1	2	Média	1	2	3	Média
1 ^a *	1,5 x 10 ²	1,2 x 10 ²	1,4 x 10 ²	1,6 x 10 ²	1,5 x 10 ²	2,1 x 10 ²	1,7 x 10 ²
2 ^a *	1,2 x 10 ²	1,1 x 10 ²	1,2 x 10 ²	1,5 x 10 ²	2,4 x 10 ²	1,2 x 10 ²	1,7 x 10 ²
3 ^a *	4,6 x 10 ²	2,9 x 10 ²	3,8 x 10 ²	2,4 x 10 ²	2,1 x 10 ²	2,1 x 10 ²	2,2 x 10 ²
4 ^a *	1,6 x 10 ²	2,1 x 10 ²	1,9 x 10 ²	1,2 x 10 ²	1,5 x 10 ²	1,2 x 10 ²	1,3 x 10 ²
5 ^a *	1,2 x 10 ³	1,5 x 10 ³	1,4 x 10 ³	9,3 x 10 ²	1,2 x 10 ³	1,6 x 10 ³	1,2 x 10 ³
6 ^a *	1,1 x 10 ²	1,1 x 10 ²	1,1 x 10 ²	9,3 x 10	1,1 x 10 ²	9,5 x 10	9,9 x 10
7 ^a **	1,1 x 10 ⁴	2,1 x 10 ⁴	1,6 x 10 ⁴	1,1 x 10 ³	1,1 x 10 ³	4,6 x 10 ²	8,9 x 10 ²
8 ^a **	1,5 x 10 ³	2,3 x 10 ²	8,7 x 10 ²	1,1 x 10 ⁴	9,3 x 10 ³	1,5 x 10 ³	7,3 x 10 ³
9 ^a **	1,1 x 10 ³	9,3 x 10 ³	5,2 x 10 ³	1,1 x 10 ³	2,1 x 10 ³	3,9 x 10 ³	2,4 x 10 ³
10 ^a **	1,1 x 10 ⁴	2,4 x 10 ⁴	1,8 x 10 ⁴	4,3 x 10 ²	4,3 x 10 ²	4,3 x 10 ²	4,3 x 10 ²
11 ^a **	2,9 x 10 ⁴	2,4 x 10 ⁴	2,7 x 10 ⁴	4,6 x 10 ³	1,1 x 10 ⁴	2,4 x 10 ³	6,0 x 10 ³
12 ^a **	1,1 x 10 ⁴	2,1 x 10 ⁴	1,6 x 10 ⁴	1,1 x 10 ⁴	9,3 x 10 ³	7,5 x 10 ³	9,3 x 10 ³
Média	5,6 x 10 ³	8,5 x 10 ³	7,1 x 10 ³	2,6 x 10 ³	2,9 x 10 ³	1,5 x 10 ³	2,4 x 10 ³

* sorvete sabor creme

** sorvete sabor chocolate

Tabela 2. NMP de coliformes termotolerantes por mL de leite, em caldo CVBLB e em EC, incubados a 44,5°C/24-48h.

Análise	Caldo VBLB			Caldo EC		
	Leite 1	Leite 2	Média	Leite 1	Leite 2	Média
1 ^a	0,36	0,36	0,36	4,3	2	3,2
2 ^a	< 0,3	< 0,3	< 0,3	0,36	< 0,3	0,3
3 ^a	< 0,3	< 0,3	< 0,3	2,3	< 0,3	2,3
4 ^a	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	2	1,1
5 ^a	2,3	0,36	1,3	1,1 x 10 ²	4,6 x 10	7,8 x 10
6 ^a	1,1 x 10 ²	2,1 x 10	6,5 x 10	4,2	5,3	4,8
7 ^a	4,6 x 10 ²	2,0 x 10	2,4 x 10 ²	1,1 x 10 ³	9,3 x 10 ²	1,0 x 10 ³
8 ^a	3,6 x 10	9,1 x 10	6,3 x 10	9,1 x 10	1,1 x 10 ²	1,0 x 10 ²
9 ^a	2,3 x 10	2,9 x 10	2,6 x 10	2,3 x 10	3,9 x 10	3,1 x 10
10 ^a	3,6 x 10	1,6 x 10	2,6 x 10	3,6 x 10	1,2 x 10	2,4 x 10
11 ^a	9,1 x 10	2,0 x 10 ²	1,4 x 10 ²	9,3 x 10 ²	4,6 x 10 ²	6,9 x 10 ²
12 ^a	2,4 x 10	2,1 x 10	2,2 x 10	4,4 x 10 ²	9,1 x 10	2,6 x 10 ²
Média	6,5 x 10	3,3 x 10	4,9 x 10	2,3 x 10 ²	1,4 x 10 ²	1,8 x 10 ²

O padrão microbiológico estabelecido pela atual legislação¹⁰ para tolerância de coliformes a 45°C é de 4 NMP/mL em leite pasteurizado.

Na Tabela 2, observa-se que a partir da 6^a coleta para o CVBLB e da 5^a coleta para o caldo EC, todas as amostras de

leite analisadas, apresentaram valores de coliformes a 45°C superiores aos tolerados pela legislação¹⁰.

Na Figura 1 observam-se valores médios de coliformes termotolerantes – Log 10 do NMP/mL de leite, tanto no caldo EC como no CVBLB, incubados a 44,5°C/24-48h.

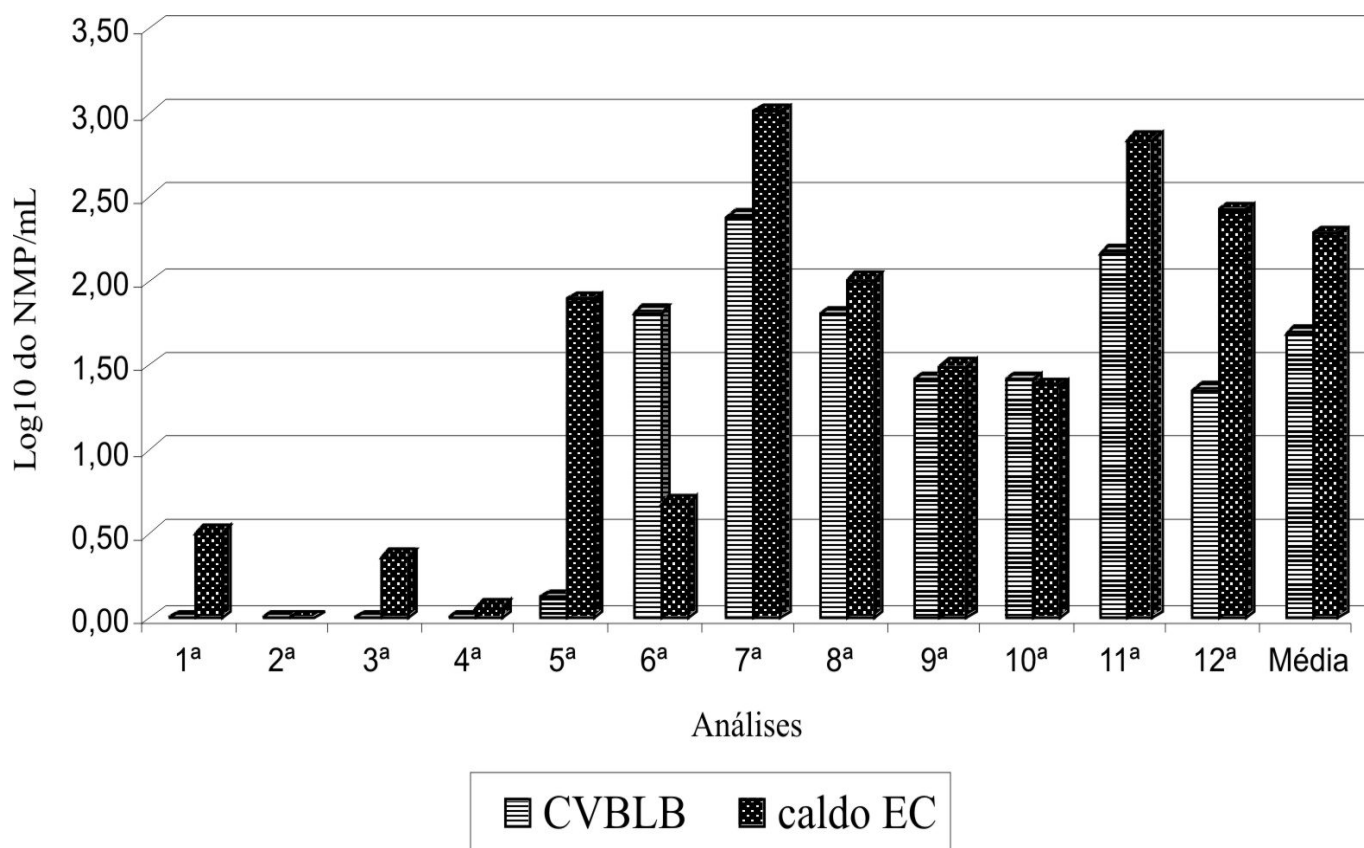
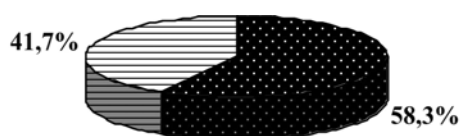


Figura 1. Valores médios (NMP/mL) de coliformes termotolerantes no leite pasteurizado tipo C, quando utilizado caldo EC e o CVBLB.

Das 24 amostras de leite analisadas, 14 (58,3%) apresentaram valores de coliformes a 45°C superiores aos tolerados pelo referido padrão, quando o teste foi conduzido utilizando o CVBLB (Figura 2) e 17 (70,8%) apresentaram também valores de coliformes a 45°C superiores aos referidos como limite máximo pela legislação¹⁰, quando o caldo utilizado para o teste foi o caldo EC (Figura 3).

Quanto à variação nas estimativas do NMP de coliformes a 45°C/mL de leite, os valores da Tabela 2, bem como pela representação gráfica nas Figuras 1, 2 e 3, que os valores encontrados quando o caldo utilizado foi o caldo EC foram normalmente superiores aos valores quando se utilizou o CVBLB. Embora a ABNT¹¹ sugira a utilização do CVBLB para a confirmação de coliformes termotolerantes, o que facilita muito o trabalho, já que um só caldo pode ser utilizado tanto para o teste confirmativo de coliformes totais quanto para coliformes a 45°C (termotolerantes), pelos dados obtidos na presente pesquisa, seria mais recomendável a utilização do caldo EC para coliformes a 45°C. Tal recomendação se justifica pelo fato de ter ocorrido estatisticamente diferença significativa ($p < 0,05$) entre os caldos utilizados.



■ Em desacordo com os padrões ■ De acordo com os padrões

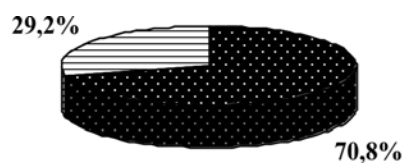
Figura 2. Porcentagem de amostras de leite pasteurizado tipo C de acordo e em desacordo com os padrões legais vigentes, quando utilizado o CVBLB.

Tabela 3. Número mais provável (NMP) de coliformes termotolerantes/g de sorvete, para o CVBLB e em caldo E.C.

Análise	CVBLB				Caldo EC			
	1	2	3	Média	1	2	3	Média
1 ^a *	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	2,1	1,5	1,5	1,7
2 ^a *	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3
3 ^a *	< 0,3	< 0,3	0,36	0,31	0,36	< 0,3	< 0,3	0,31
4 ^a *	< 0,3	< 0,3	0,36	0,31	2	1,1	1,2	1,43
5 ^a *	< 0,3	< 0,3	< 0,3	< 0,3	2,1 x 10	2,9 x 10	4,6 x 10	3,2 x 10
6 ^a *	1,1 x 10 ²	5,3	3,4	3,9 x 10	3,5	3,4	2,7	3,2
7 ^a **	3,0 x 10	3,0 x 10	2,3 x 10	2,8 x 10	2,1 x 10 ²	4,3 x 10	4,6 x 10	9,9 x 10
8 ^a **	2,9 x 10	2,4 x 10	2,1 x 10	2,5 x 10	4,3 x 10 ²	3,0 x 10	1,1 x 10 ²	1,9 x 10 ²
9 ^a **	3,0 x 10 ²	2,1 x 10 ²	1,6 x 10 ²	2,2 x 10 ²	3,0 x 10 ²	2,3 x 10 ²	1,1 x 10 ²	2,1 x 10 ²
10 ^a **	2,9 x 10	2,1 x 10	2,4 x 10	2,5 x 10	2,9 x 10	2,3 x 10	3,6 x 10	2,9 x 10
11 ^a **	7,3 x 10	9,1 x 10	3,0 x 10	6,5 x 10	4,3 x 10 ²	1,5 x 10 ²	3,6 x 10	2,0 x 10 ²
12 ^a **	2,9 x 10	3,0 x 10	9,3 x 10 ²	3,3 x 10 ²	2,9 x 10 ²	7,3 x 10	2,8 x 10 ²	2,1 x 10 ²
Média	5,0 x 10	3,4 x 10	9,9 x 10	6,1 x 10	1,4 x 10 ²	4,9 x 10	5,6 x 10	8,3 x 10

* sorvete sabor creme

** sorvete sabor chocolate



■ Em desacordo com os padrões ■ De acordo com os padrões

Figura 3. Porcentagem de amostras de leite pasteurizado tipo C de acordo e em desacordo com os padrões legais vigentes quando utilizado o caldo EC.

Uma segunda linha de análise dos dados foi conduzida através dos cálculos dos coeficientes de correlação entre os caldos utilizados. Segundo Hatcher & Stepansky¹² para dados normalmente distribuídos deve-se calcular o coeficiente de correlação de Pearson. Se a suposição de normalidade não é razoável deve-se preferir o coeficiente de correlação de Spearman.

O coeficiente de correlação de Spearman entre os caldos EC e CVBLB foi de 0,75. Portanto, mesmo apresentado diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os meios, houve correlação de 75% nas amostras de leite na recuperação dos coliformes termotolerantes.

Quando analisadas as amostras caso a caso, nota-se que três (12,5%) foram de acordo com o padrão da ANVISA¹⁰, quando se utilizou o CVBLB, estiveram em desacordo com o referido padrão, quando o caldo utilizado foi o caldo EC. O inverso não foi observado pois a recuperação de coliformes termotolerantes em caldo EC foi superior ao CVBLB.

A Tabela 3 apresenta as estimativas do NMP de coliformes termotolerantes /g de sorvete. Para cada coleta três amostras de sorvete foram analisadas para coliformes termotolerantes utilizando-se o CVBLB e 3 utilizando-se o caldo EC, num total de 72 amostras.

O padrão microbiológico para gelados comestíveis, estabelecidos pela atual legislação¹⁰ para coliformes a 45°C é de $5,0 \times 10$ NMP/g.

Os valores que constam na Tabela 3 para o sorvete de creme (1ª a 6ª análises) estão de acordo com os padrões estabelecidos pela legislação¹⁰ utilizando-se ambos os caldos, CVBLB e EC, tendo apenas uma das amostras em CVBLB ultrapassado esse limite.

Para o sorvete de chocolate (7ª a 12ª análises), os valores encontrados excederam o padrão estabelecido na legislação em 6 amostras (33,3%) em CVBLB e em 11 amostras (61,1%) em caldo EC, sendo esperados estes valores devido a alta contaminação da principal matéria-prima utilizada (o leite) já analisada anteriormente. Como constatado nas análises das amostras de leite, os NMP de coliformes termotolerantes/g de sorvete quando se utilizou o caldo EC foram superiores quando se utilizou o CVBLB.

A Figura 4 apresenta os valores médios encontrados como NMP de coliformes termotolerantes/g de sorvete.

Na Figura 4 observa-se valores elevados para coliformes termotolerantes nas amostras de sorvete de chocolate (7ª a 12ª análises) quando comparados aos valores destas bactérias nas amostras de sorvete de creme (1ª a 6ª análises). Como só a matéria-prima (leite) e o produto final (sorvete) foram analisados, não é possível afirmar que o pó sabor chocolate seja o único responsável pela maior

contaminação encontrada, devido aos resultados obtidos na matéria-prima (leite) nos meses de coletas de sorvetes sabor chocolate, apresentou contagens de NMP de coliformes termotolerantes mais elevados.

Provavelmente, nos últimos meses de coleta (dezembro, janeiro e fevereiro) o aumento da temperatura ambiental, média de 36°C, pode ter colaborado com o aumento da contagem microbiana do leite (Tabelas 1 e 2) e refletido na qualidade microbiológica do sorvete (Tabela 3) processado com essa matéria-prima (leite) de qualidade inferior.

Na Tabela 3 observa-se que todas as amostras de sorvete sabor chocolate estiveram em desacordo com os padrões¹⁰ quando utilizado o CVBLB, o mesmo ocorrendo com o caldo EC. No entanto, 5 amostras em acordo com os padrões para coliformes termotolerantes, quando utilizado o CVBLB, estiveram em desacordo com os referidos padrões quando utilizado o caldo EC.

As Figuras 5 e 6 ilustram as diferenças na determinação do NMP de coliformes termotolerantes em sorvete, utilizando os caldos EC e CVBLB.

A recuperação de coliformes termotolerantes em caldo EC é superior ao do CVBLB, com diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre ambos. O coeficiente de correlação de Spearman entre os caldos CVBLB e EC foi de 0,78, para as amostras de sorvete, indicando uma forte associação entre os dois caldos ($p < 0,0001$).

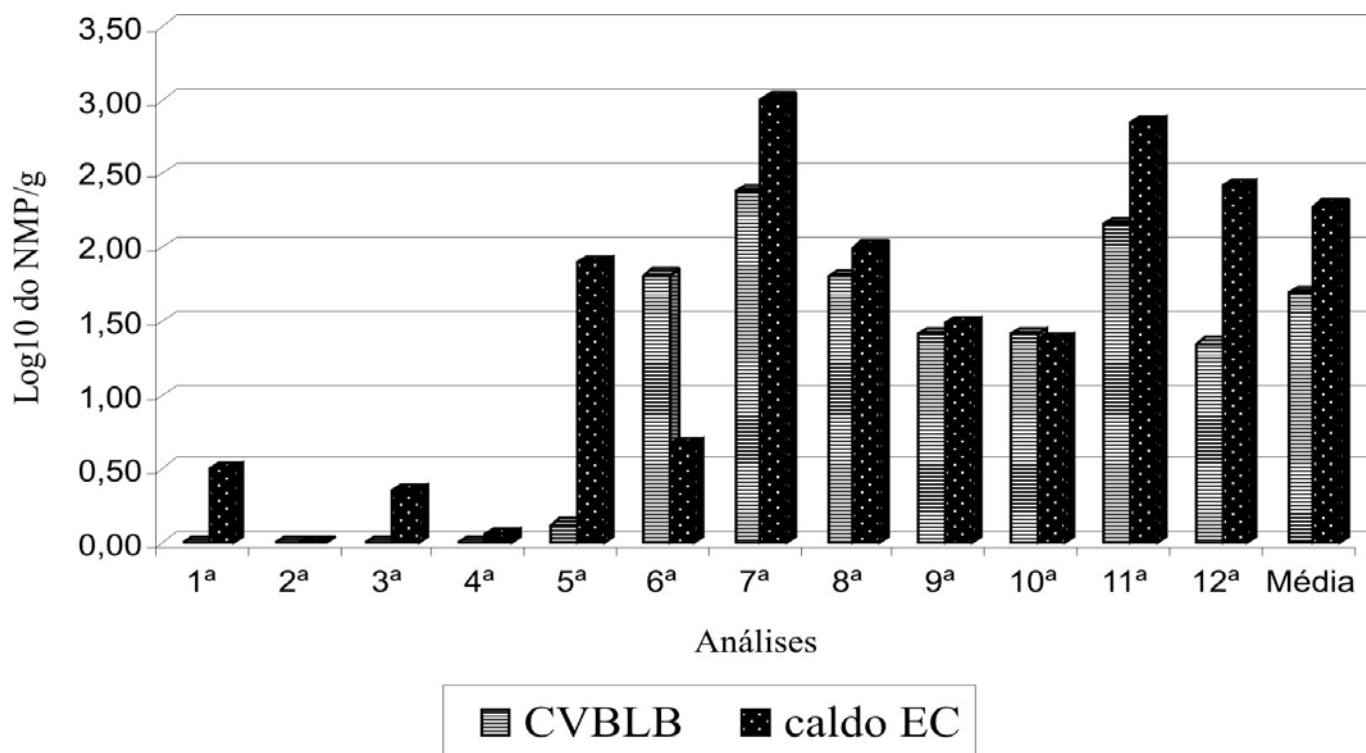


Figura 4. Valores médios (NMP/mL) de coliformes termotolerantes no sorvete utilizados caldo CVBLB e EC.

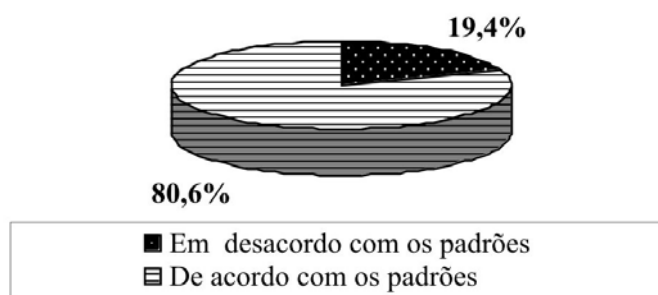


Figura 5. Porcentagem de amostras de sorvete de acordo e em desacordo com os padrões legais vigentes quando utilizado o CVBLB.

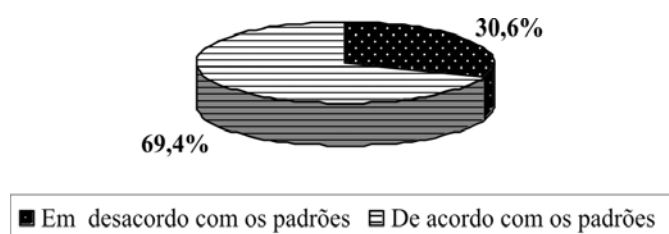


Figura 6. Porcentagem de amostras de sorvete de acordo e em desacordo com os padrões legais vigentes quando utilizado o caldo EC.

A comparação de médias em dados pareados indicou a existência de diferenças entre as médias verdadeiras de EC e CVBLB ($p < 0,05$). A maior média é observada no EC indicando uma maior recuperação dos coliformes termotolerantes neste caldo. Apesar desta diferença, os coeficientes de correlação de 75% e 78%, respectivamente observados em leite e sorvete indicam que as medidas são associadas.

Mesmo não tendo sido encontrada literatura sobre trabalhos que comparem os caldos CVBLB e EC para leite e derivados na detecção de coliformes termotolerantes, Hajdenwurcel & Souza²⁰, Cakir et al.²¹ e Silva & Gallo²² compararam em seus trabalhos a eficiência de diferentes metodologias na estimativa do NMP de coliformes termotolerantes em leite e derivados, porém com meios de cultivo diferentes dos utilizados neste trabalho. Sant'ana et al.²³ fizeram a comparação entre métodos rápidos para a detecção de microrganismos em sorvete.

Embora a norma da ABNT, preconize a utilização do CVBLB para a detecção de coliformes termotolerantes, foi detectado, no presente trabalho que o caldo EC apresentou melhores resultados quando comparado ao CVBLB.

Ao analisarem leite cru e sorvete, Bryan et al.²⁴ detectaram mais de 10^5 NMP de coliformes fecais tanto em leite cru quanto em sorvete, sendo que o leite já havia sido submetido ao tratamento térmico.

Rothwell²⁵, salienta que a presença de organismos de origem fecal no sorvete, é invariavelmente devida à contaminação pelo equipamento, o qual não deveria estar devidamente limpo e sanitizado, ocasionando a contaminação.

O mesmo autor ainda ressalta que, a presença de certos organismos tais como os coliformes, em produtos tratados pelo calor, também pode indicar um tratamento térmico ineficiente.

Embora o risco da veiculação de doenças transmitidas por alimentos (DTA's) seja extremamente baixo, em sorvetes, um número mesmo que pequeno de microrganismos encontrado após a pasteurização deve alertar o fabricante de que o risco existe (Marshall & Arbuckle)²⁶.

CONCLUSÕES

Das 24 amostras de leite pasteurizado tipo C analisadas, 14 (58,3%) apresentaram contagens de coliformes a 45°C (termotolerantes) em desacordo com os padrões legais vigentes, quando utilizado o CVBLB e 17 (70,8%) quando utilizado o caldo EC, sendo tais amostras consideradas produtos em condições higiênico-sanitárias insatisfatórias para o consumo humano.

Das 36 amostras de sorvetes analisadas, 7 (19,4%) apresentaram contagens de coliformes a 45°C em desacordo com os padrões legais vigentes, quando se utilizou o CVBLB e 11 (30,6%) quando utilizados o caldo EC, indicando que estes produtos apresentam condições higiênico-sanitárias insatisfatórias para o consumo humano.

A recuperação de coliformes termotolerantes foi superior quando utilizado o caldo EC em comparação ao CVBLB incubado a 45°C. Assim, embora a ABNT sugira o uso do CVBLB para a determinação de coliformes a 45°C, recomenda-se o uso do caldo EC, como acontece para outros alimentos, por apresentar melhor eficiência na recuperação destes. Esta recomendação é justificada pela obtenção de uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os caldos utilizados, na presente pesquisa.

A correlação de Spearman entre os caldos EC e CVBLB foi de 0,75 de 0,78 para o leite e o sorvete, respectivamente.

REFERÊNCIAS

1. Warke R, Kamat A, Kamat M. Incidence of pathogenic psychrotrophs in ice creams sold in some retail outlets in Mumbai, Índia. *Food Control* 2000; 11: 77-83.
2. Carvalho EP, Abreu LR, Carvalho MC. Estudo de alguns aspectos microbiológicos em sorvetes não pasteurizados. *Rev Inst Latic Cândido Tostes* 1995; 50 (291): 43-9.
3. Pinto MF, Ponsano EHG, Delbem ACB, et al. Condição higiênico-sanitária de sorvetes fabricados por indústrias artesanais no município de Araçatuba – S.P. *Hig Aliment* 2000; 14 (72): 50-2.

4. Hoffmann FL, Penna ALB, Coelho AR. Qualidade higiênico-sanitária de sorvetes comercializados na cidade de São José do Rio Preto-SP-Brasil. *Hig Aliment* 2000; 11 (76): 62-8.
5. Tamsut LS, García CE. Calidad microbiológica de los helados de crema elaborados en Caracas, Venezuela. *Arch Latinoam Nutr* 1989; 39 (1): 47-56.
6. Franco BDGM, Landgraf M. Microbiologia dos alimentos. 2nd ed. São Paulo: Ed Atheneu; 1996. 182p.
7. Frazier WC, Westhoff DC. Microbiología de los alimentos. 4th ed. Acribia: Ed Zaragoza; 1993. 681p.
8. Silva N, Neto RC, Junqueira VCA, et al. Manual de métodos de análise microbiológica da água. Campinas: ITAL 2000. 99p.
9. Jakabi M, Franco BDGM. Frequência de isolamento de cepas de *E. coli* patogênica em alimentos de origem animal. *Ci Tecnol Aliment* 1991; 11(2): 170-81.
10. Brasil. Resolução – RDC nº 12, de 02 de jan. de 2001. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária [ANVISA]: regulamento técnico sobre padrões microbiológicos em alimentos. Disponível no site http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01rdc.htm (21 fev. 2002).
11. Associação Brasileira de Normas Técnicas. MB-3463, de 1991. Bactérias coliformes totais, coliformes termotolerantes e *Escherichia coli* em alimentos - determinação do número mais provável. Rio de Janeiro; 1991. 7p.
12. Hatcher L, Stepansky EJ. A step-by-step approach to using the SAS system for univariate and multivariate statistics. Cary: SAS Institute, 1994. 576p.
13. Statistical Analysis System Institute. The SAS system (software). Release 8.2. Cary, 2001.
14. Barros VRM, Jardim FSF, Machado PF, et al. Quebra do paradigma da qualidade do leite C, recebido em usina de beneficiamento sob inspeção federal, em Catanduva – SP. *Hig Aliment* 1999; 13 (65): 6-9.
15. Freitas JA, Oliveira JP, Sumbo FD, et al. Características físico-químicas e microbiológicas do leite fluido exposto ao consumo na cidade de Belém, Pará. *Hig Aliment* 2002; 16 (100): 89-96.
16. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal. [RIISPOA] Aprovado pelo decreto 30691 de 29/03/52, alterado pelo decreto 1255 de 25/06/62 Brasília, 1980. 174p.
17. Tessari ENC, Cardoso ALSP. Qualidade microbiológica do leite tipo “A” pasteurizado, comercializado na cidade de Descalvado, SP. *Hig Aliment* 2002; 16 (96): 65-8.
18. Halász L. [Coord.], Pinheiro CP, Araújo Filho EM, Sato GT, et al. Refrigeração. São Paulo: Ind Com Cien Tec 1982; 220p.
19. Guadagnoli CA. Controle da qualidade na indústria de sorvetes. *Leite & Deriv*, 1992; 1 (6): 33-4.
20. Hajdenwurcel JR, Souza HM. Avaliação do Método Simplate para contagem de coliformes totais e *E. coli* em leite fluido. *Indust Latic*, 1998; 3 (17): 71-7.
21. Cakir I, Dogan HB, Halkman AK, Worobo RW. An alternative approach for enumeration of *Escherichia coli* in foods. *Int J Food Microbiol* 2001; 68: 217-223.
22. Silva MC, Gallo CR. Avaliação da qualidade microbiológica de alimentos com a utilização de metodologias convencionais e do sistema simplate. *Hig Aliment* 2003; 17 (107): 75-85.
23. Sant’ana AS, Conceição C, Azeredo DRP. Comparação entre os métodos rápidos SimplateR TPC- CI e PetrifilmR AC e os métodos convencionais de contagem em placas para a enumeração de aeróbios mesófilos em sorvetes. *Ci Tecnol Aliment* 2002; 22 (1): 60-4.
24. Bryan FL, Teufel P, Riaz S, et al. Hazards and critical control points of street-vending operations in a mountain resort town in Pakistan. *J Food Prot* 1992; 55 (9): 701-7.
25. Rothwell J. Microbiology of ice cream and related products. In: Robinson R.K., editor. Dairy microbiology: the microbiology of milk products. 2nd ed. London: Ed Elsevier; 1990; 2, p.1-40.
26. Marshall RT, Arbuckle WS. Ice cream. 5th ed. Maryland: Ed Aspen Publishers; 2000. 349p.

Análises microbiológicas de alimentos processados na Baixada Santista, envolvidos em doenças transmitidas por alimentos, no período de 2000 – 2006.

Evaluation of the microbiological analyses in foods from the Baixada Santista involved in foodborne diseases, São Paulo, Brazil, during 2000 – 2006.

RIALA6/1098

Jussara da Silva FAUSTINO¹, Estevão de Camargo PASSOS^{1*}, Ana Ruth Pereira de MELLO¹, André Luis Monteiro ARAÚJO¹, Cícero Vagner de SOUZA¹, Luzia Ilza Ferreira JORGE¹, Liliana Aparecida ZAMARIOLI¹

*Endereço para correspondência: Rua Silva Jardim, 90, Vila Nova, CEP 11015-020 – Santos/SP.

¹ Instituto Adolfo Lutz – Laboratório Regional de Santos

Recebido: 01/11/2006 – Aceito para publicação: 30/04/2007

RESUMO

O Instituto Adolfo Lutz - Laboratório Regional de Santos analisou amostras de alimentos coletadas pelas Vigilâncias Sanitárias Municipais da Baixada Santista, envolvidos em casos de doenças transmitidas por alimentos (DTAs), no período de janeiro de 2000 a junho de 2006. Foram analisados diferentes tipos de alimentos na forma de pratos prontos para consumo: coxinha de frango, arroz cozido, feijão cozido, frango, purê de batata, almôndega ao molho, recheios (calabresa, frango, palmito); embutidos (salsicha, lingüiça defumada); salgado cru; doces (bolo, mousse, mistura para bolos); bebidas (láctea, leite UHT, xaropinho, suco). A preparação das amostras para análise e as determinações analíticas foram realizadas segundo o “Compendium of Methods for Microbiological Examination of Foods (APHA, 1992)” e a RDC nº 12 de 2001 ANVISA, respectivamente. Das 26 amostras de alimentos analisadas, 18 (69,2%) estavam de acordo com a legislação vigente e 8 (30,7%) foram condenadas devido a presença de *Salmonella* sp isolada de mousse de clara de ovos e de bolo de chocolate; *Staphylococcus aureus* isolado de coxinhas de frango frita e crua; coliformes fecais isolados de recheios de frango e palmito, frango cru e frango ensopado.

Palavras-chave. doenças transmitidas por alimentos, *Salmonella* sp, *Staphylococcus aureus*.

ABSTRACT

The Instituto Adolfo Lutz - Laboratory Regional of Santos analyzed food samples sent by the municipal health surveillance services of counties belong to the Baixada Santista area, with suspect of foodborne diseases from January of 2000 to June of 2006. Different types of foods were analyzed such as chicken and pork preparations, rice, beans, chicken, mashed potatoes, heart of palm preparations, raw sausage and pork leg, raw salted pie, candies (cake, mousse, mixes for cakes); fermented milks, pasteurized milk UHT, juices. Conventional methods were used, as recommended by Compendium of Methods for Microbiological Examination of Foods APHA, 1992 and by the Brazilian Ministry of Health legislation ANVISA RDC # 12, 2001. Of the 26 analyzed food samples, 18 (69,2%) were in accordance with the sanitary legislation and 8 (30,7%) were condemned because of the presence of *Salmonella* sp isolated from a “mousse” with cream and chocolate cake; *Staphylococcus aureus* isolated from raw and cooked chicken products; faecal coliforms were isolated from chicken and heart of palm preparations, raw chicken and soggy chicken.

Key words. foodborne diseases, *Salmonella* sp, *Staphylococcus aureus*.

INTRODUÇÃO

Os alimentos, independentemente de sua origem, apresentam uma microbiota natural extremamente variável, concentrada principalmente na região superficial, embora regiões internas e profundas dos alimentos possam eventualmente apresentar formas microbianas viáveis¹. Nas diversas etapas que levam à obtenção de produtos processados, os alimentos estarão sujeitos a contaminação por diferentes microrganismos, provenientes de manipulação inadequada, contato com equipamentos, superfícies e utensílios não corretamente sanificados, ou mesmo procedentes do ambiente¹.

As doenças transmitidas por alimentos (DTAs) são objeto de interesse da Vigilância Sanitária por diversos motivos, entre eles diferentes microrganismos envolvidos e toxinas pré-formadas, diversidade de produtos que podem veiculá-las, períodos de incubação variáveis, quadros clínicos diferenciados, conseqüências e seqüelas às vezes graves, podendo até mesmo levar a óbitos os pacientes acometidos, etc^{2,3}.

A Vigilância Sanitária deve ser acionada para realizar a investigação de um surto de DTA com os objetivos de identificar o alimento responsável, o agente etiológico envolvido, os fatores que determinaram o aparecimento do surto e o quadro clínico predominante³. Estima-se que a incidência de doenças microbianas de origem alimentar seja elevada, todavia como a notificação não é obrigatória, há comprometimento das estatísticas dos Serviços de Saúde^{2,4}.

Nos Estados Unidos, Chittick et al.⁵ analisaram 6633 surtos de DTA no período de 1973 a 2001 e constataram que *Salmonella* Heidelberg foi responsável por 184 surtos, sendo que destes 53 foram provocados pelo consumo e ingestão de carne de aves, bem como ovos e alimentos elaborados a partir de aves e ovos. Rangel et al.⁶ observaram que no período de 1982 a 2002, 350 surtos de infecção foram provocados pela *Escherichia coli* O157:H7. Destes, 183 (52%) eram de DTA, 74 (21%) origem desconhecida, 50 (14%) pessoa-pessoa, 31 (9%) hídrica, 11 (3%) contato com animal e 1 (0,3%) laboratorial. O principal alimento envolvido foi carne moída com 75 (41%) dos casos.

Na Austrália, Dalton et al.⁷ revisaram no período de 1995 a 2000, 293 surtos de DTA e concluíram que *Salmonella* esteve incriminada com maior frequência, sendo responsável por 40% dos óbitos ocorridos no período. A carne de frango foi responsável por 27 surtos. Outras carnes, peixes, frutos do mar, salada, sanduíches e ovos também estiveram envolvidos na transmissão da *Samonella*.

No continente africano, Ombui et al.⁴ realizaram no Quênia, um estudo dos surtos de DTA ocorridos no período de 1970 a 1993, e observaram a notificação de apenas 13 surtos onde houve confirmação dos agentes etiológicos. Os alimentos envolvidos foram leite e derivados, carnes e derivados, farinha de milho, bolinho de aveia e derivados de trigo, pão, vegetais e torta de limão.

Na Inglaterra, Cornell e Neal⁸ relataram um surto de DTA ocorrido em 1995 após ingestão de tripas de porco contendo *Salmonella* Typhimurium.

Na América Latina, Jiménez et al.⁹ no Chile, verificaram que, nos anos de 1999 e 2000, as bactérias mais frequentes em casos de DTA foram *Salmonella* spp, *S. aureus* e *Shigella*. Os alimentos de maior risco foram: pratos quentes preparados e as preparações caseiras de queijo e de carne de cabra. No México, Shane et al.¹⁰ relataram um surto de DTA entre os conferencistas participantes de um congresso internacional em Puerto Vallarta e constataram que o alimento envolvido foi o “chili relenos” que continha ovos descascados e queijo. *Salmonella* foi isolada em sobras de queijo.

Em relação ao Brasil, as DTAs não diferem muito das observadas em outros países. O gênero *Salmonella* tem sido descrito em alimentos tais como carnes cruas de bovinos, suínos e aves; salsicha de porco; ovos e seus derivados quando consumidos crus ou mal cozidos; vegetais^{11,12, 13, 14, 15, 16}.

Coliformes termotolerantes são indicadores de más condições higiênico-sanitárias dos alimentos, dos locais de preparação e ou armazenamento e são problemas frequentes na manipulação de alimentos preparados. Têm sido isolados em derivados de leite, carnes e derivados, verduras^{17,18,19}.

A presença de *Staphylococcus aureus* está relacionado a produtos de confeitaria tais como: doces e salgados, derivados de leite, sanduíche de galinha, bem como carnes de suínos^{14,20,21,22}. Esta é uma bactéria frequentemente isolada de manipuladores de alimentos e de indivíduos sãos^{23,24} que podem contaminar acidentalmente alimentos processados.

Bacillus cereus também está envolvido em surtos de DTA, principalmente em alimentos preparados em serviços de alimentação conforme levantamento realizado por Passos e Kuaye²⁵ na cidade de Campinas, no período 1987 a 1993, sendo responsável por 68,4% dos surtos. As bancadas dos serviços de alimentação também podem representar fontes de contaminação de alimentos¹. Já foi descrito o isolamento deste agente em vegetais no setor de pré-preparo²⁶.

Os casos suspeitos de botulismo envolvem exames de amostras biológicas e de alimentos para verificar a presença de toxina botulínica ou do agente etiológico. Levantamento de dados realizado em 2002 por Gelli et al.²⁷, abrangendo o período de 1982-2001, revelou 17% de positividade nas amostras. Na Bahia, em 2006, foram observados 2 casos de botulismo, sendo 1 diagnosticado laboratorialmente e o outro apenas clinicamente; a ingestão de embutido tipo chouriço foi comum aos dois casos. Não foram encontrados dados mais recentes que possibilitassem acompanhar a ocorrência da doença²⁸.

O objetivo deste trabalho é relatar os resultados das análises microbiológicas de alimentos envolvidos em surtos de doenças transmitidas por alimentos ocorridos na Baixada Santista, no período de janeiro de 2000 a junho de 2006.

MATERIAL E MÉTODOS

No período de janeiro de 2000 a junho de 2006 foram encaminhadas ao Instituto Adolfo Lutz - Laboratório Regional de Santos amostras de alimentos com suspeita de DTA, procedentes das Vigilâncias Sanitárias Municipais da Baixada Santista.

Foram analisados diferentes tipos de alimentos:

- coxinha de frango, arroz cozido, feijão cozido, frango ensopado, purê de batata, almôndega ao molho, recheios (calabresa, frango, palmito);
- embutidos (salsicha e lingüiça defumada);
- salgado cru;
- doces (bolo, mousse de clara de ovos, mistura para bolos);
- bebidas (láctea, leite UHT, xaropinho, suco).

A preparação das amostras para análise e as determinações analíticas foram realizadas segundo o "Compendium of Methods for Microbiological Examination of Foods" (APHA, 1992)²⁹.

RESULTADOS

Na Tabela 1 encontram-se os resultados das análises efetuadas nas amostras de alimentos com suspeita de causar DTA, recebidas e registradas no Laboratório Regional de Santos do Instituto Adolfo Lutz, no período de 20 de janeiro de 2000 a junho de 2006. Num total de 26 amostras de alimentos analisadas, 18 (69,2%) estavam de acordo com a legislação vigente no país (RDC nº 12 de 2 de janeiro de 2001 da ANVISA)³⁰ e 8 (30,7%) apresentaram contaminação pelos seguintes agentes: (2/8) *Salmonella* sp isolada de mousse de clara de ovos e de bolo de chocolate; (2/8) *Staphylococcus aureus* isolada de coxinhas de frango fritas e cruas; (4/8) coliformes fecais isolados de recheios de frango e palmito, frango cru e frango ensopado. Os resultados microbiológicos mostraram que a frequência de 50% de amostras contaminadas pelas bactérias estudadas eram do grupo dos coliformes de origem fecal.

Tabela 1. Resultados das 26 análises efetuadas nas amostras de alimentos incriminados em DTA, recebidas e registradas no Laboratório Regional de Santos do Instituto Adolfo Lutz, no período de 20 de janeiro de 2000 a junho de 2006.

Tipo de alimento/Registro/Ano	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella</i> sp	<i>Staphylococcus aureus</i>
Coxinha frita / FI 578 / 2000	-	-	-
Frango desfiado / FI 577 / 2000	-	-	-
Lingüiça de paio defumada / FI 1150 / 2000	-	-	-
Mistura de bolo sabor chocolate / OR 408 / 2000	-	-	-
Pedacão de torta doce de ameixa / OR 932 / 2000	-	-	-
Bolo de chocolate / OR 407 / 2000	-	Presença/25g	-
Mousse de clara de ovos / OR 406 / 2000	-	Presença/25g	-
Salgado cru coxinha / OR 1450 / 2002	-	-	1,2 x 10 ⁴ /g
Salsicha a granel / FI 1133 / 2002	-	-	-
Coxinha de frango frita / OR 1029 / 2002	-	-	2,1 x 10 ⁶ /g
Recheio para pastel calabreza / OR 60 / 2002	-	-	-
Recheio para pastel frango / OR 58 / 2002	NMP 1,5x10 ² /g	-	-
Recheio para pastel palmito / OR 59 / 2002	NMP3,6x10 ² /g	-	-
Xaropinho Frut Fort / OR 1146 / 2002	-	-	-
Leite longa vida / OR 260 / 2004	-	-	-
Leite longa vida / OR 261/ 2004	-	-	-
Leite longa vida / OR 262/ 2004	-	-	-
Frango cru / OR 1196 / 2005	NMP2,4 x 10 ⁵ /g	-	-
Frango ensopado / OR 1195 / 2005	NMP2,4 x 10 ⁴ /g	-	-
Bebida Láctea / OR 837 / 2006	-	-	-
Biscoito doce / OR 838 / 2006	-	-	-
Almôndega ao molho / OR 834 / 2006	-	-	-
Arroz cozido / OR 832 / 2006	-	-	-
Feijão cozido / OR 833 / 2006	-	-	-
Purê de batata / OR 835 / 2006	-	-	-
Suco de morango / OR 836 / 2006	-	-	-

UFC: unidade formadora de colônia

NMP: número mais provável

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A presença de *Salmonella* spp. em alimentos torna-se impróprios para o consumo, uma vez que esse agente é reconhecidamente um microrganismo implicado em surtos de DTA¹⁸.

Os resultados obtidos com o isolamento da *Salmonella* sp em doces (mousse e bolo de chocolate) elaborados com ovos estão de acordo com os de Peresi et al.¹⁵ e Almeida et al.¹¹ que isolaram cepas de *Salmonella* sp associadas ao consumo de alimentos à base de ovos crus ou à cocção insuficiente de ovos inteiros envolvidos em surtos de DTA. Ressalte-se que os vegetais e outros alimentos também podem ser veiculadores destes agentes como foi descrito por Simões et al.¹⁶ na cidade de Campinas/SP.

Em relação aos *S. aureus* isolados de coxinhas de frango fritas e coxinhas de frango cruas, os resultados também concordam com os obtidos por Peresi et al.²¹ que relataram a presença deste agente em produtos de confeitaria, tanto doces como salgados, tais como pastel frito com recheio à base de frango, queijo catupiri e palmito, bolo confeitado, bolo recheado e confeitado e coxinha frita. Estes autores observaram que o processo de fritura utilizado não foi suficiente para eliminar a bactéria presente tanto nos recheios de frango do pastel e da coxinha, como na massa da coxinha. A ingestão de sanduíche de galinha também provocou um surto de intoxicação estafilocócica²².

No presente trabalho foram isolados *E. coli* a partir de recheios de frango e palmito, frango cru e frango ensopado. Sabe-se que a presença de coliformes está associada a má higiene, seja durante o processamento das matérias primas e os diferentes produtos alimentícios de origem animal e vegetal, seja da água de lavagem empregada, seja da água de irrigação, etc.^{16,17,18,19,31}. *E. coli* apresenta um grande número de tipos antigênicos porém uma minoria como as *E. coli* enteropatogênica, enterotoxigênica, enteroinvasiva e enterohemorrágica são responsáveis por quadros de gastroenterite no homem acometendo todas as idades³. No presente estudo não foram detectados isolados pertencentes a esses grupos patogênicos.

Foram condenadas oito amostras de alimentos, o que equivale a 30,7% das 26 amostras analisadas no período de 2000 a 2006. Ressalte-se que nos anos de 2001 e 2003 não foram encaminhados ao Laboratório Regional de Santos amostras de alimentos com suspeita de DTA.

É importante salientar que os serviços de Vigilância Sanitária são acionados após a denúncia realizada pelos consumidores ou quando esses serviços participam de programas específicos que têm o objetivo de prevenção e correção das falhas que favorecem e determinam os surtos alimentares nas unidades produtoras de alimentos.

É de fundamental importância que o Laboratório de Saúde Pública atue em conjunto com a Vigilância Sanitária dos municípios para ajudar na investigação e na elucidação dos

possíveis agentes causadores de toxinfecção alimentar. O Instituto Adolfo Lutz também se preocupa com o estudo de outros possíveis agentes, baseado nas informações dos sinais e sintomas dos pacientes contaminados.

REFERÊNCIAS

1. Roitman I, Travassos LR, Azevedo JL. Tratado de Microbiologia. Volume 1. São Paulo: Manole; 1988.
2. Franco BGM, Landgraf M. Microbiologia dos Alimentos. São Paulo: Atheneu; 1996.
3. Germano PML, Germano MIS. Parte 12 Agentes bacterianos de toxinfecções In: Germano PML, Germano MIS. Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos. São Paulo: Livraria Varela; 2001. p.199-258.
4. Ombui JN, Kagiko MM, Arimi SM. Foodborne diseases in Kenya. *East Afr Med J* 2001; 78(1):40-4.
5. Chittick P, Sulka A, Tauxe RV, Fry AM. A summary of national reports of foodborne outbreaks of *Salmonella* Heidelberg infections in the United States: clues for disease prevention. *J Food Prot* 2006; 69(5): 1150-3.
6. Rangel JM, Sparling PH, Crowe C, Griffin PM, Swerdlow DL. Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 Outbreaks, United States, 1982–2002. *Emerg Infect Dis* 2005; 11(4): 603-9.
7. Dalton CB, Gregory J, Kirk MD, Stafford RJ, Givney R, Kraa E et al. Foodborne disease outbreaks in Australia, 1995 to 2000. *Commun Dis Intell* 2004; 28(2): 211–24.
8. Cornell J, Neal KR. Protracted outbreak of *Salmonella typhimurium* definitive phage type 170 food poisoning related to tripe, pig bag, and chitterlings. *Commun Dis Public Health* 1998; 1: 28-30.
9. Jiménez VP, Solari VG, Alvarez IA, Arellano CC, Vidal RA, Carreño MC et al. Situación epidemiológica de las enfermedades transmitidas por alimentos en Santiago de Chile: período 1999-2000. *Rev Med Chil* 2002; 130(5): 495-501.
10. Shane AL, Roels TH, Goldoft M, Herikstad H, Angulo FJ. Foodborne disease in our global village: a multinational investigation of an outbreak of *Salmonella* serotype Enteritidis phage type 4 infection in Puerto Vallarta, Mexico. *Int J Infect Dis* 2002; 6 (2): 98-102.
11. Almeida IAZC, Peresi JTM, Carvalho IS, Rodrigues ECA, Marques DF, Tavechio AT et al. *Salmonella*: sorotipos identificados na região de São José do Rio Preto/SP, no período de 1990 – 1999. *Rev Inst Adolfo Lutz* 2000; 59 (1/2): 33-7.
12. Araújo E, Pacheco MASR, Boni RF, Fonseca YSK, Gelli DS, Fernandes SA et al. Surtos alimentares por *Salmonella enteritidis* associados ao consumo de alimentos à base de ovos, em Sorocaba, SP. *Hig Aliment* 1995; 9 (40): 24-6.
13. Jakabi M, Gelli DS, Ristori CA, De Paula AMR, Sakuma H, Lopes GISL et al. Occurrence of *Salmonella* spp and *Escherichia coli* O157:H7 in raw meat marketed in Sao

- Paulo, Brazil, and evolution of its cold tolerance in ground beef. *Rev Inst Adolfo Lutz* 2004; 63 (2): 238-42.
14. Lima ESC, Pinto PSA, Santos JL, Vanetti MCD, Bevilacqua PD, Almeida LP et al. Isolamento de *Salmonella* sp e *Staphylococcus aureus* no processo do abate suíno como subsídio ao sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle - APPCC. *Pesq Vet Bras* 2004; 24 (4): 185-190.
 15. Peresi JTM, Almeida IAZC, Lima SI, Marques DF, Rodrigues ECA, Fernandes AS et al. Surtos de enfermidades transmitidas por alimentos causados por *Salmonella enteritidis*. *Braz J Microbiol* 1998; 32 (5): 477-83.
 16. Simões M, Pisani B, Marques EGL, Prandi MAG, Martini MH, Chiarini PFT et al. Hygienic-sanitary conditions of vegetables and irrigation water from kitchen gardens in the municipality of Campinas, SP. *Braz J Microbiol* 2001, 32 : 331-3.
 17. Brigido BM, Freitas VPS, Mazon EMA, Pisani B, Prandi MAG, Passos MHCR. Queijo Minas Frescal: avaliação da qualidade e conformidade com a legislação. *Rev Inst Adolfo Lutz* 2004; 63 (2): 177-85.
 18. Salvatori RU, Bessa MC, Cardoso MRI. Qualidade sanitária de embutidos coletados no mercado público central de Porto Alegre-RS. *Ciência Rural*, Santa Maria 2003; 33 (4): 771-773.
 19. Silva CGM, Andrade SAC, Stamford TLM. Ocorrência de *Cryptosporidium spp.* e outros parasitas em hortaliças consumidas *in natura*, no Recife. *Ciência da Saúde Coletiva* 2005; 10 (supl): 63-9.
 20. Almeida Filho ES, Nader Filho A. Ocorrência de *Staphylococcus aureus* em queijo tipo “frescal”. *Rev Saude Publica* 2000; 34 (6): 578-80.
 21. Peresi JTM, Almeida IAZC, Teixeira ISC, Lima SI, Carnicel FA, Hoffmann FL. Surtos de doenças transmitidas por alimentos contaminados por *Staphylococcus aureus*, ocorridos no período de dezembro de 2001 a abril de 2003, na região de São José do Rio Preto – SP. *Rev Inst Adolfo Lutz* 2004; 63 (2): 232-7.
 22. Rodrigues KL, Moreira NA, Almeida ATS, Chiochetta D, Rodrigues MJ, Brod CS et al. Intoxicação estafilocócica. *Ciência Rural* 2004; 34 (1): 297-299.
 23. Castro MMMV, Iaria ST. *Staphylococcus aureus* enterotoxigênico no vestibulo nasal de manipuladores de alimentos em cozinhas de hospitais do município de João Pessoa, PB. *Rev Saude Publica* 1984; 18: 235-45.
 24. Zelante F, Ashcar H, Piochi BJA, Monson CA, Cunha PS. *Staphylococcus aureus* na boca e no nariz de indivíduos sãos. Verificação de identidade entre as cepas isoladas. *Rev Saude Publica* 1982; 16: 92-6.
 25. Passos MHCR, Kuaye AY. Avaliação dos surtos de enfermidades transmitidas por alimentos comprovados laboratorialmente no município de Campinas-SP, no período de 1987 a 1993. *Rev Inst Adolfo Lutz* 1996; 56(1): 77-82.
 26. Mendes RA, Azeredo RMC, Coelho AIM, Oliveira SSM, Coelho MSL. Contaminação ambiental por *Bacillus cereus* em unidade de alimentação e nutrição. *Revista de Nutrição*, Campinas 2004; 17 (2): 255-61.
 27. Gelli DS, Jakabi M, Souza A. Botulism: a laboratory investigation on biological and food samples from cases and outbreaks in Brazil (1982-2001). *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2002; 44 (6): 321-4.
 28. Figueiredo MAA, Dias J, Lucena R. Considerações acerca de dois casos de botulismo ocorridos no Estado da Bahia. *Rev Soc Bras Med Trop* 2006; 39 (3): 289-291.
 29. Vanderzant C, Splittstoesser DF, editors. *Compendium of Methods for Microbiological Examination of Foods*. 3rd ed. Washington: Edwards Brothers, Ann Arbor; 1992.
 30. Brasil. Resolução RDC nº 12 de 2 de janeiro de 2001 da ANVISA. Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. Brasília, 2001. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01rdc.htm>. Acesso em: 15/06/2007.
 31. Silva MP, Cavalli DR, Oliveira TCRM. Avaliação do padrão coliformes a 45°C e comparação da eficiência das técnicas dos tubos múltiplos e Petrifilm EC na detecção de coliformes totais e *Escherichia coli* em alimentos. *Ciênc Tecnol Aliment*, Campinas 2006; 26 (2): 352-9.

Isolamento de *Salmonella* de produtos de frango e perfil de suscetibilidade dos isolados a antimicrobianos

Salmonella isolation from poultry products and antimicrobial susceptibility profile

RIALA6/1099

Rita de Cássia dos Santos da CONCEIÇÃO¹, Andréa HENTGES¹, Ângela Nunes MOREIRA², Flávia Aleixo VASCONCELLOS³, Ida Maria Ramos ÂNGELO³, José Beiro CARVALHAL², José Antônio Guimarães ALEIXO^{2,3}, Cláudio Dias TIMM^{1*}

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

¹ Inspeção de Leite e Derivados, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas, RS, Brasil.

² Faculdade de Nutrição, UFPel, Pelotas, RS, Brasil.

³ Laboratório de Imunologia Aplicada, Centro de Biotecnologia, UFPel, Pelotas, RS, Brasil.

Recebido: 13/03/2007 – Aceito para publicação: 30/04/2007

RESUMO

Salmonella Enteritidis tem sido o principal sorotipo causador de salmonelose. O uso de antimicrobianos na prevenção e no tratamento dessa infecção, assim como a utilização destes como promotores de crescimento, tem provocado o aparecimento de cepas resistentes. O trabalho teve por objetivo investigar a presença de *Salmonella* em produtos de frango e verificar a resistência dos isolados frente a agentes antimicrobianos. Foram analisadas 120 amostras de produtos de frango, segundo metodologia preconizada pela Food and Drug Administration. *Salmonella* foi isolada de sete (15,83%) amostras e foram identificados quatro sorotipos, Enteritidis, Newport, Derby e Agona. Enteritidis foi o sorotipo de maior prevalência (71,4%). Trinta e seis (94,7%), 34 (89,5%), 32 (84,2%) e 32 (84,2%) isolados foram sensíveis aos antimicrobianos cloranfenicol, norfloxacin, ciprofloxacina e ampicilina, respectivamente. Trinta e três (86,8%) isolados foram resistentes ao ácido nalidíxico. Todos os isolados (100%) foram sensíveis à ceftriaxona. Vinte e cinco isolados (65,8%) foram resistentes à tetraciclina. Foram encontrados cinco (13,2%) isolados multirresistentes. A fiscalização dos produtos de frango deve ser mais rigorosa, quanto a possível presença de *Salmonella*. O aparecimento de cepas de *Salmonella* resistentes a agentes antimicrobianos é indicativo da necessidade de maior controle no uso desses fármacos.

Palavras-chave. *Salmonella* Enteritidis, sensibilidade a antimicrobianos.

ABSTRACT

Salmonella Enteritidis is the main cause of salmonellosis. The use of antimicrobials to prevent and to treat this infection, as well their use like growth promoters, has induced the emergency of resistant strains. The aim of this work was to search the presence of *Salmonella* in poultry products and to investigate the isolates resistance to antimicrobial agents. One hundred and twenty samples of poultry products were analyzed, according to the Food and Drug Administration. *Salmonella* was isolated from seven (15.83%) samples and four serotypes were identified, Enteritidis, Newport, Derby and Agona. Enteritidis was the most prevalent serotype (71.4%). Thirty-six (94.7%), 34 (89.5%), 32 (84.2%) and 32 (84.2%) isolates were susceptible to chloramphenicol, norfloxacin, ciprofloxacin and ampicillin, respectively. Thirty-three (86.8%) isolates were resistant to nalidixic acid. All isolates (100%) were susceptible to ceftriaxone. Twenty-five isolates (65.8%) were resistant to tetracycline. Five isolates (13.2%) multiresistant were found. The inspection of poultry products must be more rigorous, regarding to the possible presence of *Salmonella*. The occurrence of *Salmonella* strains resistant to antimicrobial agents is indicative of more control necessity in use of these drugs.

Key words. *Salmonella* Enteritidis, antimicrobial susceptibility.

INTRODUÇÃO

Bactérias do gênero *Salmonella* estão entre as principais causas de enfermidades veiculadas por alimentos¹. A transmissão desta bactéria a humanos ocorre pela ingestão de carnes mal cozidas, leite, ovos e outros alimentos, como vegetais que são ingeridos crus após sofrerem contaminação cruzada. Produtos e alimentos de origem animal são os principais responsáveis pela distribuição mundial de salmonelose². Dentre as fontes de contaminação de *Salmonella*, as carnes são predominantes, tendo a de frango servido como veículo em numerosos casos de infecções humanas^{3,4}.

Geralmente, a salmonelose é uma infecção autolimitante e não exige tratamento. No entanto, infecções invasivas, incluindo septicemia e meningite, ocorrem em 5 a 10% dos casos confirmados, principalmente entre crianças, idosos e pacientes com o sistema imune comprometido⁵. O uso de antimicrobianos na prevenção e no tratamento dessas infecções, assim como sua utilização como promotores de crescimento, tem provocado o aparecimento de cepas resistentes^{6,7}. Typhimurium e Newport são sorotipos de *Salmonella* que têm apresentado cepas multirresistentes^{8,9}.

O trabalho teve como objetivo investigar a presença de *Salmonella* em produtos de frango e verificar a resistência dos isolados frente a agentes antimicrobianos.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

Foram analisadas 120 amostras de produtos de frango (sobrecoxa, coxa e sobrecoxa, coxinha da asa, carne moída, salsichão e fígado), conforme Tabela 1, adquiridas em supermercados da cidade de Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil, e encaminhadas ao laboratório, sob refrigeração, onde foram analisadas até duas horas após o recebimento.

Isolamento e identificação

A pesquisa de *Salmonella* foi realizada de acordo com a metodologia preconizada pela Food and Drug Administration¹⁰. Nas amostras de sobrecoxa e coxinha da asa, o conteúdo total da embalagem foi lavado em saco plástico estéril com 300 mL de caldo lactosado (CL, Merck, Darmstadt, Germany), deixado em repouso por 30 min a temperatura ambiente e incubado por 24 h a 37°C. Nas demais amostras, foi utilizado pré-enriquecimento com 25g da amostra em caldo lactosado por 24 h a 37°C. Foram analisadas três a cinco colônias de cada amostra. Os isolados foram enviados ao Departamento de Bacteriologia do Laboratório de Enterobactérias da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz, Manguinhos, Rio de Janeiro) para identificação dos sorotipos.

Teste de sensibilidade a antimicrobianos

O teste de sensibilidade a antimicrobianos foi realizado pelo Método de Difusão em Disco, usando ágar Mueller-Hinton (Acumedia, USA) e incubação a 37°C por 18-24 h, de acordo com o NCCLS¹¹. Os antimicrobianos utilizados foram ampicilina (10mcg), cloranfenicol (30mcg), norfloxacin (10mcg), tetraciclina (30mcg), ácido nalidíxico (30mcg), ceftriaxona (30mcg) e ciprofloxacina (5mcg) (Sensidisc, DME, São Paulo). Foram realizados antibiogramas nos isolados obtidos das amostras analisadas neste experimento e em 26 isolados de *Salmonella*, obtidos de sete amostras de carne moída de frango, previamente analisadas¹².

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da pesquisa de *Salmonella* nos produtos de frango estão demonstrados na Tabela 1. *Salmonella* foi isolada de 7 (5,83%) amostras e foram identificados quatro sorotipos, Enteritidis, Newport, Derby e Agona. Enteritidis foi o sorotipo de maior prevalência (71,4%) dentre os produtos de frango analisados, o que também tem sido observado por outros autores, que têm relatado prevalência de *Salmonella* mais elevada do que a encontrada no presente estudo. Baú et al.¹³ analisaram 124 amostras de produtos de frango obtidas em supermercados e açougues de Pelotas, Rio Grande do Sul, e isolaram *Salmonella* de 10,48% das amostras, sendo o sorotipo Enteritidis predominante (77%) entre os isolados. Matheus et al.¹⁴ analisaram 102 amostras de carcaças de frango resfriadas, comercializadas no município de Bauru, São Paulo e isolaram *Salmonella* de 6 amostras (5,9%), sendo o sorotipo Enteritidis (66,7%) o mais isolado. Mayrhofer et al.¹⁵ identificaram *Salmonella* em 16,4% de 281 amostras de carne de frango analisadas na Áustria. Antunes et al.¹⁶ isolaram *Salmonella* de 36 (60%) amostras de produtos de frango de um total de 60 coletadas na cidade de Porto, Portugal. Dez sorotipos foram identificados, sendo Enteritidis o predominante, isolado de 16 amostras.

Tabela 1. Resultados da pesquisa de *Salmonella* em 120 amostras de produtos de frango.

Produtos de frango	Amostras positivas/amostras analisadas	Sorotipos
Sobrecoxa	0/20	
Coxinha da asa	0/20	
Coxa e sobrecoxa	2/12	Enteritidis(1) Newport(1) Enteritidis(3)
Carne moída	3/21	
Salsichão	2/27	Enteritidis, Agona(2) Derby(1)
Fígado	0/20	
Total	7/120	8

A presença de dois sorotipos em uma mesma amostra foi observada no presente trabalho. *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Agona foram identificadas em uma amostra de salsichão de frango. A presença de mais de um sorotipo de *Salmonella* em uma mesma amostra também foi observada por Mayrhofer et al.¹⁵, que identificaram *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Heidelberg em uma amostra de carne de frango. Este fato salienta a importância de serem enviados aos laboratórios de referência mais de um isolado para sorotipagem, uma vez que a presença de mais de um sorotipo em uma mesma amostra pode fornecer informações importantes quanto à epidemiologia da salmonelose.

Suscetibilidade à ampicilina, à ciprofloxacina, à norfloxacina, à tetraciclina, à ceftriaxona, ao cloranfenicol e ao ácido nalidíxico foi investigada em todos os isolados. Os resultados dos antibiogramas encontram-se demonstrados na Figura 1. Foram analisados 34 isolados, sendo oito identificados neste experimento. Trinta e dois (94,1%), 30 (88,2%), 28 (82,4%) e 28 (82,4%) isolados foram sensíveis aos antimicrobianos cloranfenicol, norfloxacina, ciprofloxacina e ampicilina, respectivamente. Esses resultados foram similares aos encontrados por outros pesquisadores^{13,17,18}. Delicato et al.¹⁹, investigando o perfil de resistência de 21 cepas de *Salmonella* isoladas de infecções humanas, verificaram que 50% dos isolados de *Salmonella* Enteritidis apresentaram resistência a antimicrobianos, sendo o maior percentual de resistência observado em relação à ampicilina (85,7%).

Trinta e um (91,2%) isolados foram resistentes ao ácido nalidíxico. Resistência a esse antimicrobiano tem sido observada

por outros autores^{15,16,20}. No entanto, Carraminãna et al.¹⁷, Fernandes et al.¹⁸ e Oliveira et al.²¹ verificaram mais de 90% de sensibilidade de *Salmonella* ao ácido nalidíxico.

Todos os isolados (100%) foram sensíveis à ceftriaxona. Esses resultados são similares aos observados por Baú et al.¹³, Delicato et al.¹⁹ e Stephen et al.²². Pickering²³ analisou a sensibilidade de 1.419 isolados de *Salmonella* e 2% foram resistentes a ceftriaxona. Cefalosporinas de terceira geração, como a ceftriaxona, são comumente empregadas no tratamento de salmoneloses invasivas em crianças devido às suas propriedades farmacodinâmicas e à baixa prevalência de resistência encontrada frente a esses antimicrobianos⁹.

A tetraciclina tem sido um dos antimicrobianos mais utilizados em animais de produção^{16,21}, porém, em medicina humana, é considerada uma droga de segunda escolha¹⁵. Vinte e cinco isolados (65,8%) foram resistentes à tetraciclina, sendo que 19 apresentaram apenas resistência parcial. Fernandes et al.¹⁸, Oliveira et al.²¹ e Pickering²³ identificaram 23%, 20% e 15,4%, respectivamente, de *Salmonella* resistentes à tetraciclina.

Neste trabalho, um isolado foi considerado multirresistente quando apresentou resistência a três ou mais antimicrobianos. Foram encontrados cinco (13,2%) isolados multirresistentes, sendo que um (2,6%) foi resistente a cinco antimicrobianos, ampicilina, norfloxacina, tetraciclina, ácido nalidíxico e ciprofloxacina, e dois (5,3%) foram resistentes a seis dos antimicrobianos testados, ampicilina, cloranfenicol, norfloxacina, tetraciclina, ácido nalidíxico e ciprofloxacina.

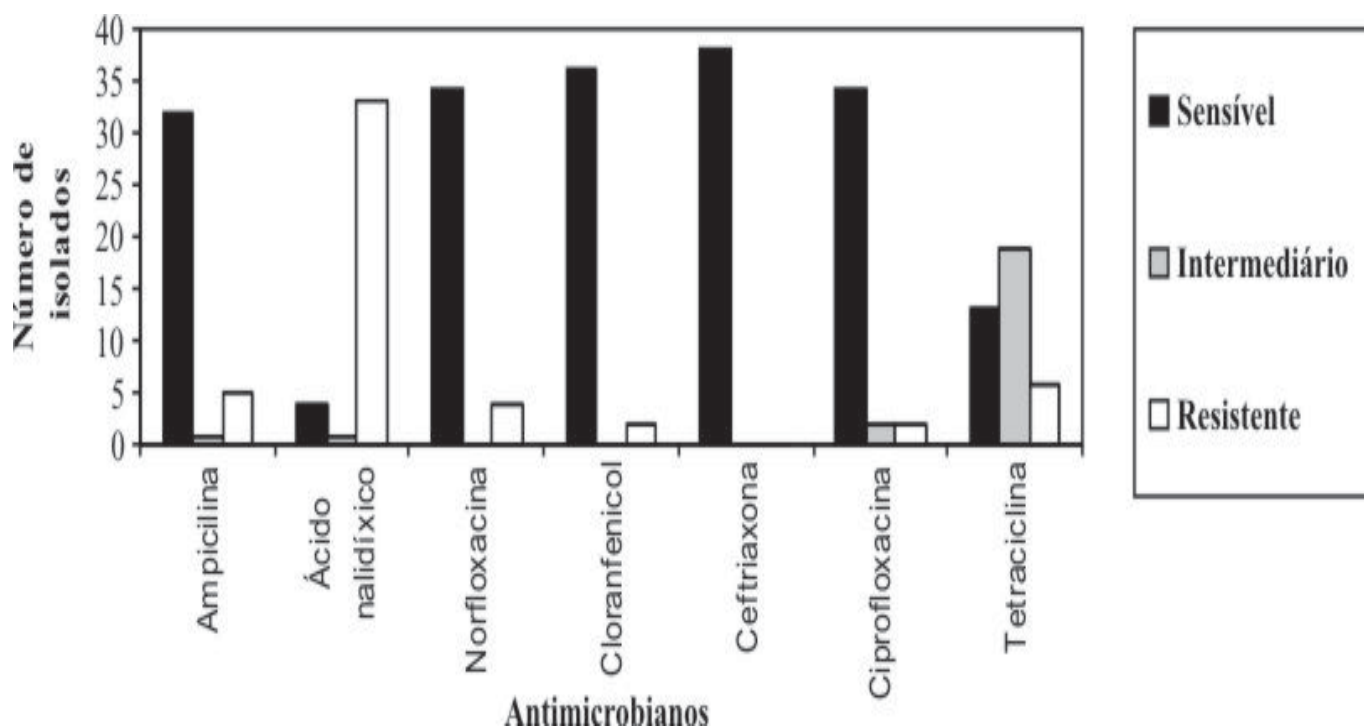


Figura 1. Perfil de suscetibilidade de isolados de *Salmonella* frente a antimicrobianos.

CONCLUSÕES

A fiscalização dos produtos de frango oferecidos ao consumo humano deve ser mais rigorosa, quanto a possível presença de *Salmonella*. A ocorrência de *Salmonella* multirresistentes a antimicrobianos em produtos de frango potencializa o perigo representado pela presença desse patógeno em alimentos. O aparecimento de cepas de *Salmonella* resistentes a agentes antimicrobianos é indicativo da necessidade de maior controle no uso desses fármacos.

REFERÊNCIAS

1. D'Aoust J, Maurer J, Bailey JS. *Salmonella* species. In: Doyle MP, Beuchat LR, Montville TJ, editores. Food microbiology: fundamental and frontiers. 2th ed. Washington: ASM; 2001. p.141-77.
2. Jay JM. Microbiologia moderna de los alimentos. 3rd ed. Zaragoza: Editorial Acribia; 1992.
3. Peresi JTM, Lima IAZC, Tavechio AT, Fernandes SA, Gelli DS. *Salmonella*: determinação de sorotipos e resistência a agentes microbianos de cepas isoladas de carcaças de frango comercializadas na região de São José do Rio Preto-SP. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 1999; 58(1): 41-6.
4. Sumner J, Raven G, Givney R. Have changes to meat and poultry food safety regulation in Australia affected the prevalence of *Salmonella* or of salmonellosis? *Int J Food Microbiol*. 2004; 92 (2): 199-205.
5. Chiappini E, Galli L, Pecile P, Vierucci A, Martino M. Results of a 5-year prospective surveillance study of antibiotic resistance among *Salmonella* enterica isolates and ceftriaxone therapy among children hospitalized for acute diarrhea. *Clin Ther*. 2002; 24 (10): 1585-94.
6. Threlfall EJ, Ward LR, Frost JA, Willshaw GA. The emergence and spread of antibiotic resistance in food-borne bacteria. *Int J Food Microbiol*. 2000; 62: 1-5.
7. White DG, Zhao S, Simjee S, Wagner DD, Mcdermott PF. Antimicrobial resistance of food-borne pathogens. *Microb Infect*. 2002; 4: 405-12.
8. Angulo FJ, Baker NL, Olsen SJ, Anderson A, Barret TJ. Antimicrobial use in agriculture: controlling the transfer of antimicrobial resistance to humans. *Sem Pediatr Infect Dis*. 2004; 15 (2): 78-85.
9. Yan SS, Pendrak ML, Abela-Ridder B, Punderson VMD, Fedorko DP, Foley SL. An overview of *Salmonella* typing public health perspectives. *Clin Appl Immunol Rev*. 2003; 4: 189-204.
10. Food and Drug Administration. *Salmonella*. Bacteriological analytical manual online, Chapter 5, 2006. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-5.html>>. Acesso em: 12 jun. 2006.
11. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility test for bacteria isolated from animals, Approved Standard, 2nd ed. M31-A2. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne (PA), USA, 2002.
12. Conceição RCS. Detecção de *Salmonella* em produtos de frango usando a separação imunomagnética [Dissertação de Mestrado]. Pelotas, Rio Grande do Sul: Universidade Federal de Pelotas, 2004.
13. Baú AC, Carvalhal JB, Aleixo JAG. Prevalência de *Salmonella* em produtos de frangos e ovos de galinha comercializados em Pelotas, RS, Brasil. *Ciênc Rural*. 2001; 31 (2): 303-7.
14. Matheus DP, Rudge AC, Gomes SMM. Ocorrência de *Salmonella* spp em carne de frango comercializada no município de Bauru, SP, Brasil. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2003; 62 (2): 111-5.
15. Mayrhofer S, Paulsen P, Smulders FJM, Hilbert F. Antimicrobial resistance profile of five major food-borne pathogens isolated from beef, pork and poultry. *Int J Food Microbiol*. 2004; 97: 23-9.
16. Antunes P, Réu C, Sousa JC, Peixe L, Pestana N. Incidence of *Salmonella* from poultry products and their susceptibility to antimicrobial agents. *Int J Food Microbiol*. 2003; 82: 97-103.
17. Carramiñana JJ, Rota C, Agustín I, Herrera A. High prevalence of multiple resistance to antibiotics in *Salmonella* serovars isolated from a poultry slaughterhouse in Spain. *Vet Microbiol* 2004; 104: 133-39.
18. Fernandes SA, Ghilardi ACR, Tavechio AT, Machado AMO, Pignatari ACC. Phenotypic and molecular characterization of *Salmonella* Enteritidis strains isolated in São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med trop S Paulo*. 2003; 45 (2): 59-63.
19. Delicato EL, Mickcha JMG, Fernandes SA, Pelayo JS. Resistance profile to antimicrobials of *Salmonella* spp. isolated from human infections. *Braz Arch Biol Technol*. 2004; 47 (2): 193-7.
20. Calixto AER, Serafini AB, Kipnis A, André MCDP. Prevalência de *Salmonella* e ocorrência de cepas resistentes a antimicrobianos, em insumos de rações para aves produzidos por um matadouro-frigorífico com fiscalização permanente, em Goiânia, GO. *Hig Alim*. 2002; 16 (101): 56-62.
21. Oliveira SD, Flores FS, Santos LR, Brandelli A. Antimicrobial resistance in *Salmonella* Enteritidis strains isolated from broiler carcasses, food, human and poultry-related samples. *Int J Food Microbiol*. 2005; 97(3): 297-305.
22. Stephen JM, Toleman MA, Walsh TR, Jones RN, SENTRY Program Participants Group. *Salmonella* bloodstream infections: report from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2001). *Int J Antimicrob Agents*. 2003; 22: 395-405.
23. Pickering LK. Antimicrobial Resistance Among Enteric Pathogens. *Sem Pediatr Infect Dis*. 2004; 15 (2): 71-7.

Eficácia de meios ágar M-PA-C e ágar Cetrimide no isolamento de *Pseudomonas aeruginosa* em amostras de água mineral

Cetrimide and M-PA-C agar media efficiency for isolating *Pseudomonas aeruginosa* from mineral water samples

RIALA6/1100

Beatriz PISANI^{1*}, Marise SIMÕES¹, Maria Angela Garnica PRANDI¹, Maria Helena MARTINI¹, Paulo Flávio Teixeira CHIARINI¹, Edson Zangiacomini MARTINEZ².

*Endereço para correspondência: ¹Instituto Adolfo Lutz, Laboratório Regional de Campinas. Rua São Carlos, 720. CEP 13035-420, Campinas/SP – E-mail: mhmartini@ial.sp.gov.br

²Departamento de Medicina Social da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP

Recebido: 20/02/2006 – Aceito para publicação: 02/05/2007

RESUMO

Estudou-se a eficácia dos meios ágar M-PA-C e ágar Cetrimide no isolamento de *Pseudomonas aeruginosa*, em diferentes temperaturas de incubação. Foram comparadas as taxas de recuperação de *P. aeruginosa* e a seletividade dos dois meios. Utilizou-se o modelo Bayesiano de efeitos aleatórios para dados binários na análise estatística e o modelo Bayesiano de Poisson na comparação da seletividade dos meios e quanto à recuperação de *P. aeruginosa*. Os resultados obtidos revelaram diferença significativa na seletividade dos meios, em que o meio ágar M-PA-C apresentou maiores valores médios de contagem. Para a recuperação de células de *P. aeruginosa*, os resultados foram equivalentes. As médias nas três contagens realizadas em ágar M-PA-C a 42°C foi de 208 UFC e em Cetrimide a 35°C de 231 UFC na diluição de 10⁻⁶. Com relação às amostras de água mineral, não houve evidência de diferentes taxas de frequência de *P. aeruginosa* entre os cultivos nos dois meios seletivos em diferentes temperaturas.

Palavras-chave. *Pseudomonas aeruginosa*, água mineral, ágar M-PA-C e ágar Cetrimide.

ABSTRACT

This study evaluated the efficacy of two selective media, M-PA-C agar and Cetrimide agar, for isolating *P. aeruginosa* cells at different incubation temperatures. *P. aeruginosa* recovery rates, as well as the selectivity of both media were compared. A random effects Bayesian model for binary data was used for performing statistical analysis, and a Poisson Bayesian model was applied to compare the potential of both media selectivity and *P. aeruginosa* recovery. A discernible difference on the media selectivity was evidenced, and M-PA-C medium presented a higher mean counting rate. *P. aeruginosa* recovery was similar in both media, and no significant difference was noted in three counts on M-PA-C at 42°C (208 CFU), and on Cetrimide Agar at 35°C (231 CFU), at 10⁻⁶ dilution. With regards to analyzed mineral water samples, no evidence of distinct occurrence rates of *P. aeruginosa* on either media, at different temperatures, was noted.

Key words. *Pseudomonas aeruginosa*, mineral water, M-PA-C agar and Cetrimide agar.

INTRODUÇÃO

Os microrganismos do gênero *Pseudomonas* estão amplamente distribuído na natureza (solo, água, esgotos, intestino de mamíferos e plantas)¹. Estudos revelaram a presença de *P. aeruginosa* em água mineral, no Brasil, Canadá, França, Alemanha, Espanha e Estados Unidos, entre outros países². Esta bactéria pode estar presente também em águas tratadas destinadas a diferentes utilizações como diálise, preparação de medicamentos e reagentes^{3,4,5}.

Além de serem patógenos oportunistas, espécies de *Pseudomonas* adquirem resistência a antibióticos, alteram aromas e aparência de águas⁶.

A eficiência dos meios de cultura, seletivos ou não, depende de fatores intrínsecos (composição dos nutrientes, potencial de óxi - redução, pH, atividade de água, tipo e atividade dos impedientes), fatores extrínsecos (condições de incubação) e fatores implícitos (exigência nutricional do microrganismo, antagonismo e sinérgismo da microbiota da água)⁷.

A Resolução RDC nº 275 de 2005, da ANVISA/MS, dispõe sobre o regulamento técnico para a fixação de identidade e qualidade de água mineral natural e água natural. Dentre os microrganismos a serem pesquisados, de acordo com esta resolução, está a *P. aeruginosa*⁸.

A American Public Health Association⁹ (APHA) recomenda, na pesquisa de *Pseudomonas aeruginosa* em água pela técnica de filtração por membrana o uso do Agar M-PA-C com incubação a 42°C, enquanto que os laboratórios da rede Estadual de Saúde Pública de São Paulo, entre outros, utilizam o Agar Cetrimide, também seletivo para a pesquisa de *Pseudomonas aeruginosa* em água, incubado a 35°C. Entre os impedientes que compõe estes meios de cultura, inclui-se canamicina e ácido nalidíxico no Agar M-PA-C e brometo cetiltrimetilamônia no Agar Cetrimide^{10,11}.

Legnani et al.⁴ avaliaram a presença de *P. aeruginosa* em água mineral envasada por inoculação direta da amostra em Agar Cetrimide e por inoculação em Agar Cetrimide após pré-incubação por 1 hora em Agar tripticaseína de soja; os autores não observaram diferenças significativas na enumeração microbiana entre os procedimentos, demonstrando que o Agar Cetrimide pode ser empregado para análise de água.

Prandi et al.¹² utilizaram Agar Cetrimide na análise de 894 amostras de água mineral e verificaram a presença de *P. aeruginosa* em 77 amostras (8,61%) enquanto que em Agar M-PA-C detectaram a presença deste microrganismo em 40 (5,56%) das 719 amostras avaliadas. A diferença de 3% entre os resultados foi significativa ($p < 0,05$), motivando a realização deste estudo.

Este trabalho teve o objetivo de comparar a seletividade e o desempenho dos meios M-PA-C (indicado pela APHA) e Cetrimide na recuperação de *P. aeruginosa*, incubados a 42°C/72 horas e 35°C e 42°C/48 horas, respectivamente.

MATERIAL E MÉTODOS

Microrganismos

A1-*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, A2-*Proteus mirabilis* CDC 305, A3-*Escherichia coli* ATCC 25922, A4-*Aeromonas hydrophila* IAL 570 e A5-*Enterobacter cloacae* ATCC 13047.

Cultivo dos microrganismos

Os microrganismos foram cedidos pela Seção de Coleção de Culturas Bacterianas do Instituto Adolfo Lutz.

A cepa de *P. aeruginosa* foi reativada em 5mL de caldo infusão de cérebro e coração, BHI (Brain Heart Infusion Broth), e incubada a 35°C/18 horas. Alíquota de 1,0mL foi transferida para 9mL de solução salina a 0,85% e submetida a diluição decimal até 10⁻⁸. Posteriormente, transferiu-se 1 mL de cada diluição para a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) pelo método de plaqueamento em profundidade, utilizando-se o meio "Plate Count agar" – Difco (PCA) incubado a 35°C por 24h. Utilizou-se o mesmo procedimento para a reativação dos demais microrganismos.

A) Preparação da suspensão da mistura dos microrganismos

Das 5 culturas, em caldo BHI na fase estacionária, foram retiradas alíquotas de 0,2mL de cada uma, e transferidas para 9 mL de solução salina a 0,85%. A partir desta suspensão 10⁻¹ foram realizadas as diluições decimais até 10⁻⁸, sendo que cada diluição foi submetida à contagem de UFC, pelo método de plaqueamento em profundidade, em meio PCA (35°C/24h), M-PA-C (42°C/72h) e Cetrimide (35°C e 42°C/48h).

B) Preparação da suspensão de uma espécie bacteriana

A cultura de cada espécie foi diluída a 10⁻¹ e determinaram-se as respectivas UFC em cada meio de cultura conforme descrito anteriormente. Esta avaliação foi realizada três vezes.

Análise microbiológica das amostras de água mineral

Foram analisadas 15 amostras de água mineral envasadas utilizando-se o método de filtração por membrana, recomendado pela APHA, para a pesquisa de *P. aeruginosa*⁹. As condições de cultivo empregadas foram M-PA-C, com incubação a 42°C/72h, e Cetrimide, com incubação a 35°C e 42°C/48h. Estas análises foram realizadas em duplicata.

Análise estatística

A análise estatística utilizou modelos Bayesianos de regressão¹³. Dado que as contagens de UFC para a mistura de microrganismos nos meios de cultura constituem uma variável de natureza discreta, estes dados foram modelados segundo uma distribuição de Poisson com média dependente do meio, da temperatura e da diluição. Este modelo permitiu

comparações da seletividade dos meios e da recuperação de *P. aeruginosa*. Um modelo Bayesiano de efeitos aleatórios para dados binários correlacionados (relativos às duplicatas) foi utilizado na análise estatística das 15 amostras de água mineral envasada.

Dentro de uma abordagem Bayesiana, medidas de interesse foram estimadas por métodos MCMC (Monte Carlo em cadeia de Markov), utilizando o algoritmo de estimadores de Gibbs¹⁴. Foi utilizado com este propósito o programa computacional *WinBugs*¹⁵.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 mostra os resultados obtidos na enumeração microbiana (UFC/mL) na avaliação da seletividade dos meios M-PA-C, incubado a 42°C, e Cetrimide incubado a 35°C e 42°C.

A Tabela 2 mostra os resultados obtidos com a recuperação de *Pseudomonas aeruginosa* obtida com os mesmos meios e condições de incubação. As médias das contagens de UFC/mL, apresentadas nas Tabelas 1 e 2, com seus respectivos intervalos de confiança, foram estimadas pelo modelo Bayesiano de Poisson utilizando distribuições a priori não informativas. O intervalo de confiança, utilizado nos modelos Bayesianos, é análogo ao usual

intervalo de confiança utilizado pelos métodos frequentistas, com uma interpretação diferente. Por exemplo, da Tabela 1, inferimos que, ao generalizarmos os nossos resultados a uma população de microrganismos mais ampla, a probabilidade de encontrarmos uma contagem média de UFC/mL entre 43,82 e 60,13 UFC/mL com a mistura de microrganismos no meio Cetrimide incubado a 42°C é de 95%.

A Tabela 3 apresenta comparações entre as contagens médias de UFC/mL apresentadas nas Tabela 1 e 2. Quando comparadas, por exemplo, as contagens médias de UFC/mL entre os meios de cultura Cetrimide incubado a 42°C e a 35°C com a mistura de microrganismos e na diluição 10⁻⁶ a diferença entre as médias é estimada em 22,33 UFC/mL. O respectivo intervalo de credibilidade informa que, quando projetados estes resultados a uma população de microrganismos mais ampla, existe a chance de 95% de que esta diferença das médias encontre-se entre 12,23 e 32,60 UFC/mL. Dado que este intervalo não contém o valor zero, que evidenciaria a possibilidade de não haver diferença entre os dois grupos, conclui-se que há uma significativa diferença entre as médias de contagens quando contemplada esta comparação.

Tabela 1. Contagens de UFC de *P. aeruginosa* nas diluições 10⁻⁶ e 10⁻⁷, nos meios Cetrimide e M-PA-C, para a mistura de microrganismos, nas temperaturas de 35°C e 42°C.

	Meio de Cultura	Diluição	Contagens UFC/ml			Média estimadas contagens ^(a) UFC/mL	Intervalo de credibilidade 95%
Mistura de Microrganismos	Cetrimide 42°C	10 ⁻⁶	120	4	31	51,66	(43,82 60,13)
		10 ⁻⁷	0	0	3	0,9998	(0,208 2,4)
	Cetrimide 35°C	10 ⁻⁶	23	24	41	29,32	(23,52 35,78)
		10 ⁻⁷	0	1	3	1,333	(0,364 2,912)
	MPAC 42°C	10 ⁻⁶	152	121	91	121,30	(109,20 134,1)
		10 ⁻⁷	28	18	17	21,0	(16,14 26,49)

(a) estimativas obtidas pelo Modelo Bayesiano de Poisson.

Tabela 2. Contagens de UFC da cepa *P. aeruginosa*, ATCC 10145, obtidas das diluições 10⁻⁶ e 10⁻⁷, a 35°C e 42°C.

	Meio de Cultura	Diluição	Contagens UFC/ml			Média estimadas contagens ^(a) UFC/mL	Intervalo de credibilidade 95%
<i>P. aeruginosa</i> ATCC	Cetrimide 42°C	10 ⁻⁶	300	120	118	179,3	(164,4 194,7)
		10 ⁻⁷	52	9	4	21,65	(16,71 27,2)
	Cetrimide 35°C	10 ⁻⁶	300	206	188	231,3	(214,4 248,8)
		10 ⁻⁷	64	24	4	30,66	(24,71 37,21)
	MPAC 42°C	10 ⁻⁶	300	115	208	207,7	(191,7 224,3)
		10 ⁻⁷	27	58	47	43,97	(36,83 51,78)

(a) estimativas obtidas pelo Modelo Bayesiano de Poisson.

Tabela 3. Médias das contagens de UFC obtidas nos meios Cetrimide e M-PA-C na mistura de microrganismos e na cultura de *P. aeruginosa*, ATCC 10145, a 35°C e 42°C.

	Diluição	Meio de Cultura	Diferença estimada entre as médias ^(a) UFC	Intervalo de credibilidade 95%	(b)
Mistura de Microrganismos	10 ⁻⁶	Cetrimide 42°C versus 35°C	22,33	(12,23 32,60)	*
		MPAC 42°C versus Cetrimide 42°C	69,66	(54,90 84,66)	*
		MPAC 42°C versus Cetrimide 35°C	91,99	(78,31 106,0)	*
	10 ⁻⁷	Cetrimide 42°C versus 35°C	-0,33	(-2,15 1,40)	ns
		MPAC 42°C versus Cetrimide 42°C	19,99	(19,89 25,58)	*
		MPAC 42°C versus Cetrimide 35°C	19,66	(14,60 25,28)	*
<i>P. aeruginosa</i>	10 ⁻⁶	Cetrimide 42°C versus 35°C	-51,96	(-75,03 -29,13)	*
		MPAC 42°C versus Cetrimide 35°C	-23,61	(-47,3 0,09)	ns
		MPAC 42°C versus Cetrimide 42°C	28,35	(5,98 50,64)	*
	10 ⁻⁷	Cetrimide 42°C versus 35°C	-9,01	(-17,25 -0,85)	*
		MPAC 42°C versus Cetrimide 35°C	13,32	(3,63 23,17)	*
		MPAC 42°C versus Cetrimide 42°C	22,23	(13,26 31,57)	*

(a) estimativas obtidas pelo Modelo Bayesiano de Poisson; (b) interferência estatística à 95% de confiança.

*= diferenças significativas entre as médias das contagens.

ns= diferenças não significativas entre as médias das contagens.

De acordo com a Tabela 3 os resultados comparativos das médias obtidas evidenciam que, para o teste de seletividade com a mistura de microrganismos, há diferença significativa entre os meios M-PA-C e Cetrimide nas duas diluições utilizadas, sendo o meio M-PA-C aquele que apresentou maiores valores para a média.

Os resultados para a recuperação de células de *P. aeruginosa*, foram semelhantes, não havendo diferença significativa entre M-PAC e Cetrimide a 35°C na diluição 10⁻⁶.

A Tabela 4 mostra a pesquisa de *P. aeruginosa* nas 15 amostras de água mineral, realizada em duplicata (1° e 2° testes), utilizando-se os meios Cetrimide e M-PA-C. Estes resultados foram delineados por um modelo Bayesiano de efeitos aleatórios para dados binários correlacionados, utilizando-se distribuições a priori não informativas. Com base neste modelo, verificou-se que não há evidências de que a frequência de *P. aeruginosa* seja diferente entre os dois meios nas diferentes temperaturas.

Tabela 4. Isolamento de *P. aeruginosa* realizada em duplicata de 15 amostras de água mineral, utilizando-se os meios Cetrimide e M-PA-C a 35°C e 42°C.

Amostra de Água Mineral	Meio de cultura					
	Cetrimide 35°C		Cetrimide 42°C		M-PA-C 42°C	
	1º Teste	2º Teste	1º Teste	2º Teste	1º Teste	2º Teste
1	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+
3	+	-	+	+	+	-
4	+	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+	+
6	+	+	+	+	+	+
7	+	+	+	+	+	+
8	-	-	-	-	-	-
9	-	-	+	+	+	+
10	-	-	-	-	-	-
11	+	+	+	+	-	-
12	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-

Observou-se que a recuperação de microrganismos testados na mistura, no meio PCA a 35°C por 24 horas, ocorreu até a diluição 10⁻⁷ (o que significou que a quantidade de microrganismos utilizada como interferentes foi semelhante). Quanto à análise da seletividade dos dois meios, utilizando-se a diluição 10⁻¹ de cada microrganismo interferente, verificou-se que somente o *Proteus mirabilis* cresceu no meio Cetrimide (>300 UFC nos três testes).

Durante a contagem de *P. aeruginosa* observou-se que algumas espécies infiltraram-se nas malhas das membranas de 0,45µm de porosidade, prejudicando o crescimento de colônias isoladas e a determinação de UFC. Hasegawa et al.¹⁶, recomendam para a pesquisa de *P. aeruginosa* a utilização de membranas com porosidade de 0,22µm devido a capacidade do microrganismo transpor as malhas da membrana de 0,45µm.

CONCLUSÕES

Os meios Agar M-PA-C e Agar Cetrimide apresentaram desempenho semelhante na recuperação da *P. aeruginosa*, tanto nos testes para a cepa ATCC quanto para a mistura com outros microrganismos.

O meio Agar M-PA-C demonstrou ser mais seletivo do que o Agar Cetrimide.

O presente estudo confirma que os meios Agar Cetrimide e Agar M-PA-C são adequados e equivalentes para a pesquisa de *P. aeruginosa* em amostras de água mineral.

REFERÊNCIAS

1. Lennette EH, Balows A, Hausler Jr WJ, Shadomy HJ. Manual of Clinical Microbiology. 4th. Washington DC., 1985.
2. Ramalho R, Cunha J, Teixeira P, Gibbs PA. Modified Pseudomonas agar: new differential medium for the detection/enumeration of *Pseudomonas aeruginosa* in mineral water. J Microbiol Methods 2002; 49: 69-74.
3. Simões M, Chiarini PFT, Pires MFC. *Pseudomonas aeruginosa*, bactérias heterotróficas e leveduras em água utilizada para hemodiálise. Rev Inst Adolfo Lutz 2003; 62 (supl 1): 3.
4. Legnani P, Leoni E, Rapuano S, Turin D, Valenti C. Survival and growth of *Pseudomonas aeruginosa* in natural mineral water: a 5- year study. Intern J Food Microbiol 1999; 53 (2-3):153-8.
5. Pisani B, Simões M, Prandi MA, Rocha MMM, Gonçalves CR, Vaz TMI, Irino K. Surto de bacteriemia por *Pseudomonas aeruginosa* na Unidade de Hemodiálise de um hospital de Campinas, São Paulo, Brasil, Rev Inst Adolfo Lutz 2000; 59(1/2): 51-6.
6. Jayasekara NY, Heard GM, Cox JM, Fleet GH. Populations of pseudomonads and related bacteria associated with bottled non-carbonated mineral water. Food Microbiol 1998; 15:167-76.
7. Gelli DS, Ristori CA, Buzzo AA. Controle de qualidade em laboratório de microbiologia de alimentos e avaliação de desempenho de meios de cultura no isolamento de *Salmonella* spp. Rev Inst Adolfo Lutz 2003; 62 (3):159-64.
8. Resolução RDC – N° 154 de 15 de junho de 2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Ministério da Saúde, que estabelece os parâmetros da água utilizada para diálise. Diário Oficial da União, Brasília-DF, 19 jun.2000.
9. Eaton AD, Clesceri LS, Greenberg AE. Standard Methods for the examination of water and wastewater. Part 9000 Microbiological Examination 19th ed. Washington DC, (APHA) 1995.
10. Difco Laboratories, Maryland, Section II, Culture Media and Ingredients, Dehydrated, Difco Manual 11th ed. Maryland, 1998.
11. Sant'Ana AS, Silva SCFL, Farani IO Jr, Amaral CHR, Macedo VF. Qualidade microbiológica de águas minerais. Cienc Tecnol Aliment 2003; 23 (supl): 190-4.
12. Prandi MAG, Martini MH, Pisani B, Simões M, Chiarini PFT. Águas minerais: avaliação da qualidade microbiológica em amostras envasadas. Rev Inst Adolfo Lutz 2005; 64 (supl.2): 35
13. Spiegelhalter DJ, Abrams KR, Myles JP. Bayesian approaches to clinical trials and health-care evaluation. Chichester: John Wiley & Sons; 2004.
14. Gilks WR, Richardson S, Spiegelhalter DJ. Markov Chain Monte Carlo in Practice. London: Chapman & Hall; 1996
15. Spiegelhalter DJ, Thomas A, Best N, Gilks W. BUGS (Bayesian Inference Using Gibbs Sampling) Version 0.50. Cambridge: MRC Biostatistics Unit; 1995.
16. Hasegawa H, Naganuma K, Nakagawa Y, Matsuyama T. Membrane Filter (pore size, 0,22 – 0,45 µm; thickness, 150 µm) passing-through activity of *Pseudomonas aeruginosa* and other bacterial species with indigenous infiltration ability. FEMS Microbiology Letters 2003; 223: 41-6.

Avaliação da qualidade de óleos e gorduras utilizados para fritura no comércio da região metropolitana da Baixada Santista, estado de São Paulo

Assessment of food frying-oils and-fats marketed in Santos metropolitan area, São Paulo state.

RIALA6/1101

Mário TAVARES^{1*}, Eduardo GONZALEZ¹ Maria de Lourdes Paixão da SILVA^{1b}, Roberto Carlos Fernandes BARSOTTI^{1b}, Edna Emy KUMAGAI^{2b}, Miriam Solange Fernandes CARUSO², Sabria AUED-PIMENTEL², Valter RUVIERI², Daniela Lambert de SOUZA³

* Endereço para correspondência: Rua Silva Jardim, 90. Vila Nova. CEP 11015-020, Santos, São Paulo.

¹Instituto Adolfo Lutz, Laboratório I, Seção de Bromatologia e Química, Santos, SP.

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

³Bolsista FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.

Recebido: 22/12/2006 – Aceito para publicação: 30/04/2007

RESUMO

Os óleos e as gorduras são comumente utilizados na fritura de alimentos. Durante o aquecimento prolongado, os óleos e gorduras sofrem uma série complexa de reações com a produção de compostos de degradação, que modificam a sua qualidade e os produtos resultantes podem causar danos à saúde do consumidor. O objetivo deste trabalho foi o de avaliar a qualidade de óleos e gorduras utilizados para fritura de alimentos no comércio da Região Metropolitana da Baixada Santista, estado de São Paulo. Um total de 100 amostras, 50 coletadas antes da fritura e 50 durante o referido processamento foram analisadas, quanto ao índice de refração a 40°C, acidez, teor de ácido linolênico, temperatura, compostos polares (método “Fri-Check”) e “Oil Test”. Dentre as amostras coletadas antes da fritura, todas aquelas referentes a óleo de soja apresentaram conteúdo de ácido linolênico superior ao limite máximo de 2% recomendado pelo Ministério da Saúde e pela legislação internacional. Todas as amostras coletadas durante a fritura exibiram pelo menos uma das características físico-químicas – com resultados insatisfatórios, e 41 (82%) das amostras apresentaram temperatura acima dos 180°C, valor máximo estabelecido pela Resolução RDC nº 216/2004 da ANVISA/MS. Sugere-se que haja estabelecimento urgente de ações para garantir maior controle da qualidade dos óleos e gorduras utilizados em frituras, além de rigorosa fiscalização por parte dos órgãos competentes.

Palavras-chave. óleos e gorduras, frituras, temperatura, compostos polares, legislação, saúde pública.

ABSTRACT

Oils and fats are largely used for frying foods in Brazil. A prolonged oils and fats heating induces several complex chemical reactions, and produces their compounds degradation, which modify their quality and might cause health hazard to consumers. The purpose of this study was to assess the quality of oils and fats employed for frying foods in Santos metropolitan area, São Paulo state. One hundred samples were analyzed, being 50 of them collected before being used, and 50 during the frying process. The refractive index at 40°C, acidity, linolenic acid contents, temperature, polar compounds (“Fri-Check” method), and “Oil Test” were investigated. Among samples collected before frying procedure, all of the soybean oils showed linolenic acid contents above the maximum limit (2%) recommended by the Brazilian Ministry of Health and international legislation. All of the samples collected during frying procedure showed at least one of the physics-chemical characteristics determination with an inappropriate result, as for 41 (82%) of them registered temperatures above the limit of 180°C established by the Brazilian Ministry of Health Resolution RDC nº 216/04. An intensive plan to guarantee the quality control of oils and fats employed for frying foods, and a close surveillance by the related public departments should be established and bring it into action.

Key words. oils and fats, frying, temperature, total polar compounds, legislation, public health.

INTRODUÇÃO

A utilização de óleos e gorduras comestíveis em fritura é um dos métodos mais empregados na preparação de alimentos, pois eles atuam como transferidores de calor e como importantes ingredientes do produto final^{1,2}.

O repetido aquecimento dos óleos e gorduras, principalmente os poliinsaturados, como o de soja, resulta em acúmulo de produtos de decomposição, que não só afetam a qualidade dos alimentos submetidos à fritura, especialmente os atributos sensoriais (aparência, odor e sabor) como a saúde humana^{2,3}.

Baseados no exposto, vários países vieram a estabelecer regulamentos técnicos para o controle da qualidade dos óleos e gorduras utilizados para fritura, fixando limites máximos para os compostos polares (de 24 a 27%) e, em alguns deles, também para acidez (de 1,0 a 4,5%, expressa em ácido oléico)^{2,4,5}. No Brasil, a legislação estabelece apenas a temperatura máxima de 180°C durante a fritura¹, enquanto que a acidez (máximo de 0,9%) e os compostos polares (máximo de 25%) constam de Informe Técnico⁶.

Além dos parâmetros acima citados, têm sido desenvolvidos procedimentos rápidos para tal controle, como por exemplo o kit conhecido como "Oil Test"⁷.

Preocupados com os possíveis danos à saúde dos consumidores pela ingestão de alimentos fritos e o consumo cada vez maior dos mesmos, diversos trabalhos têm sido desenvolvidos e publicados em todo o mundo sobre o tema^{2,3,8,9,10}.

Algumas regiões brasileiras não têm, dentro da literatura consultada, qualquer estudo publicado nesse sentido. Uma delas é a Região Metropolitana da Baixada Santista, integrada por nove municípios (Bertioga, Cubatão, Guarujá, Itanhaém, Mongaguá, Peruíbe, Praia Grande, Santos e São Vicente), com cerca de 1.650.000 habitantes¹¹.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a qualidade de óleos e gorduras utilizados para fritura de alimentos no comércio da mencionada região.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas 100 amostras (76 de óleo de soja refinado e 24 de gordura vegetal hidrogenada). Destas, 50 foram coletadas antes e 50 no momento da fritura dos alimentos, principalmente pastéis, em lanchonetes, pastelarias e vendedores ambulantes, localizados em diversos bairros dos nove municípios da região metropolitana da Baixada Santista. A coleta foi feita por dois dos autores, acompanhados por agentes da Vigilância Sanitária daqueles municípios, entre os meses de março e outubro de 2005.

A primeira coleta de amostras foi realizada no município de Santos. Por ser o município com maior número de habitantes da região, foram coletadas 20 amostras, sendo 10 antes e 10 durante a fritura. Nos demais municípios, a amostragem correspondeu à metade daquela.

Cada amostra foi constituída de aproximadamente 100mL do óleo ou gordura, acondicionada em frasco plástico opaco, com tampa, lacrado, numerado de 01 a 50, seguido da letra A para as amostras obtidas antes da fritura e B durante a fritura.

Nas amostras coletadas antes da fritura, foram determinados em laboratório, em duplicata, os seguintes ensaios: valor de acidez, expresso em ácido oléico, índice de refração a +40°C, utilizando o refratômetro de Abbe digital, e o conteúdo de ácido linolênico, de acordo com a metodologia descrita nos "Métodos físico-químicos para análise de alimentos"¹².

No caso das amostras submetidas à fritura, foram feitas as seguintes determinações no momento da coleta: leitura da temperatura na presença dos alimentos, com auxílio de termômetro com escala interna de mercúrio, graduado de -10°C a +250°C e teste colorimétrico empregando o kit "Oil Test". Este consta de três reativos e uma escala de quatro cores, com a seguinte interpretação após o procedimento: azul (bom), azul-verde (regular), verde (trocar) e verde-oliva (péssimo)⁷.

Em laboratório, foram determinados em duplicata a acidez em ácido oléico; índice de refração a +40°C, conforme os métodos anteriormente citados¹²; compostos polares, quantificados por leitura direta no aparelho eletrônico conhecido como "Fri-Check", de fabricação belga, recentemente introduzido no Brasil, que se baseia nas alterações da viscosidade, densidade e tensão superficial dos óleos e gorduras usados em fritura^{3,13}. Foi aplicado o fator 1,25 aos resultados obtidos com o emprego do citado aparelho, a fim de que não diferenciassem estatisticamente dos valores que seriam verificados se fosse utilizado o método oficial da American Oil Chemists' Society Cd 20-91¹³.

Todos os ensaios laboratoriais foram realizados na Seção de Bromatologia e Química do Laboratório I do Instituto Adolfo Lutz, em Santos/SP, exceto o de ácido linolênico, que foi efetuado no Laboratório de Cromatografia da Divisão de Bromatologia e Química do Instituto Adolfo Lutz, em São Paulo/SP.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados referentes às amostras coletadas nos nove municípios encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1. Resultados das análises realizadas nas amostras de óleos e gorduras, coletadas antes e durante a fritura de alimentos, no comércio da região metropolitana da Baixada Santista, estado de São Paulo, no ano de 2005.

DADOS GERAIS		ANTES DA FRITURA (A)				DURANTE A FRITURA (B)			
Amostras	Tipo de óleo ou gordura	Índice de Refração a 40° C	Acidez em C18:1 (g/100g)	Ácido linolênico C18:3 (g/100g)	Temperatura (°C)	Acidez em C18:1 (g/100g)	CP Método "Fri-Check" (%)	Índice de Refração a 40° C	"Oil Test"
Santos									
01	OSR**	1,4680	0,13	4,7	190	0,2	8	1,4684	Bom
02	GVH***	1,4638	0,13	0,3	225	0,1	13	1,4636	Bom
03	OSR	1,4682	0,13	5,0	202	0,2	7	1,4687	Bom
04	GVH	1,4642	0,13	0,9	169	1,6	33	1,4630	Regular
05	OSR	1,4682	0,13	4,1	212	0,2	15	1,4693	Regular
06	OSR	1,4685	0,13	4,8	213	0,1	4	1,4685	Bom
07	OSR	1,4684	0,13	4,9	180	0,9	78	1,4705	Trocar
08	OSR	1,4679	0,13	3,8	207	0,7	40	1,4693	Trocar
09	OSR	1,4684	0,13	4,0	189	0,5	14	1,4686	Trocar
10	OSR	1,4685	0,13	4,0	230	0,3	43	1,4697	Trocar
Guarujá									
11	GVH	1,4661	0,13	0,2	190	0,3	11	1,4659	Bom
12	GVH	1,4641	0,13	0,2	183	1,8	23	1,4646	Regular
13	OSR	1,4683	0,13	4,5	180	1,0	20	1,4667	Trocar
14	OSR	1,4685	0,13	4,2	202	0,7	64	1,4702	Trocar
15	OSR	1,4676	0,13	5,3	193	0,2	6	1,4686	Bom
São Vicente									
16	OSR	1,4677	0,13	4,7	190	0,8	29	1,4691	Trocar
17	OSR	1,4677	0,13	4,6	180	0,4	19	1,4695	Regular
18	OSR	1,4678	0,13	4,2	192	0,8	23	1,4656	Regular
19	GVH	1,4641	0,13	0,9	167	0,7	26	1,4753	Bom
20	OSR	1,4682	0,13	5,8	195	0,3	35	1,4700	Trocar
Peruíbe									
21	OSR	1,4677	0,20	4,8	193	0,3	19	1,4686	Regular
22	OSR	1,4679	0,13	4,3	195	0,3	5	1,4675	Bom
23	OSR	1,4680	0,20	4,6	195	0,5	47	1,4701	Trocar
24	ORS	1,4677	0,20	4,6	230	0,4	20	1,4791	Regular
25	OSR	1,4680	0,13	6,1	220	0,4	35	1,4697	Trocar
Praia Grande									
26	GVH	1,4651	0,13	1,1	190	0,4	9	1,4657	Bom
27	OSR	1,4683	0,13	4,0	185	1,1	78	1,4655	Trocar
28	OSR	1,4684	0,12	4,8	203	1,0	45	1,4721	Péssimo
29	GVH	1,4593	0,12	0,2	195	2,7	19	1,4628	Regular
30	GVH	1,4653	0,13	1,1	168	11,3	19	1,4656	Trocar
Itanhaém									
31	OSR	1,4687	0,12	5,9	210	0,6	68	1,4708	Trocar
32	OSR	1,4687	0,12	5,9	210	0,7	20	1,4675	Bom
33	OSR	1,4683	0,12	3,6	210	0,2	8	1,4690	Bom
34	OSR	1,4686	0,12	4,9	210	0,3	6	1,4789	Bom
35	OSR	1,4686	0,12	5,5	197	0,2	35	1,4698	Regular
Bertioga									
36	GVH	1,4653	0,12	2,8	198	0,8	46	1,4647	Bom
37	OSR	1,4678	0,12	2,6	182	1,3	37	1,4681	Trocar
38	GVH	1,4634	0,12	0,1	235	0,1	41	1,4626	Bom
39	GVH	1,4652	0,12	2,8	195	0,5	35	1,4645	Regular
40	GVH	1,4633	0,12	0,3	229	0,4	41	1,4640	Bom
Cubatão									
41	OSR	1,4681	0,12	4,3	192	0,1	6	1,4684	Bom
42	OSR	1,4680	0,12	4,4	200	0,3	6	1,4689	Regular
43	OSR	1,4683	0,12	5,6	170	8,0	16	1,4682	Trocar
44	OSR	1,4682	0,12	1,5	184	0,2	8	1,4691	Regular
45	OSR	1,4680	0,12	4,3	208	0,5	32	1,4697	Trocar
Mongaguá									
46	OSR	1,4679	0,12	3,6	235	0,2	9	1,4698	Regular
47	OSR	1,4681	0,12	5,9	204	0,2	3	1,4691	Bom
48	OSR	1,4682	0,12	4,8	210	0,2	5	1,4692	Regular
99	OSR	1,4680	0,12	3,9	168	0,3	6	1,4688	Regular
50	OSR	1,4680	0,12	3,7	175	0,2	3	1,4687	Bom

*Compostos Polares – **OSR= Óleo de Soja Refinado – ***GVH= Gordura Vegetal Hidrogenada

Pode-se observar que a temperatura no momento da fritura foi o ensaio com maior número de resultados insatisfatórios, ou seja, 41 (82%) amostras apresentaram valores acima de 180°C. Cabe notar que todas as amostras coletadas nos municípios de Bertioga (números 36 a 40), Itanhaém (31 a 35) e Peruíbe (21 a 25) estiveram em desacordo quanto a este parâmetro.

Ainda com respeito à temperatura, a mais alta dentre todas foi de 235°C, verificada em Bertioga (amostra número 38) e em Mongaguá (número 46).

Ressalte-se que entrou em vigor, no Brasil, em março de 2005 o regulamento técnico sobre Boas Práticas para Serviços de Alimentação, estabelecendo em 180°C a temperatura máxima para fritura¹. Coincidentemente, o início da parte experimental desta pesquisa ocorreu na mesma ocasião.

Durante as coletas, verificou-se que a maioria das fritadeiras das pastelarias e dos vendedores ambulantes não dispunha de qualquer controle de temperatura, como um simples termômetro, ao contrário das grandes redes de lanchonetes, o que contribuiu significativamente para o elevado percentual de resultados condenatórios.

O segundo ensaio com maior número de resultados em desacordo com a legislação internacional^{4,5,9} e o Informe Técnico brasileiro⁶ foi o dos compostos polares, considerada a mais importante característica de qualidade dos óleos e gorduras empregados em fritura. De um total de 50 amostras analisadas, 20 (40%) superaram o limite máximo de 25% recomendado em nosso país e a faixa de 24 a 27% estabelecida em outros^{4,5,6,9}. Pesquisa realizada no município de São José do Rio Preto/SP, com 58 amostras, observou que 12 (20,7%) superaram o limite de 25%⁸.

A exemplo do ocorrido com a temperatura, a totalidade das amostras do município de Bertioga ultrapassou o limite e a faixa de valores supra-citados para os compostos polares (números 36 a 40). No entanto, o valor mais elevado (78) foi obtido em Praia Grande (amostra número 27) e em Santos (número 07).

Deve ser destacado que o equipamento utilizado na determinação dos compostos polares, conhecido como Fri-Check, corroborou o referido na literatura de que se trata de uma alternativa rápida, eficiente e sem requerer reagentes tóxicos no monitoramento de óleos e gorduras empregados em frituras^{1,13}.

Quanto à acidez do óleo ou gordura durante a fritura, expressa em ácido oléico, também prevista nos regulamentos técnicos internacionais^{2,4,5} (máximo 1,0%) e no referido informe técnico nacional⁶ (máximo 0,9%), verificou-se que, de um total de 50 amostras coletadas, 9 (18%) apresentaram resultado insatisfatório, sendo quatro amostras coletadas em Praia Grande (amostras números 27 a 30), duas em Guarujá (números 12 e 13), uma amostra coletada em Santos (número 04), uma em Bertioga (número 37) e mais uma em Cubatão (número 43).

Os maiores valores encontrados para a acidez no momento da fritura foram de 8,0g/100g, em Cubatão, utilizando-se óleo de soja (amostra número 43), e de 11,3g/100g, em Praia Grande, com gordura vegetal hidrogenada (GVH) (número 30).

Observe-se que a GVH que é mais utilizada por grandes redes de lanchonetes, apresenta preço mais elevado se comparado ao óleo de soja e, segundo a literatura, oferece maior resistência à oxidação. No entanto, em termos de acidez não houve diferença pois 5 amostras com resultados insatisfatórios se referiam a óleo de soja refinado e 4 a GVH.

Ainda com relação à acidez, antes da fritura, todas as amostras analisadas estiveram de acordo com o limite máximo estabelecido pela legislação brasileira e internacional (máximo 0,3%)^{4,5,14}.

A mesma constatação se aplica ao índice de refração antes da fritura, cuja faixa de valores varia de 1,4670 a 1,4690 (a +40°C) para os óleos de soja refinados, não sendo fixados valores para as GVHs. Ressalte-se que, em setembro de 2005, quase ao final da execução da parte experimental deste estudo, entrou em vigor a nova legislação brasileira excluindo este parâmetro¹⁴.

No caso das amostras coletadas durante a fritura não há regulamento técnico para o índice de refração vigente no Brasil e no exterior. No entanto, constatou-se que, das 38 amostras de óleo de soja, 31 (82%) exibiram aumento deste índice relativamente ao óleo antes da fritura. Em se tratando de GVH, metade das amostras analisadas revelou acréscimo do índice de refração e a outra metade uma diminuição. Essa constatação permite deduzir que o índice de refração não é um bom parâmetro para controlar a qualidade dos óleos e gorduras empregados em fritura.

A prova de campo denominada "Oil Test", mesmo sendo considerada limitada e subjetiva, a exemplo de outros testes rápidos já testados³, serviu como indicativo da qualidade do óleo ou gordura coletado no momento da fritura, além de ser de fácil execução, podendo ser aplicado por pessoal não especializado⁷.

Das 50 amostras submetidas ao teste acima citado, 17 (34%) indicaram a pronta substituição do óleo, em 16 casos, e da gordura, num único caso. Houve correlação com 13 (65%) dos 20 resultados condenatórios para os compostos polares, ou seja, 13 das 17 amostras cujo teste indicou a troca do óleo ou gordura, ou que os mesmos estavam péssimos, também apresentaram teor de compostos polares acima do limite recomendado em nosso país e no exterior. Em monitoramento semelhante, realizado na cidade de São José do Rio Preto, estado de São Paulo, a correlação chegou a 83%⁷.

Finalmente, nas 50 amostras analisadas antes da fritura quanto ao teor de ácido linolênico, deve ser destacado que todas aquelas correspondentes a óleo de soja refinado tiveram valores acima do recomendado pelo Informe Técnico Nacional e estabelecidos por alguns países, antes de seu emprego em frituras (2%)^{4,5,6,9}. Já as amostras de GVH se enquadraram nesse

limite. Desta maneira, se este valor máximo vier a ser estabelecido em nosso país como regulamento técnico, ficaria inviabilizado o uso do óleo de soja em frituras, o que certamente causaria forte impacto para o comércio desse produto, lembrando que o Brasil é o segundo maior produtor mundial desse óleo.

CONCLUSÕES

A temperatura no momento da fritura esteve superior ao recomendado pela legislação brasileira e internacional na maioria das amostras necessitando, assim, de maior controle por parte dos comerciantes e melhor fiscalização dos órgãos competentes.

A determinação da acidez e do índice de refração serviu como complemento à dos compostos polares na avaliação dos óleos e gorduras empregados em frituras.

O uso do kit "Oil Test" como prova de campo demonstrou bom grau de correlação parcial com a determinação dos compostos polares em laboratório, embora não seja conclusiva.

AGRADECIMENTOS

À FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo auxílio ao presente trabalho (Processo N° 04/09426-1) e à sua apresentação no III Simpósio Brasileiro de Vigilância Sanitária, em Florianópolis/SC, em 2006 (Processo N° 06/04809-5), assim como às equipes da Vigilância Sanitária dos municípios de Bertioga, Cubatão, Guarujá, Itanhaém, Mongaguá, Peruíbe, Praia Grande, Santos e São Vicente, estado de São Paulo, pela colaboração.

REFERÊNCIAS

1. Brasil. Resolução RDC n° 216, de 15 de set. 2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Dispõe sobre Regulamento Técnico de Boas Práticas para Serviços de Alimentação. Disponível em <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?mode=PRI_NT_VERSION &id=12546>. Acesso em: 16 mar. 2005.
2. Lima JR. Parâmetros de avaliação da qualidade de óleo de soja utilizado para fritura. *Quím Nova* 1994; 17(5): 392-6.
3. Gertz C. Chemical and physical parameters as quality indicators of used frying fats. *Eur J Lipid Sci Technol* 2000; 102: 566-72.
4. Código Alimentario Argentino. Ley 18.284, 18/07/69. Capítulo VII, Artículos 520 al 522, Alimentos Grasos, Aceites Alimenticios. (Atualizado al 18 de Mayo de 2003). Disponível em: <<http://www.anmat.gov.ar/codigoa/caa1.htm>>. Acesso em: 23 jun. 2005.
5. Dobarganes C. Frying fats: quality control. In: International Workshop on Fats, Oils and Oilseeds Analysis. Rio de Janeiro, IUPAC, 2000. Book of conferences.
6. Brasil. Informe Técnico n° 11, de 5 out. 2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Óleos e gorduras utilizados em frituras. Disponível em: <http://anvisa.gov.br/alimentos/informes/11_051004.htm>. Acesso em: 31 mar. 2005.
7. Mattos ES, Ans VG, Jorge N. Utilização do *Kit Oil Test* para avaliação da alteração dos óleos de fritura. *Hig Aliment* 2000; 11 (75): 40-7.
8. Jorge N, Lopes MRV. Determinação de compostos polares totais em óleos e gorduras de frituras. *Hig Aliment* 2005; 19 (131): 46-50.
9. Lima JR. Avaliação da qualidade de óleo de soja utilizado para fritura [Dissertação de Mestrado]. Campinas, São Paulo: Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 1994.
10. Masson L. Comportamiento de aceites poliinsaturados em la preparaci3n de patatas fritas para consumo inmediato: formaci3n de nuevos compuestos y comparaci3n de métodos analíticos. *Grasas y aceites* 1997; 48: 273-81.
11. Queir3s S. Nove cidades e ainda um desafio. *Expresso Popular*, Santos, 29 e 30 jul. 2006. p. 8.
12. Tavares M, Rodrigues RSM, Takemoto E, Aued-Pimentel S, Caruso MSF. Óleos e Gorduras. In: Instituto Adolfo Lutz. Métodos físico-químicos para análise de alimentos 4ª ed. Brasília: ANVISA; 2005.
13. Osawa CC, Gonçalves LAG, Grimaldi R. Nova ferramenta destinada ao monitoramento e à inspeção "in site" de óleos e gorduras de fritura. *REVISA* 2005; 1(2): 102-7.
14. Brasil. Resolução RDC n° 270 de 23 de set. 2005 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Aprova o Regulamento Técnico referente a Óleos Vegetais, Gorduras Vegetais e Creme Vegetal, constante do anexo desta Resolução. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo*, Brasília, DF, 23 set. 2005. Seção 1, n° 184, p. 372-3.

Avaliação do valor de TBARS em coxas de frangos irradiadas

TBAR values assessment in irradiated chicken legs

RIALA6/1102

Luciana MIYAGUSKU¹, Marcelo THOMAZINI², Arnaldo Yoshiteru KUAYE², Carmen Josefina Contreras CASTILLO^{3*}

*Endereço para correspondência: ESALQ, Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição, Av. Pádua Dias, 11, Caixa Postal 9. CEP 13418-900, Piracicaba/SP. Telefone: (19)3429-4196, e-mail: ccastill@esalq.usp.br

¹Centro de Tecnologia de Carnes/ITAL, Campinas/São Paulo.

²Departamento de Tecnologia de Alimentos/ Faculdade de Engenharia de Alimentos/UNICAMP, Campinas/São Paulo.

³Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição/ ESALQ, Piracicaba/São Paulo.

Recebido: 17/11/2006 – Aceito para publicação: 30/04/2007

RESUMO

O efeito da radiação ionizante em coxas de frango cruas embaladas a vácuo e sob atmosfera modificada e armazenadas a 4 ± 1 °C foi avaliado a partir da análise de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Para amostras embaladas a vácuo foram observados aumentos gradativos nos valores de TBARS conforme o aumento da dose de radiação ionizante para os diferentes dias de armazenamento, porém as diferenças não foram significativas ($p > 0,05$) até o 14º dia quando os respectivos períodos foram comparados. Amostras irradiadas com 1,5 kGy e 3,0 kGy e embaladas sob atmosfera modificada apresentaram valores de TBARS significativamente ($p < 0,05$) menores em relação às respectivas amostras embaladas a vácuo, exceto no 20º e 26º dia de armazenamento. Os maiores valores de TBARS foram obtidos para as amostras irradiadas com 7,0 kGy com médias de 2,13 e 1,52 mg.kg⁻¹ de malonaldeído em embalagem a vácuo e sob atmosfera modificada respectivamente.

Palavras-chave. embalagem, frango, malonaldeído, oxidação lipídica, radiação ionizante.

ABSTRACT

The effect of ionizing radiation in raw, vacuum and modified atmosphere packed chicken legs and storage at 4 ± 1 °C was evaluated on the basis of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) The vacuum-packed samples exhibited a gradual increase in TBARS values proportional to the radiation dose in the course of the storage period, but the differences were not statistically significant ($p > 0.05$) up to the fourteenth day when the samples exposed to the different radiation doses applied were compared. Samples irradiated with 1.5 kGy and 3.0 kGy and packaged under modified atmosphere showed significantly lower TBARS values as compared to the vacuum-packaged samples, except after 20 and 26 days storage. The maximum TBARS values were obtained from samples irradiated with 7.0 kGy, with mean values of 2.13 and 1.52 mg.kg⁻¹ of malonaldehyde, for the vacuum and modified atmosphere packages respectively.

Key words. packaging; chicken; malonaldehyde; lipid oxidation; ionizing irradiation.

INTRODUÇÃO

Entre as metodologias analíticas disponíveis para acompanhar e compreender o processo de oxidação lipídica em alimentos se destaca a determinação do valor de substâncias reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS). O método permite quantificar o grau de oxidação lipídica do alimento baseado na reação de cor entre malonaldeído e o ácido 2-tiobarbitúrico.

As substâncias reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico são preferencialmente formadas a partir da clivagem de ácidos graxos com duplas ligações. Os hidroperóxidos formados podem originar compostos contendo grupamentos carbonílicos, sendo o malonaldeído o principal alcadienal relacionado com o processo de oxidação lipídica^{1,2,3}.

Os primeiros observadores da coloração rosada produzida pela reação entre TBA e produtos da degradação de lipídios foram Kohn e Liversedge⁴. Porém, utilizou-se pela primeira vez o valor de TBARS, expresso em miligramas de malonaldeído por quilo de amostra, para estudar a oxidação de lipídios em leite⁵. Da mesma forma, Turner et al.⁶ foram os pioneiros ao aplicar o teste em carne de porco congelada, enquanto Sidwell et al.⁷ usaram a metodologia para avaliar óleos de algodão e de soja tratados termicamente.

Estudos sobre a oxidação de lipídios, principalmente em carnes, continuaram a ser conduzidos por diversos pesquisadores^{8,9,10}. A interferência de alguns aminoácidos, ácidos graxos, açúcares e sais na obtenção de valores de TBARS em peixes apontou variações entre 1% a 7% dependendo da quantidade dos compostos adicionados¹¹.

O valor de TBARS foi proposto como análise adequada para monitorar mudanças provenientes da rancidez oxidativa em carnes de frango após a obtenção de correlações significativas com atributos sensoriais típicos do alimento¹².

Dois metodologias para obtenção do valor de TBARS em carne de frango fresca, refrigerada e congelada foram comparadas¹³. Nas condições de armazenamento, os valores de TBARS obtidos por técnicas de destilação foram superiores, porém correlacionados, com os resultados obtidos por técnicas de extração direta. Os mesmos autores¹⁴ relataram que o uso do antioxidante BHT inibiu a autooxidação dos lipídios durante a etapa de destilação.

Outros estudos também foram conduzidos usando os valores de TBARS como indicador do processo de oxidação de lipídios em carnes^{15,16,17}, bem como muitas modificações foram efetuadas nas metodologias convencionais. Excelentes revisões sobre esses aspectos foram publicadas na década passada^{4,18} e uma mais recentemente¹⁹.

A irradiação de carne de frango foi aprovada nos Estados Unidos em 1990 com a finalidade de controlar microrganismos causadores de toxinfecções de origem alimentar²⁰. No Brasil, a Resolução RDC Nº21, de 26/01/2001 da ANVISA, aprovou o "Regulamento Técnico para Irradiação de Alimentos", que

permite a irradiação de qualquer alimento com a condição de que a dose máxima absorvida seja inferior àquela que comprometa as propriedades funcionais e/ou atributos sensoriais do alimento e que a dose mínima absorvida seja suficiente para alcançar o objetivo pretendido²¹.

O presente trabalho utilizou o valor de TBARS para avaliar o efeito da radiação ionizante em coxas de frango cruas refrigeradas embaladas a vácuo e sob atmosfera modificada.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras

Coxas de frango cruas com ossos e pele foram acondicionadas de duas maneiras: Tratamento 1 – embaladas a vácuo em sacos plásticos de nylon-polietileno (Cryovac) de baixa permeabilidade ao oxigênio (8 ml de O₂/m₂/24h) utilizando uma máquina de embalagens (Selovac 300-B, SP, Brasil); Tratamento 2 – distribuídas em bandejas comerciais (240 mm comprimento x 180 mm largura x 30 mm altura) de poliestireno expandido, recobertas com filme de polietileno (Cryovac) e embaladas em atmosfera modificada composta por uma mistura de N₂ (30%) e CO₂ (70%). Cada embalagem continha aproximadamente 200 gramas de amostra. Dez embalagens de cada tratamento foram colocadas em caixas de papelão (600 mm comprimento x 420 mm largura x 100 mm largura). Cinco caixas de papelão de cada tratamento foram preparadas e armazenadas a 4±1°C para atender nove coletas de amostras no período de 60 dias.

Irradiação das Amostras

As caixas de papelão contendo as amostras de coxas de frango foram expostas a uma fonte de radiação ionizante de Cobalto 60 com taxa de dose igual a 4,5 kGy.h⁻¹. O tempo de irradiação foi calculado para alcançar doses de 1,5 kGy; 3,0 kGy; 5,0 kGy e 7,0 kGy de radiação ionizante, as quais foram monitoradas por dosímetros Amber 3042 (Harwell Dosimeters, OX, UK).

Determinação de TBARS

Preparo da Amostra

A determinação foi realizada pelo método de destilação³. Dez gramas de amostra foram pesadas em um copo de homogeneizador (OMNI-MIXER, Sorvall). Adicionou-se 50 ml de água destilada e 3 gotas de antiespumante. Homogeneizou-se por 2 minutos a 4000 rpm. A mistura foi transferida quantitativamente para um balão de fundo chato de 250 ml e o copo lavado com 46,5 ml de água destilada aquecida a 40 °C. O meio foi então acidificado com 2,5 ml de HCl 4N. O balão foi posicionado na manta aquecedora e conectado ao sistema de destilação. O destilado foi recolhido até preencher um balão volumétrico de 50 ml. Uma alíquota de 5,0ml foi transferida para um tubo de ensaio com tampa de rosca

juntamente com 5,0 ml de uma solução de ácido 2-tiobarbitúrico 0,02M (Sigma Aldrich). Os tubos de ensaio foram mantidos por 35 minutos em banho-maria fervente para formação da cor. A leitura da absorbância foi realizada em 532nm no espectrofotômetro Cary 1E (Varian, CA, USA).

Preparo da Curva Padrão

Preparou-se uma solução aquosa de 1,1',3,3' tetraetoxipropano (Sigma Aldrich) a $1,0 \times 10^{-8}$ M. Alíquotas de 1, 2, 3, 4 e 5 ml foram transferidas para tubos de ensaio com tampa de rosca e o volume completo para 5,0 ml com água destilada. Após acrescentar 5,0 ml da solução de 2-ácido tiobarbitúrico 0,02 M (Sigma Aldrich), os tubos foram mantidos em banho-maria fervente por 35 minutos para formação da cor e subsequente leitura da absorbância em 532 nm.

Porcentagem de Recuperação do Malonaldeído

Foi realizado para três diferentes concentrações de 1,1',3,3'-tetraetoxipropano (2,21; 4,42; 6,64 mg.kg⁻¹) adicionados na amostra antes da destilação.

Cálculo do Valor de TBARS

As absorbâncias foram multiplicadas pela constante de destilação (K) obtida pela fórmula a seguir, e o resultado expresso em mg.kg⁻¹ de malonaldeído.

$K = S/A * 72,063 * 10^7 / C * 100 / P$, onde:

S = concentração de 1,1',3,3' tetraetoxipropano (M)

A = absorbância em 532 nm

72,063 = massa molecular do malonaldeído (g.mol⁻¹)

C = massa da amostra (g)

P = porcentagem de recuperação (%)

Análise Estatística

Os dados foram obtidos em triplicata e submetidos à análise de variância e comparação de médias pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) com auxílio do software Statistica (StatSoft, OK, USA)²².

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O ensaio de recuperação do malonaldeído revelou que amostras com menores concentrações de tetraetoxipropano apresentaram maior porcentagem de recuperação, com valor médio igual a 79,0% (Tabela 1). Foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) nas recuperações obtidas entre as diferentes concentrações, apontando a necessidade de realizar ensaios de recuperação para cada concentração de tetraetoxipropano usado na curva padrão e sua respectiva utilização nos cálculos das constantes de destilação (K). Considerando as recuperações de malonaldeído adicionado nas três diferentes concentrações, obteve-se uma média global igual a 72,4%.

Tabela 1. Recuperação de malonaldeído no método de determinação de TBARS por destilação aplicado em coxas de frangos cruas.

Malonaldeído Adicionado (mg/kg)	Malonaldeído Recuperado (mg/kg)	Recuperação (%) *
2,21	1,76 ± 0,01	79,0 ± 0,1 ^a
4,42	3,13 ± 0,01	70,7 ± 0,6 ^b
6,64	4,50 ± 0,01	67,8 0,6 ^c
	Média	72,4 ± 5,9

* Letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre as médias.

Embora o método de análise de TBARS por destilação abaixo o pH do meio reacional e utilize aquecimento para a formação da cor, o procedimento foi adequado para o isolamento do malonaldeído, promovendo a obtenção de isolados limpos e evitando a reação do TBA com componentes não-voláteis presentes nas amostras.

A melhor aplicabilidade do método proposto³ utilizado neste estudo encontra argumentos adicionais nos trabalhos^{12,23,24} que relataram correlações entre os odores de ranço e os isolados lípidos obtidos por destilação.

Aumentos gradativos nos valores de TBARS foram observados conforme o aumento da dose de radiação ionizante, independente do tipo de embalagem utilizada. A Figura 1 mostra ainda que os valores máximos de TBARS foram atingidos ao redor de 30 dias de armazenamento para amostras irradiadas com 3,0 kGy, 5,0 kGy e 7,0 kGy.

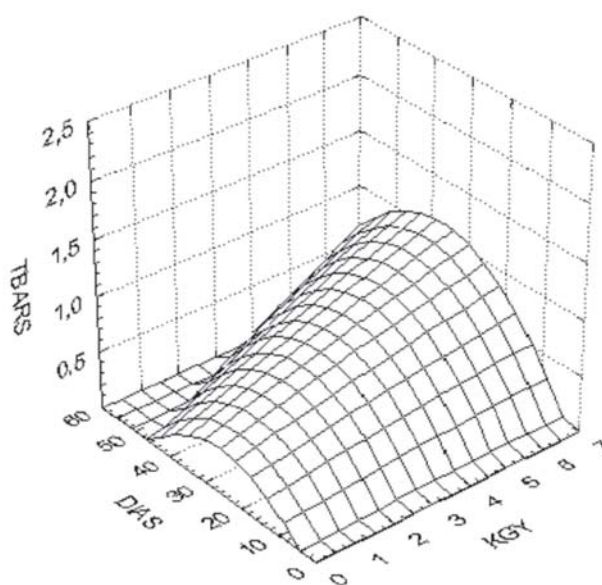


Figura 1. Superfície de resposta obtida para valores de TBARS (mg/kg) em coxas de frangos cruas irradiadas e armazenadas à temperatura de $4 \pm 1^\circ\text{C}$.

Os valores de TBARS foram superiores nas amostras irradiadas quando comparadas com as amostras não irradiadas, sendo esse fato mais pronunciado nas coxas de frangos cruas embaladas a vácuo (Figura 2), com exceção do 20° e 26° dia de armazenamento, onde os valores de TBARS foram significativamente maiores ($p < 0,05$) nas amostras embaladas sob atmosfera modificada.

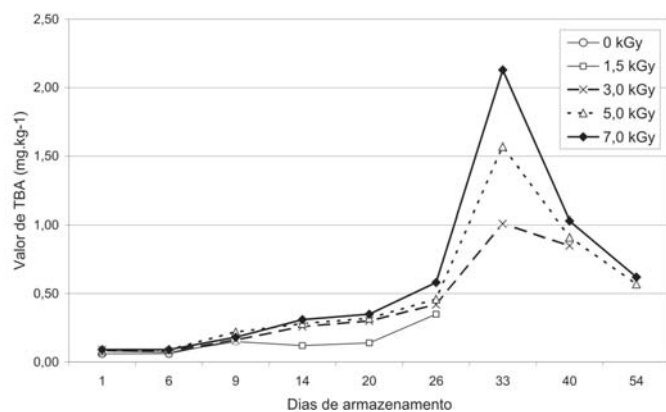


Figura 2. Valores de TBARS observados ao longo do armazenamento refrigerado de coxas de frangos cruas embaladas a vácuo e submetidas à radiação ionizante.

Para amostras tratadas com 1,5 kGy e 3,0 kGy o preenchimento da embalagem com a mistura de gases CO_2 e N_2 contribuiu significativamente ($p < 0,05$) para atenuar o efeito da radiação ionizante até o 14° dia de armazenamento e minimizar o efeito sobre a oxidação de lipídios (Figura 3).

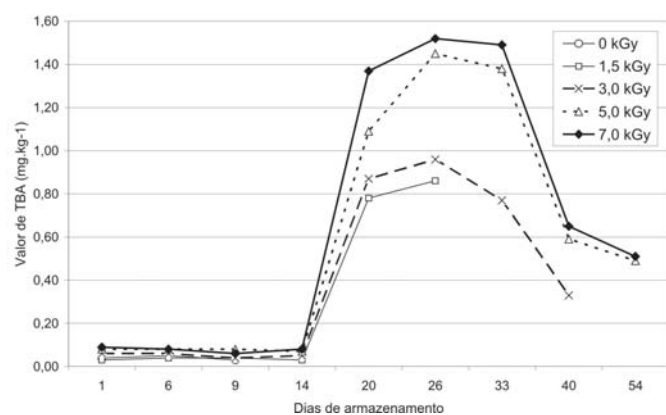


Figura 3. Valores de TBARS observados ao longo do armazenamento refrigerado de coxas de frangos cruas embaladas sob atmosfera modificada e submetidas à radiação ionizante.

Entre as amostras irradiadas, os valores de TBARS aumentaram conforme ocorreu o aumento da dose de radiação ionizante, mantendo-se baixos até o 14° dia de armazenamento nos dois tipos de embalagens. As amostras irradiadas com 1,5kGy e 3,0 kGy apresentaram resultados similares ao

longo dos dias de armazenamento, atingindo valores máximos de TBARS com médias iguais a 0,81 e 1,01 mg.kg^{-1} , respectivamente. As amostras irradiadas com 5,0 kGy e 7,0 kGy prolongaram o armazenamento e mostraram valores máximos de TBARS iguais a 1,57 e 2,13 mg.kg^{-1} , respectivamente.

As amostras não irradiadas permaneceram estocadas até o 9° dia e apresentaram valor máximo de TBARS igual a 0,15 mg.kg^{-1} . As amostras irradiadas com doses de 1,5 kGy preservaram-se até o 26° dia de armazenamento, enquanto que amostras tratadas com doses de 3,0 kGy, 5,0 kGy e 7,0 kGy permitiram análises de TBARS além dos 30 dias.

CONCLUSÃO

A determinação de TBARS permitiu indicar o estado oxidativo das coxas de frangos cruas embaladas, bem como evidenciar o efeito da radiação ionizante. Durante as primeiras duas semanas de armazenamento refrigerado, para amostras irradiadas com 1,5 kGy e 3,0 kGy, foram observadas atenuações nos valores de TBARS de coxas de frangos cruas embaladas sob atmosfera modificada quando comparadas com as amostras embaladas a vácuo. Os resultados de TBARS obtidos neste trabalho apontaram melhor aplicação da radiação gama para amostras de coxas de frangos cruas irradiadas com doses não superiores a 3,0 kGy.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao apoio financeiro concedidos pela Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e pelo Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

REFERÊNCIAS

1. Kosugi H, Kato T, Kikugawa K. Formation of red pigment by a two-step 2-thiobarbituric acid reaction of alka-2,4-dienals. Potential products of lipid oxidation. *Lipids* 1998; 23: 1024-31.
2. Marcuse R, Johansson L. Studies on the TBARS test for rancidity grading: II TBARS reactivity of different aldehyde classes. *J Am Oil Chem Soc* 1973; 50: 387-91.
3. Tarladgis BG, Watts BM, Younathan MT. A distillation method for the quantitative determination of malonaldehyde in rancid foods. *J Am Oil Chem Soc* 1960; 37: 44-8.
4. Hoyland DV, Taylor AJ. A review of the methodology of the 2-thiobarbituric acid test. *Food Chem* 1991; 40: 271-91.

5. Patton S, Kurtz GW. 2-Thiobarbituric acid as a reagent for detecting milk fat oxidation. *J Dairy Sci*. 1951; 34: 669.
6. Turner EW et al. Use of the 2-thiobarbituric acid reagent to measure rancidity in frozen pork. *Food Technol* 1954; 8: 326-30.
7. Sidwell CG, Salwin H, Benca M, Mitchell JHJ. The use of the thiobarbituric acid as a measure of fat oxidation. *J Am Oil Chem Soc* 1954; 31: 603.
8. Sinnhuber RO, Yu TC. 2-Thiobarbituric acid method for the measurement of rancidity in fishery products. II The quantitative determination of malonaldehyde. *Food Technol*. 1958; 12: 9-12.
9. Vyncke W. Evaluation of the direct thiobarbituric acid extraction method for determining oxidative rancidity in mackerel (*Scomber scombrus* L.) *Fette Seifen Anstrich* 1975; 77: 239-240.
10. Yu LW et al. High performance liquid chromatography analysis of the thiobarbituric acid adducts of malonaldehyde and trans, trans-muconaldehyde. *Anal Biochem* 1986; 156: 326-33.
11. Robles-Martinez C, Cervantes E, Ke PJ. Recommended method for testing the objective rancidity development in fish based on TBARS formation. *Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Sci*. n° 1089, 1982, 28 p.
12. Lyon BG, Lyon CE, Ang CYW, Young LL. Sensory analysis and thiobarbituric acid values of precooked chicken patties stored up to three days and reheated by two methods. *Poultry Sci*. 1988; 67: 736-742.
13. Pikul J, Leszczynski DE, Kummerow FA. Evaluation of three modified TBARS methods for measuring lipid oxidation in chicken meat. *J Agric Food Chem* 1989; 37: 1309-13.
14. Pikul J, Leszczynski DE, Kummerow FA. Elimination of sample autoxidation by butylated hydroxytoluene additions before thiobarbituric acid assay for malonaldehyde in fat from chicken meat. *J Agric Food Chem*. 1983; 31: 1338-1342.
15. Ahn DU et al. Effects of dietary vitamin E supplementation on lipid oxidation and volatiles content f irradiated cooked turkey meat patties with different packaging. *Poultry Sci*. 1998; 77: 912-20.
16. Horax R. et al. Effect of gamma irradiation and storage time on thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in chicken breast meat infused with antioxidants and select plant extracts. *The Food Safety Consortium Annual Meeting*, October 13-15, Manhattan.
17. Jo C, Lee JI., Ahn DU. Lipid oxidation, color and volatiles changes in irradiated pork sausages with different fat content and packaging during storages. *Meat Sci* 1999; 51: 355-361.
18. Guillén-Sans R, Guzmán-Chozas M. The thiobarbituric acid (TBARS) reaction in foods: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1998; 38: 315-330.
19. Osawa CC, De Felício PE, Gonçalves LAG. Teste de TBARS aplicado a carnes e derivados: métodos tradicionais, modificados e alternativos. *Quim Nova*. 2005; 28: 655-663.
20. Pauli GH, Tarantino LM. FDA regulatory aspects of food irradiation. *J Food Prot* 1995; 58: 209-12.
21. Resolução RDC nº. 21, de 26 de janeiro de 2001, Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Aprova o Regulamento Técnico para Irradiação de Alimentos. *Diário Oficial da União*, Brasília, nº. 20-E, de 29 de janeiro de 2001. Seção 1, p.35.
22. Statsoft, Inc., Tulsa, OK, USA. *STATISTICA for Windows*. 1995.
23. Greene BE, Cumuze TH Relationship between TBARS numbers and inexperienced panelists' assessments of oxidized flavour in cooked beef. *J Food Sci* 1981; 47: 52-8.
24. Miyagusku L, Chen F, Leitão MF, Baffa O. Avaliação microbiológica e sensorial da vida útil de cortes de peito de frango irradiados. *Cienc Tecnol Aliment* 2003; 23 (Suppl. 1): 7-16.

Refino de óleos de corvina (*Micropogonias furnieri*) provenientes dos processos de ensilagem ácida e termomecânico de farinha

Refinement of corvine (*Micropogonias furnieri*) oil manufactured by means of acid ensilage procedure and thermo treatment processing for meal production

RIALA6/1103

Valéria T. CREXI, Fernanda L. GRUNENVALDT, Leonor A. S. SOARES, Luiz A. A. PINTO*

* Endereço para correspondência: Engenharia de Alimentos FURG. Departamento de Química - Laboratório de Operações Unitárias - Fundação Universidade Federal do Rio Grande. e-mail: dqmpinto@furg.br. Campus Cidade, Rua Engº Alfredo Huch, 475, Caixa Postal 474 - CEP: 96201-900 - Rio Grande - RS - Brasil Telefone: (0xx-53) 3233-8648
Recebido: 26/09/2006 - Aceito para publicação: 30/04/2007

RESUMO

O óleo de pescado constitui importante fonte de ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 (PUFA) benéficos à saúde humana. No entanto, há presença de impurezas que afetam suas características. Esse óleo pode ser obtido a partir do processo de ensilagem ácida e pelo processo termomecânico tradicional de produção de farinha. Para o consumo humano, o óleo deve passar pelo processo de refino. No presente trabalho realizou-se o refino dos óleos de resíduos de corvina (*Micropogonias furnieri*), provenientes dos processos de ensilagem ácida e de tratamento termomecânico, e comparou-se a qualidade final dos óleos refinados. O óleo refinado por meio de ambos processos apresentou características semelhantes. A etapa de "winterização", em ambos os processos, resultou no ganho de ácidos eicosapentaenóico mais docosahexaenóico (EPA+DHA) em torno de 8,5% e redução de ácidos graxos saturados na faixa de 12,5%. Outrossim, os óleos refinados apresentaram teores de ácidos graxos insaturados na faixa de 62%, o que os tornam favoráveis como fonte de ácidos graxos poliinsaturados.

Palavras-chaves. óleo de pescado, ácidos graxos, cor Lovibond, índice de iodo, índice de saponificação, winterização.

ABSTRACT

Fish oil constitutes an important source of poly-unsaturated ω -3 fatty acids (PUFA), which are beneficial human health; however, the occurrence of impurities affects oil characteristics. The corvine oil can be obtained from the ensilage acidification process or from thermo treatment process for meal production. For human consumption, the oil should be passed through a refining process. In the present work, refinement of corvine (*Micropogonias furnieri*) residues was performed by means of acid ensilage and thermo-treatment processes; and also the characteristics of refined oils were compared. Similar characteristics were observed in products from both refinement procedures. The winterization step, in both process, resulted in an increase of EPA+DHA around 8.5%, and a reduction saturated contents in range of 12.5%. Also, the corvine oil refined from both thermo treatment and ensilage processes presented unsaturated fatty acids contents in a range of 62%, which turns to be favorable as a source of unsaturated and polyunsaturated fatty acids (PUFA).

Key words. fish oil, fatty acids, color Lovibond, iodine index, saponification index, winterization.

INTRODUÇÃO

O óleo de pescado constitui importante fonte de ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 (PUFA), principalmente ácidos eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA)¹. Esses ácidos graxos são benéficos à saúde humana, pois são essenciais para o desenvolvimento e funcionalidade de certos órgãos e para algumas respostas bioquímicas e fisiológicas do organismo¹.

Nutricionalmente, o óleo possui alto conteúdo de calorías (37 MJ/kg), o qual é duas vezes maior que o valor de energia de alimentos com carboidratos. Esse óleo também fornece as vitaminas lipossolúveis A, D e E^{2,3}.

O óleo de pescado pode ser obtido a partir do processo de ensilagem ácida, através da acidificação dos resíduos de pescado^{4,5,6}, ou pela elaboração tradicional de farinha, sendo este submetido a processos hidrotérmicos e mecânicos⁷.

Entretanto, o óleo bruto apresenta impurezas e outros compostos como ácidos graxos livres, mono e diacilgliceróis, fosfatídios, esteróides, vitaminas, hidrocarbonetos, pigmentos, carboidratos, proteínas e seus produtos de degradação e materiais coloidais, que o tornam inadequado para o consumo^{8,9}.

O processo de refino busca purificar esse óleo removendo os componentes não triacilgliceróis que afetam a estabilidade do produto de maneira adversa, conferindo ao óleo melhores características^{9,10,11}. O refino químico ou alcalino inclui as etapas de degomagem, neutralização, lavagem, clarificação e desodorização^{8,12}.

O presente trabalho teve por objetivo realizar o refino dos óleos de pescado da espécie corvina (*Micropogonias furnieri*) provenientes dos processos de ensilagem ácida e termomecânico, e comparar as características de identidade dos óleos refinados obtidos.

MATERIAL E MÉTODOS

Matéria-prima

Para obtenção e caracterização dos óleos refinados provenientes dos processos termomecânico e de ensilagem ácida, utilizou-se os óleos brutos de resíduos de corvina (*Micropogonias furnieri*) do processamento de farinha de uma indústria local, e do processo da silagem ácida realizado em laboratório.

Metodologia experimental para a ensilagem

Realizou-se o processo de ensilagem para obtenção do óleo, conforme a metodologia apresentada por Benites¹³.

Para a elaboração da silagem ácida foram utilizados 100kg de resíduos de corvina (*Micropogonias furnieri*), que foram moídos em moedor elétrico, acondicionados em baldes, em seguida acidificados com ácido acético glacial (10% p/v) acrescentando-se antioxidante butil hidroxitolueno, BHT, (250mg/kg). Após o período de 15 dias foi realizada a separação

dos resíduos da silagem, em peneira 14 tyler, para retirada de espinhas e escamas e posterior centrifugação.

Elevou-se a temperatura da silagem a 50°C em banho termostático, depois centrifugou-se este material em centrífuga modelo Sigma 6-15, com rotação de 7000g durante 20 min, obtendo-se a fração sólida da silagem, a parte líquida (ácido acético e água) e o óleo bruto de pescado.

Metodologia experimental para o refino

As etapas do processo de refino para os óleos brutos provenientes dos processos de ensilagem ácida e termomecânico foram realizadas de acordo com a metodologia apresentada por Moraes et al.⁸ e a winterização foi realizada através da metodologia descrita por Cunha et al.¹¹. A etapa de desodorização foi realizada em condições estabelecidas em testes preliminares. A Figura 1 apresenta o diagrama de blocos das etapas do processo de refino realizado.

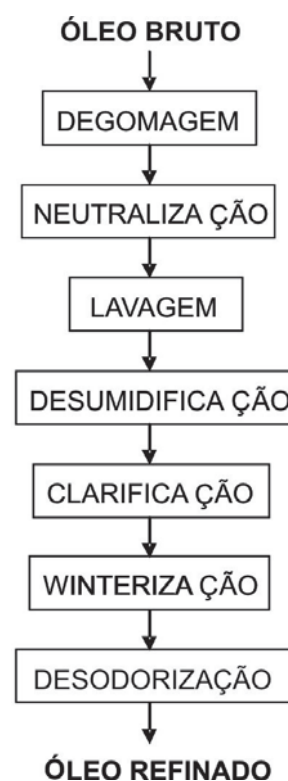


Figura 1. Etapas do processo de refino do óleo bruto de pescado.

No processo de refino, a etapa de degomagem foi realizada durante 30 min, a uma temperatura de 80°C e agitação de 500rpm, com adição de 1,0% de ácido fosfórico (85%) em relação à massa do óleo. A etapa de neutralização ocorreu durante 20min, com uma temperatura de 40°C e agitação de 500rpm, com adição de solução de hidróxido de sódio 20% p/p (utilizando 4,0% de excesso em relação ao índice de acidez determinado após a etapa da degomagem). Após cada etapa, o material foi centrifugado por 20min a 7000g, para a separação do óleo⁸.

Na etapa de lavagem, ocorreu a adição de 10% de água em relação à massa de óleo a 95°C durante um tempo de contato de 10min, com agitação de 500rpm e temperatura do óleo mantida a 50°C. Essa etapa foi repetida três vezes. A etapa de desumidificação teve a duração de 20min com uma temperatura de 90 a 95°C e agitação de 500rpm. A etapa de clarificação foi realizada à temperatura de 70°C, agitação de 40 rpm, com adição de 5% de adsorvente (mistura de terra ativada e carvão ativado na relação de 9:1), sendo o tempo de contato de 20min. A filtração foi realizada em funil de Buchner com uma pré-capa de terra diatomácea. Todas as etapas do processo de refino foram realizadas com pressão manométrica de vácuo de aproximadamente 600mmHg⁸.

A etapa de winterização foi realizada em três estágios. No primeiro estágio de nucleação, o processo ocorreu em estufa incubadora de 30°C até 5°C, com taxa de resfriamento de 0,62°C/min. e agitação vigorosa. O segundo e terceiro estágios, de cristalização, foram realizados em banho termostatizado com mistura de água e álcool, sem agitação, de 5°C até -4°C com taxa de resfriamento de 2,7°C/h e de -4°C a -5°C com taxa de resfriamento de 0,25°C/h. A cristalização deve ser conduzida sob resfriamento lento para fornecer cristais grandes e de formas polimórficas estáveis. Cristais pequenos, formados a partir de resfriamento rápido, com diâmetros entre 50-100 µm podem não ser facilmente filtrados. A separação das frações oleína e estearina foi realizada por centrifugação¹⁴.

A operação de desodorização foi realizada com temperatura de 220°C, pressão manométrica de vácuo de 750mmHg com 5% de vapor em relação à massa de óleo, durante 60 minutos.

Metodologia analítica

Para a caracterização dos óleos brutos e dos óleos refinados provenientes dos processos de ensilagem e termomecânico foram determinados os seguintes parâmetros: Ácidos Graxos Livres (AGL), Índice de Peróxidos (IP), Índice de Iodo (II), Índice de Saponificação (IS), empregando as metodologias da American Oil Chemists Society, AOCS^{15,16}. Além destes parâmetros, foi determinada a cor dos óleos brutos e refinados, segundo o método Lovibond⁷, fixando-se a cor amarelo em 30 unidades, e variando-se a cor vermelho.

Para a identificação e quantificação dos ácidos graxos, realizou-se a análise cromatográfica dos óleos refinados dos processamentos termomecânico e da ensilagem. Essa análise foi realizada em cromatógrafo gasoso capilar modelo CGC AGILEN 6850 séries GC SYSTEM equipado com coluna capilar DB - 23 AGILENT (50% cyanopropyl) methylpolysiloxane. A coluna apresentava 60m de comprimento e 0,25mm de diâmetro interno com um filme de 0,25µm de espessura. O gás de

arraste foi hélio com fluxo de 1,00mL/min e velocidade linear de 24cm/seg. A temperatura inicial da coluna foi de 110°C, permanecendo nesta temperatura por 5 minutos. A seguir foram realizadas duas programações de temperatura: aumento a 5°C/min até 215°C e 215°C durante 24 minutos, totalizando 50 minutos. A quantidade de amostra injetada foi de 1,0µL; razão split: 1:50. Os ácidos graxos foram identificados pela comparação direta dos tempos de retenção com padrões Mostarda e Votag, e quantificados por normalização de áreas. O preparo das amostras, para injeção no equipamento, na forma de ésteres metílicos, seguiu a metodologia Ce-1-62 da AOCS¹⁶, o método empregado detecta de C6:0 a C22:6.

Metodologia Estatística

Os valores dos índices de caracterização para os óleos estudados, bem como o percentual dos ácidos graxos EPA+DHA e o percentual do somatório dos ácidos graxos saturados nos óleos refinados, obtidos pelos dois processos, foram comparados usando o teste de Tukey HSD de diferenças de médias¹⁷, considerando um nível de 0,05 de significância, com auxílio do programa Statistica 6.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização dos óleos refinados de pescado

A Tabela 1 apresenta a caracterização dos óleos brutos e refinados provenientes dos processos termomecânico e de ensilagem ácida de pescado.

Observando-se a Tabela 1 verifica-se que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) nos valores de ácidos graxos livres, índice de peróxidos, índice de iodo, índice de saponificação e cor Lovibond entre os óleos analisados, comprovado por Teste de Tukey HSD de diferenças de médias¹⁷.

Os índices de peróxidos para os óleos refinados apresentados na Tabela 1, ficaram abaixo do citado por Ganga et al.¹⁸, que obtiveram para um óleo refinado de sardinha índice de peróxidos de $4,02 \pm 0,5 \text{ meqO}_2/\text{kg}$. O valor do índice de peróxidos indica a oxidação dos lipídios, sendo este muito importante por definir seu estado de deterioração, principalmente pela presença de compostos de baixo peso molecular provenientes de sua degradação.

Na Tabela 1, os valores dos índices de iodo (II) e os índices de saponificação (IS) para os óleos provenientes do processo termomecânico e ensilagem ficaram na faixa citada por Bernardini¹⁰, de 120 a 190cg I₂/g e de 160 a 190mg KOH/g respectivamente, para diferentes espécies de pescado. Estes índices estão associados, respectivamente, ao grau de insaturação do óleo e ao peso médio dos ácidos graxos esterificados ao glicerol.

Em relação aos valores da Cor Lovibond (Tabela 1), verifica-se que estes foram inferiores aos relatados por Moraes et al.⁸ para um óleo de pescado clarificado, cujos valores encontrados foram 1,2 Vermelho e 30 Amarelo.

Tabela 1. Caracterização dos óleos refinados provenientes dos processos termomecânico e ensilagem ácida de pescado.

Etapa/Índices	Óleos refinados	
	Óleo termomecânico	Óleo silagem
AGL(% ác. oléico)	0,25 ± 0,03 ^a	0,18 ± 0,01 ^a
IP (meq O ₂ /kg)	1,7 ± 0,4 ^a	1,8 ± 0,5 ^a
II (centigramas I ₂ /g)	135 ± 1 ^a	134 ± 2 ^a
IS (mg KOH/g)	186 ± 1 ^a	186 ± 13 ^a
Cor – Amarelo 30	0,2 Vermelho ^a	0,1 Vermelho ^a

^aletras iguais não apresentam diferença significativa a 95% (Teste de Tukey HSD).

AGL: ácidos graxos livres, IP: índice de peróxido, II: índice de iodo, IS: índice de saponificação, Cor: Lovibond.

Com o objetivo de comparar os óleos obtidos pelos dois processos, determinou-se a composição de ácidos graxos dos óleos brutos e refinados. As composições de ácidos graxos dos óleos estão apresentadas nas Tabelas 2 e 3.

Tabela 2. Composições em ácidos graxos dos óleos bruto e refinado de corvina provenientes do processo termomecânico.

Acido Graxo	Óleo Bruto Termomecânico (%)	Óleo Refinado Termomecânico (%)
C 14:0	3,7 ± 0,2	3,4 ± 0,3
C 15:0	0,8 ± 0,1	0,7 ± 0,1
C 16:0	23,3 ± 0,1	20,5 ± 0,2
C 16:1	12,6 ± 0,1	13,4 ± 0,2
C 17:0	1,5 ± 0,1	1,7 ± 0,1
C 18:0	6,6 ± 0,1	5,7 ± 0,1
C 18:1 ω-9	20,9 ± 0,3	20,9 ± 0,1
C 18:2 ω-6	3,8 ± 0,1	4,2 ± 0,2
C 18:3 ω-3	1,1 ± 0,1	1,9 ± 0,1
C 20:0	0,6 ± 0,1	0,8 ± 0,1
C 20:1	2,4 ± 0,1	2,7 ± 0,2
C 20:4	1,8 ± 0,1	1,8 ± 0,3
C 20:5 EPA ω-3	5,2 ± 0,1	5,6 ± 0,2
C 22:0	0,3 ± 0,2	0,2 ± 0,1
C 22:1	1,2 ± 0,1	1,3 ± 0,1
C 22:5 ω-3	3,0 ± 0,3	3,3 ± 0,2
C 22:6 DHA ω-3	5,5 ± 0,1	6,0 ± 0,2
Σ n.i.*	5,7 ± 0,2	5,9 ± 0,3
Σ s	36,8 ± 0,9	33,1 ± 0,9
Σ ins	57,5 ± 1,4	61,1 ± 1,8

Σ n.i.* - não identificados

Σ s- somatório de ácidos graxos saturados

Σ ins – somatório de ácidos graxos insaturados

Tabela 3. Composições em ácidos graxos dos óleos bruto e refinado de corvina provenientes do processo de ensilagem.

Acido Graxo	Óleo Bruto Ensilagem (%)	Óleo Refinado Ensilagem (%)
C 14:0	3,8 ± 0,1	3,7 ± 0,1
C 15:0	0,8 ± 0,1	0,7 ± 0,2
C 16:0	23,2 ± 0,2	20,0 ± 0,3
C 16:1	13,8 ± 0,2	14,2 ± 0,1
C 17:0	1,8 ± 0,1	1,7 ± 0,1
C 18:0	6,5 ± 0,2	5,3 ± 0,2
C 18:1 ω-9	19,8 ± 0,1	19,9 ± 0,1
C 18:2 ω-6	3,5 ± 0,2	3,6 ± 0,3
C 18:3 ω-3	1,7 ± 0,2	1,9 ± 0,1
C 20:0	0,7 ± 0,1	0,7 ± 0,1
C 20:1	3,0 ± 0,1	3,5 ± 0,2
C 20:4	1,7 ± 0,3	2,0 ± 0,1
C 20:5 EPA ω-3	5,2 ± 0,2	5,8 ± 0,1
C 22:0	0,2 ± 0,1	0,3 ± 0,1
C 22:1	1,2 ± 0,3	1,8 ± 0,2
C 22:5 ω-3	3,5 ± 0,1	3,7 ± 0,3
C 22:6 DHA ω-3	5,3 ± 0,3	5,6 ± 0,2
Σ n.i.*	4,9 ± 0,3	5,6 ± 0,1
Σ s	37,0 ± 0,9	32,4 ± 1,1
Σ ins	58,7 ± 2,0	62,0 ± 1,7

Σ n.i.*- somatório de não identificados

Σ s- somatório de ácidos graxos saturados

Σ ins – somatório de ácidos graxos insaturados

Os óleos brutos e refinados de pescado obtidos nos processos termomecânico e ensilagem apresentam como componentes majoritários, os ácidos palmítico (C 16:0), palmitoléico (C 16:1) e oléico (C 18:1), conforme apresentado nas Tabelas 2 e 3, constituindo aproximadamente 56,8% dos ácidos graxos totais do óleo obtido pelo processo termomecânico e 54,5% dos ácidos graxos totais do óleo obtido da ensilagem.

Nas Tabelas 2 e 3 constata-se que o óleo refinado de pescado obtido via processo termomecânico apresentou percentual de EPA+DHA de 11,6%. O óleo da ensilagem apresentou percentual de EPA+DHA de 11,4%. Estes dois óleos apresentaram valores abaixo do citado por Cozzolino et al.², aproximadamente 20% dos ácidos graxos totais. Porém, Duarte¹⁹ cita para um óleo obtido de resíduos de corvina, valores de 1,3% de EPA e 6,2% de DHA, totalizando 7,5%. Assim, os valores encontrados para os óleos de resíduos de corvina nos processos termomecânicos e de ensilagem, no presente trabalho, estão acima dos citados por esse autor.

Os somatórios dos teores dos ácidos graxos saturados apresentados nas Tabelas 2 e 3 foram, respectivamente, 33,1% e 32,4% para os óleos refinados dos processos termomecânico e de ensilagem. Valores superiores a estes foram citados por Duarte¹⁹, para óleo de corvina apresentando 36,9% dos ácidos graxos saturados.

Em relação ao percentual de ácidos graxos insaturados (Tabelas 2 e 3), os óleos refinados de ambos processos apresentaram valores de ácido oléico e de ácido linoléico superiores aos citados por Duarte¹⁹, que obteve para o óleo de resíduos de corvina percentuais destes ácidos de 17,8% e 3,5%, respectivamente. Em relação ao ácido linolênico (C 18:3), os óleos refinados apresentaram valores semelhantes ao citado pelo autor.

Nas Tabelas 2 e 3 constata-se que os ácidos graxos insaturados presentes nos óleos refinados termomecânico e da ensilagem perfizeram 61,1% e 62% do total dos ácidos graxos respectivamente, o que torna-os favoráveis como fonte de ácidos graxos insaturados.

Tabela 4. Percentuais de EPA + DHA e dos ácidos graxos saturados nos óleos refinados.

Ácido Graxo	Óleo Refinado Termomecânico	Óleo Refinado Ensilagem
% (EPA+DHA)	11,6 ± 0,2 ^a	11,4 ± 0,2 ^a
% ácidos graxos saturados	33,1 ± 0,9 ^a	32,4 ± 1,1 ^a

*letras iguais não apresentam diferença significativa a 95% (Teste de Tukey HSD).

A Tabela 4 apresenta os valores do percentual de ácidos graxos do grupo w-3 e do percentual dos ácidos graxos saturados nos óleos refinados. O aumento de 8,5% no valor do somatório de EPA+DHA em relação ao valor do óleo bruto, ocorreu durante o processo de refino devido a etapa de winterização que favorece o aumento destes ácidos graxos.

Os valores encontrados na Tabela 4 para o percentual do somatório de EPA+DHA e do percentual de ácidos graxos saturados dos óleos refinados obtidos pelos dois processos, resultaram numa variação média de 8,5% e 12,5%, respectivamente, em relação aos valores do óleo bruto (Tabelas 2 e 3). Estas variações foram maiores do que as citadas por Cunha et al.¹¹, que obtiveram para óleo de pescado um ganho de EPA+DHA de 5,2% e uma redução de saturados de 9,5%.

Os teores de EPA+DHA nos dois métodos de obtenção do óleo (Tabela 4) não apresentaram diferenças de médias, através do Teste de Tukey, a um nível de 95% ($p < 0,05$). Também observa-se nesta tabela, que esses métodos não apresentaram diferenças de médias em relação ao percentual de saturados, constatando-se que os valores deste percentual ficaram dentro da faixa do desvio-padrão.

CONCLUSÕES

O óleo de pescado refinado de corvina obtido pelo processo da ensilagem apresentou características semelhantes ao óleo refinado obtido via processo termomecânico, em relação ao percentual de ácidos graxos livres, ao índice de iodo, ao índice de saponificação e à Cor Lovibond, não apresentando diferença significativa ao nível de 95% pelo teste de Tukey.

Os ácidos graxos insaturados presentes nos óleos refinados termomecânico e da ensilagem ficaram na faixa de 62% do total de ácidos graxos, o que os tornam favoráveis como uma importante fonte de ácidos graxos insaturados. A etapa de winterização, em ambos os processos, resultou num ganho médio de EPA+DHA em torno de 8,5% e uma redução média de saturados na faixa de 12,5%.

REFERÊNCIAS

1. Navarro-García G, Pachego-Aguillar R, Alvarado-Bringas L, García-Ortega J. Characterization of the lipid composition and natural antioxidants in the liver oil of *Dasyatis brevis* and *Gymnura marmorata* rays. *Food Chem* 2004; 87: 89-96.
2. Cozzolino D, Murray I, Chree A, Scaife Jr. Multivariate determination of free fatty acids and moisture in fish oils by partial least-square regression and near-infrared spectroscopy. *Food Sc Technol* 2005; 38 (8): 821-58.
3. Hartmann L, Esteves W. Tecnologia de Óleos e Gorduras. São Paulo, Secretária da Indústria, Comércio, Ciência e Tecnologia (Série Tecnologia Agroindustrial, 13); 1981.
4. Dapkevicius MLNE, Nout R, Rombouts FM, Houben JH, Wymenga W. Lipid and protein changes during the ensilage of blue whiting (*Micromesistius poutassou* Risso) by acid and biological methods. *Food Chem* 1998; 63 (1): 97-102.
5. Goddard JS, Perret JSM. Co-drying fish silage for use in aquafeeds. *Anim Feed Sci Technol*, 2005; 118 (3-4): 337-42.
6. Seibel NF, Souza SAAL. Produção de silagem química com resíduos de pescado marinho. *Braz J Food Technol* 2003; 6 (2): 333-7.
7. Windsor M, Barlow S. Introducción a los Subproductos de Pesquería. Zaragoza: Ed. Acirbia; 1984.
8. Morais MM, Pinto LAA, Ortiz SCA, Crexi VT, Silva RL, Silva JD. Estudo do processo de refino do óleo de pescado. *Rev Inst Adolfo Lutz* 2001; 60(1):23-33.
9. Salas A, Chavez J, Cueto M, Ayala ME. Estabilización de aceite de pescado destinado a la alimentación humana. *Bol Inv Tec Pes Peru* 2003; 5:73-80.
10. BERNardini, E. Tecnologia de aceites y grasas. Madrid: Ed. Alhambra S.A.; 1986.
11. Cunha DC, Souza-Soares LA, Pinto LAA. Estudo do fracionamento físico do óleo de pescado via "winterização". *Braz J Food Technol* 2002; 97(5): 183-8.

12. Azbar N, Yonar T. Comparative evaluation of laboratory and full-scale treatment alternatives for the vegetable oil refining industry wastewater (VORW). *Process Biochem* 2004; 39: 869-75.
13. Benites A I. Farinha de silagem de resíduos de pescado: elaboração, complementação com farelo de arroz e avaliação biológica em diferentes espécies. [Dissertação de mestrado]. Rio Grande, RS: Fundação Universidade Federal do Rio Grande; 2003.
14. Simões IS, Gioelli LA. Crystal morphology of binary and ternary mixtures of hydrogenated fats and soybeans oil. *Braz Arch Biol Technol* 2000; 43(2): 241-8.
15. American Oil Chemists Society. Official and Tentative Methods of American Oil Chemist's Society, 3rded., 1980.
16. American Oil Chemists Society. Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemist's Society. 5 ed. Washington: AOCS; 2002.
17. Box GEP, Hunter WG, Hunter JS. *Statistics for Experiments: An Introduction to Design, Data Analysis and Model Building*. 1sted. New York: Ed. John Wiley & Sons; 1978.
18. Ganga A, Nieto S, Sanhuez J, Romo C, Speisky H, Valenzuela A. Concentration and stabilization of n-3 polyunsaturated fatty acids sardine oil. *J Am Oil Chem Soc* 1998; 75 (6): 733-6.
19. Duarte G R M. Estudo da composição de ácidos graxos e colesterol em óleos de peixes do rio Araguaia. [Dissertação de mestrado]. Goiânia, Goiás: Universidade de Goiás, 2001. 120p.

Occurrence of aflatoxins M₁ and M₂ in goat milk marketed commercialized in the region of Ribeirão Preto-SP, Brazil

Ocorrência de aflatoxinas M₁ e M₂ em leite de cabra comercializado na região de Ribeirão Preto-SP, Brasil

RIALA6/1104

Maria Helena IHA*, Lucile Tiemi ABE, Marina Miyuki OKADA, Rosa Maria Duarte FÁVARO

* Endereço do autor responsável: Instituto Adolfo Lutz – Laboratório I de Ribeirão Preto. Rua Minas, 877 – Campos Elíseos 14085-410 – Ribeirão Preto-SP. e-mail: mhiha@ial.sp.gov.br
Recebido: 15/03/2007 – Aceito para publicação: 30/04/2007

ABSTRACT

The aim of the present study was to determine the occurrence of aflatoxins M₁ and M₂ in commercially available goat milk samples collected from supermarkets located in Ribeirão Preto region, SP, Brazil. A total of 39 goat milk samples manufactured in three Brazilian states, consisting of 15 Ultrahigh-temperature milk samples and 24 frozen pasteurized milk samples were analyzed following AOAC, 2000 protocol. None of the analyzed milk samples was contaminated with aflatoxin M₂, and aflatoxin M₁ was detected in 7 (18%) samples in a range of from 20 to 98ng/L. According to these findings both the occurrence and the level of aflatoxins M₁ are low, and the goat milk samples manufactured in three Brazilian states is devoid of aflatoxin M₂. Although, further surveillance studies on the occurrence of these toxins in goat milk are required, because these data are limited. On the other hand, the Brazilian climatic conditions may promote the occurrence of aflatoxin B₁ and B₂ in feeds, which can be metabolized into aflatoxin M₁ and M₂.

Key words. aflatoxin M₁, aflatoxin M₂, goat milk, mycotoxins.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi de determinar a ocorrência e o nível de aflatoxinas M₁ e M₂ em amostras de leite de cabra coletadas em supermercados localizados na região de Ribeirão Preto, SP, Brasil. Foram analisadas 15 amostras de leite Ultra Alta Temperatura e 24 amostras pasteurizadas congeladas. As amostras foram analisadas de acordo com a AOAC, 2000. Nenhuma das amostras analisadas apresentou contaminação com aflatoxina M₂. Foi detectada M₁ em 7 (18%) amostras na faixa de 20 a 98ng/L. O resultado deste estudo mostra que a ocorrência e o nível de aflatoxinas M₁ são baixas e ausência de aflatoxina M₂ em amostras de leite de cabra produzidas por três estados do Brasil. Em função de escassas informações sobre esse tema, torna-se imprescindível o estudo dessas aflatoxinas em leite de cabra em outras regiões do Brasil, pois as condições climáticas do país favorecem a ocorrência da aflatoxinas B₁ e B₂ na ração dos animais, que conseqüentemente são metabolizadas em M₁ e M₂.

Palavra-chave. aflatoxina M₁, aflatoxina M₂, leite de cabra, micotoxinas.

INTRODUCTION

Aflatoxins are toxic metabolites produced by fungi, and are potent liver toxins and most animal species exposed to these mycotoxins show signs of liver disease ranging from acute to chronic. Mammals animals, like cow, goat, sheep and so on, fed rations containing aflatoxin B₁ and aflatoxin B₂ excrete in their milk metabolites, aflatoxin M₁ and aflatoxin M₂, respectively¹.

Milk and milk products are a good source of many nutrients such as proteins and calcium. Usually, the cow milk is the most consumed, however there are a significant percentage of the population that has cow milk allergies and gastro-intestinal disorders². Goat milk could substitute cow milk because, study of comparison of goat milk infant formula versus cow milk infant formula shows that these two formula were similar in terms of protein quality³ and growth of infants fed with these two formulas⁴. Besides these, researches demonstrated some beneficial effect of goat milk, comparing to cow milk: on the metabolism of iron and copper in control rats, especially those with malabsorption syndrome⁵ and on the nutritive utilization of protein and on magnesium bioavailability, especially in animals with resection of the distal small intestine⁶.

Fisberg et al.⁷ studied the acceptability of goat milk in preschool children of municipal nurseries in São Paulo City and concluded that it represents an excellent alternative to substitute cow milk, after the first year of life, and there was no case of intolerance or allergy during the study.

Competent national authorities establish the tolerance limits for aflatoxins in milk, consequently, there are differences in tolerance levels among countries and many countries have no legal limit for aflatoxins in milk and dairy products. The *Codex alimentarius*⁸ recommend and the MERCOSUR (Brazil, Argentina, Paraguay and Uruguay) has established a limit of 500ng/L of aflatoxins for milk⁹.

There are several studies of incidence of aflatoxins in cow milk, but there are only few surveys focusing on goat milk. In Brazil, we have not been found literature on the incidence of these toxins in goat milk.

It is important to investigate the occurrence of aflatoxins M₁ and M₂ in this product, for the reason that, in Brazil, the goat milk consumption is increasing, mainly, by the children with cow milk allergies.

MATERIAL AND METHODS

Materials and reagents

(a) Aflatoxin M₁ standard, 2,3,6a,9a-tetrahydro-9a-hydroxy-4-methoxycyclopenta[c]furo[3',2',:4,5]furo[2,3-h][1]benzopyran-1,11-dione – (Sigma Chemical Company, USA).

(b) Aflatoxin M₂ standard, 2,3,6a,8,9,9a-hexahydro-9a-hydroxy-4-methoxycyclopenta[c]furo[3',2',:4,5]furo[2,3-h][1]benzopyran-1,11-dione – (Sigma Chemical Company, USA).

(c) Stock solution of M₁ was prepared in acetonitrile at

concentration of 565 ng/mL, and concentrations determined according to Association of Official Analytical Chemists (AOAC), method 986.16, 971.22 and 970.44¹⁰. Working solutions were prepared by appropriate dilution in acetonitrile:benzene.

(d) Stock solution of M₂ was prepared in acetonitrile at concentration of 898 ng/mL, and concentrations determined according Association of Official Analytical Chemists, method 986.16, 971.22 and 970.44¹⁰. Working solutions were prepared by appropriate dilution in acetonitrile:benzene.

(e) Solvents – Isopropyl alcohol and acetonitrile (EM Science, USA) were LC grade;

(f) Water – distilled, deionized water was purified in a milli-Q purification system (Millipore, USA).

(g) Columns for solid phase extraction, RP-18 (500 mg), were obtained from Merck (Germany).

(h) Mobile phase consisted of water:isopropyl alcohol:acetonitrile (80:12:8).

(i) trifluoroacetic acid (TFA), analytical reagent grade.

(j) LC column – Shim-pack CLC-ODS (M), 4.6x250 mm, 5µm (Shimadzu, Japan).

(k) Guard column – Shim pack CLC G-ODS, 4x4mm, 5µm (Shimadzu, Japan).

(l) All other chemicals were analytical reagent grade.

Apparatus

(a) Liquid chromatograph – pump (model LC-10ADVP), RF-10AXL fluorescence detector (excitation and emission wavelengths were 365 nm and 400 nm, respectively), column oven (CTO-10AVP), system controller (SCL-10AVP), degasser (DGU-14A), software (CLASS VP version 6.12) all from Shimadzu Instruments (Japan), and Rheodyne LP injector with a 20µL loop from Rheodyne (USA).

(b) Spectrophotometer – Hach (USA).

(c) Vortex mixer – Fanem (Brazil).

Samples

Twenty-four samples of commercial pasteurized frozen goat milk and 15 Ultra High Temperature (UHT) goat milk were collected from market in the region of Ribeirão Preto, SP, Brazil. These samples milk were produced in different Brazilian States: 5 from Rio Grande do Sul, 10 from Rio de Janeiro, and 24 from São Paulo.

Procedures

The method used to analyse aflatoxins M₁ and M₂ in goat milk samples was AOAC¹⁰ Official Method 986.16 Aflatoxins M₁ and M₂ in fluid milk and liquid chromatographic method, in duplicate. The extraction through cartridges, C₁₈ Sep-Pak, was time consuming, lengthening the sample preparation. The problem was solved by increasing the quantity of hot water added to thin the milk from 20 to 40mL. This way, the sample preparation became faster. Aflatoxins M₁ and M₂ were extracted from warm, diluted milk on a C₁₈ Sep-Pak cartridge, eluted with ether through a silica column, eluted with dichloromethane: alcohol, and derivatized with

TFA. Liquid chromatography peaks were detected fluorometrically and compared with the standard-TFA derivative. The chromatography analyses were carried out in an oven controlled temperature (30°C), the flow-rate was 0.5 mL/min.

All samples analyzed were within their expiry date. The pasteurized frozen milk samples were stored at -20°C until analysis.

Linearity, recovery, precision and determination limits

The linearity of the method was carried out in the range of 0.9 – 18 ng/mL (11-225 ng/L in milk) of M₁ and 0.926 – 18.52 (12 – 232 ng/L in milk) of M₂. To determine the efficacy of the analytical method used for the recovery tests, milk samples were spiked with known amount of aflatoxins M₁ and M₂ (concentration of 222 and 109 ng/L, respectively) and submitted to the extraction procedures in 8 replicates. The precision of the method was calculated as the relative standard deviation (RSD). The detection and quantitation limit were determined based on the standard deviation of the response and the slope¹¹.

RESULTS AND DISCUSSION

The results obtained show the chromatograms after derivatization with TFA, (a) of goat milk free from aflatoxins M₁ and M₂, (b) of a sample spiked with aflatoxins M₁ and M₂ and (c) of a naturally contaminated sample (Figure 1). The calibration curves obtained by least-squares linear regression were linear in range of 11 – 225ng/L (M₁) and 12 – 232ng/L (M₂) with correlation coefficients of 0.9997 (M₁) and 0.9992 (M₂). The recoveries were 98.0 and 89.8% for M₁ and M₂, respectively. The precision was adequate with a relative standard deviation of 4.6 (M₁) and 5.0% (M₂). The detection limit was defined as the

minimum level at which the analyte can be reliably detected and was 6 for M₁ and 8ng/L for M₂. The quantification limit was established as the lowest concentration of an analyte, using an appropriate standard or sample, could be determined with an acceptable level of accuracy and precision¹². It was 19 and 23ng/L for M₁ and M₂, respectively.

The results obtained in our laboratory, during the method validation, demonstrated that this method is efficient to analyze aflatoxins M₁ and M₂ in goat milk samples with good precision, accuracy. The limit of detection and quantification are low enough to be used to analyze aflatoxins M₁ and M₂ in small quantities. In addition to that, sample preparation is adequate to obtain an extract without interfering peaks, as we can see in the non-contaminated goat milk chromatogram (Figure 1).

The Table 1 shows the results of the levels of aflatoxins M₁ found in the samples analyzed. In all samples the level of aflatoxin M₁ were below the 500ng/L limit permitted by the MERCOSUR Technical Regulations⁹ and recommended by the *Codex alimentarius*⁸. The results were compared with more regulations strict like the one adopted by the European Union. One (2.6%) sample of pasteurized milk was above the 50ng/L limit for milk¹³. Four samples of pasteurized milk (10.3%) were above 25ng/L limit for infant formulae and follow-on formulae, including infant milk and follow-on milk and dietary foods for special medical purposes intended specifically for infants¹⁴. In spite the fact of that four samples of pasteurized milk contained aflatoxin M₁ above 25ng/L and no UHT sample was contaminated there were no significant differences between their aflatoxin M₁ levels.

Table 1. Occurrence of aflatoxin M₁ in goat milk samples produced from three different states of Brazil and commercialized in the region of Ribeirão Preto, SP, Brazil.

Range of aflatoxin M ₁ concentration (ng/L)	Type of Milk		
	Pasteurized (n= 24) n (%)	UHT (n= 15) n (%)	Total (n= 39) n (%)
Not detected	14 (58.3)	1 (6.7)	15 (38.5)
6 – 20	4 (16.7)	13 (86.7)	17 (43.6)
20 – 50	5 (20,8)	1 (6.7)	6 (15.4)
50 – 500	1 (4.2)	0 (0)	1 (2.6)
> 500	0 (0)	0 (0)	0 (0)

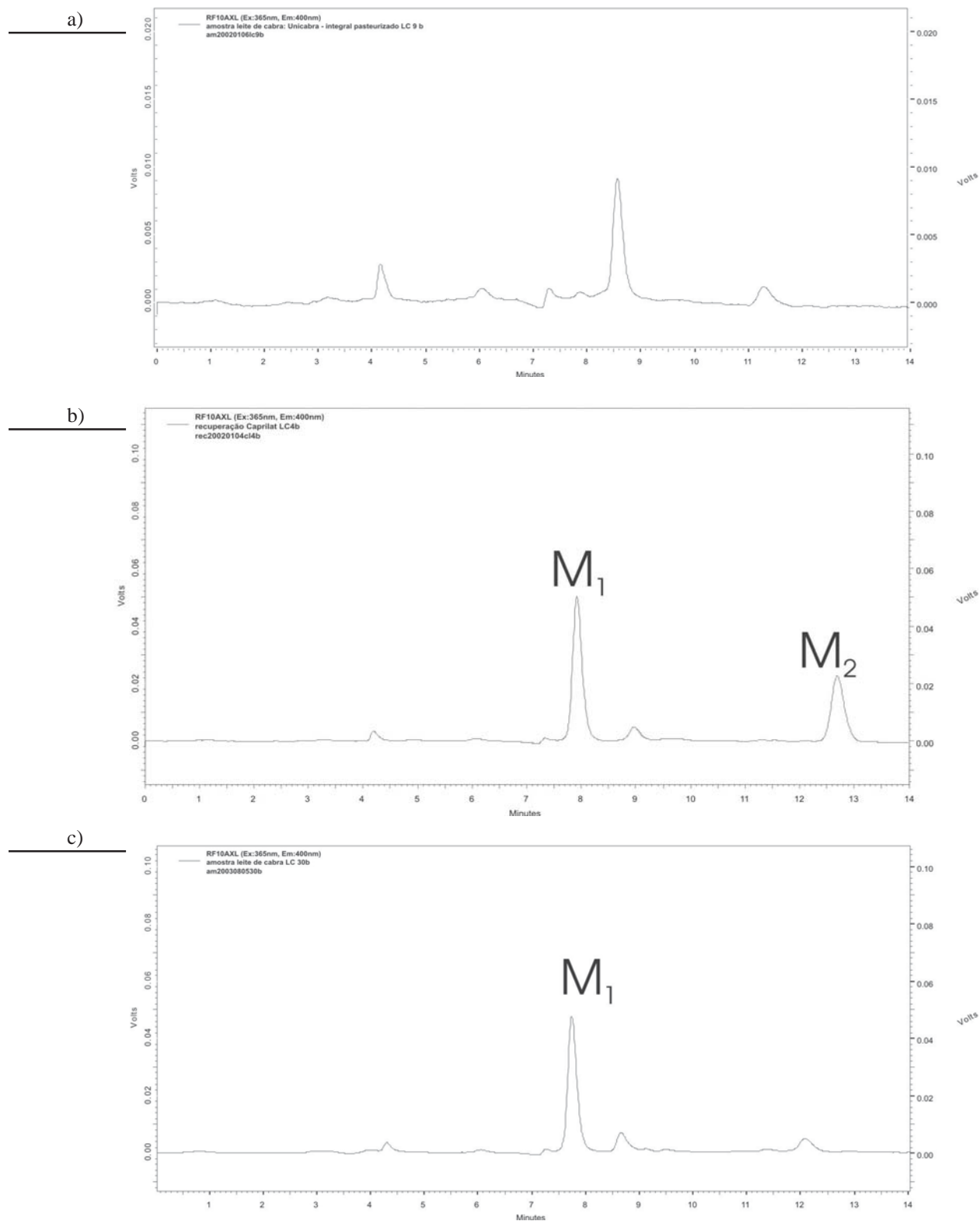


Figure 1. Chromatograms after derivatization with TFA, (a) of a non-contaminated goat milk (scale 5 time larger than b and c), (b) of a sample spiked with aflatoxin M₁ and M₂ and (c) of a naturally contaminated sample. Chromatographic conditions: ODS column; mobile phase, water:isopropyl alcohol:acetonitrile (80:12:8); flow-rate, 0.5mL/min; fluorescence detection, $\lambda_{ex} = 365\text{nm}$, $\lambda_{em} = 400\text{nm}$.

There are several studies on the incidence of aflatoxins in cow milk in different countries like Korea¹⁵, Colombia¹⁶, Argentina¹⁷, Greece¹⁸, Brazil¹⁹⁻²⁵ and so on, but surveys on the occurrence of aflatoxins in goat milk are rare. Roussi et al¹⁸ analyzed samples of goat, sheep and cow milk collected in Greece, compared the level of aflatoxin M₁ in these three types of milk, and observed that the contamination was lower in raw sheep and goat milk than cow milk. The incidence rate was limited to 66.7 and 40%, respectively, and none of the positive samples contained aflatoxin M₁ at levels > 50ng/L. They concluded that this might be due to the fact that during the winter and spring, lactating sheep and goats in Greece are grazing and are feeding consequently feeding less when compared with dairy cattle.

In Brazil, there isn't any published study about incidence of aflatoxin M₁ and M₂ in goat milk, only in cow milk that has been analysed and the results show low incidence and levels, like ours results for goat milk. Souza et al.²² analyzed 110 milk samples and detected low levels of contamination with aflatoxin M₁ in 24.5% of them. Oliveira et al.²⁵ found M₁ in 77.1% (37) of the samples (0.011 – 0.251ng/mL). Garrido et al²⁴ studied the occurrence of aflatoxins M₁ in 139 samples of pasteurized and UHT cow milk commercialized in Ribeirão Preto, SP. They detected the toxin in 29 (20.9%) of the samples in the range of 50 – 240ng/L. Taveira and Midio²³ in São Paulo, SP and Sylos et al.¹⁹ in Campinas, SP, also found low incidence and levels of the toxin in cow milk. Sylos et al.¹⁹ concluded that a possible explanation for this is that cows in the area of Campinas graze all year round, and are rarely exposed to feed.

In this study the levels of aflatoxins in goat milk were found to be low, in spite of the fact that feed are used in same area where the goat milk samples originated, like cities of São Paulo state.

In our study, none of the milk samples analyzed were found to contain aflatoxin M₂ above the detection limit of the method used, 7 ng/L. Corrêa et al.²⁰ and Garrido et al.²⁴ analyzed 144 samples of raw cow milk and 139 samples of pasteurized and UHT milk, in Brazil, and didn't detect M₂ in any sample.

These results show that aflatoxins in goat milk in Brazil isn't a serious public health problem, but, it's necessary to continue the surveillance on the occurrence of these toxins in goat milk samples in order to achieve a more complete picture. Several reasons indicate this course of action: data are limited, the country is large, and its climatic conditions may favour the incidence of aflatoxin B₁ and B₂ in feeds that after being consumed by the goat is metabolized in M₁ and M₂.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo for financial support.

REFERENCES

1. Gilbert J, Pohland AE. Mycotoxins: Risks in plant, animal, and human systems. n. 139. Ames IA: Council for Agricultural Science and Technology; 2003.
2. Haenlein GFW. Goat milk in human nutrition. *Small Rumin Res* 2004; 51:155-63.
3. Rutherford SM, Darragh AJ, Hendriks WH, Prosser CG, Lowry D. True ileal amino acid digestibility of goat and cow milk infant formulas. *J Dairy Sci.* 2006; 89:2408-13.
4. Grant C, Rothertham B, Sharpe S, Scragg R, Thompson J, Andrews J, Wall C, Murphy J, Lowry D. Randomized, double-blind comparison of growth in infants receiving goat milk formula versus cow milk infant formula. *J Paediatr Child Health* 2005; 41:564-8.
5. Barrionuevo M, Alferez MJM, Lopez-Aliaga I, Sampelayo MRS, Campos MS. Beneficial effect of goat milk on nutritive utilization of iron and copper in malabsorption syndrome. *J Dairy Sci* 2002; 85:657-64.
6. Lopez-Aliaga I, Alferez MJM, Barrionuevo M, Nestares T, Sampelayo MRS, Campos MS. Study of nutritive utilization of protein and magnesium in rats with resection of the distal small intestine. Beneficial effect of goat milk. *J Dairy Sci* 2003; 86:2958-66.
7. Fisberg M, Nogueira M, Ferreira AMA, Fisberg RM. Aceitação e tolerância de leite de cabra em pré-escolares. *Pediatria Moderna* 1999; XXXV:526-37.
8. World Health Organization (WHO). Safety evaluation of certain mycotoxins in food. Geneva: WHO Food Additives Series, 47; 2001.
9. Mercosul/GMC. Res. N. 56/94. Technical Regulations about Maximum Limit of Aflatoxins 1994. Available from: <http://www.micotoxinas.com.br>. Accessed 2000 Feb 18.
10. Official Methods of Analysis. 17th Ed., AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, MD, Methods 970.44, 971.22 and 986.16 2000.
11. International Conference on Harmonisation. Technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use: Validation of analytical procedures: methodology. Rockville: ICH 1996. Available from: <http://www.fda.gov/cder/guidance>. Accessed 2000 Dec 30.
12. Garfield FM, Klesta E, Hirsch J. Quality Assurance Principles for Analytical Laboratories. 3rd ed. Gaithersburg (MD): AOAC International; 2000.
13. Commission Regulation (CE) No. 2174/2003. Official Journal European Union 2003 Available from: http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/site/en/oj/2003/l_326/l_32620031213en00120015.pdf. Accessed 2006 Set 18.
14. Commission Regulation (CE) No. 683/2004. Official Journal European Union 2004. Available from: http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/site/en/oj/2004/l_106/l_10620040415en00030005.pdf. Accessed 2006 Set 18.

15. Kim EK, Shon DH, Ryu D, Park JW, Hwang HJ, Kim YB. Occurrence of aflatoxin M1 in Korean dairy products determined by ELISA and HPLC. *Food Addit Contam* 2000; 17(1):59-64.
16. Diaz GJ, Espitia, E. Occurrence of aflatoxin m1 retail milk samples from Bogotá, Colombia. *Food Addit Contam* 2006; 23(8):811-5.
17. López CE, Ramos LL, Ramadán SS, Bulacio LC. Presence of aflatoxin M1 in milk for human consumption in Argentina. *Food Control* 2003; 14:31-4.
18. Roussi V, Govaris A, Varagouli A, Botsoglou NA. Occurrence of aflatoxin M1 in raw and market milk commercialized in Greece. *Food Addit Contam* 2002; 19(9):863-8.
19. Sylos CM, Rodrigues-Amaya DB, Carvalho PRN. Occurrence of aflatoxin M1 in milk and dairy products commercialized in Campinas, Brazil. *Food Addit Contam* 1996; 13(2):169-72.
20. Corrêa B, Galhardo M, Costa EO, Sabino M. Distribution of molds and aflatoxins in dairy cattle feeds and raw milk. *Rev Microbiol* 1997; 28:279-83.
21. Prado G, Oliveira MS, Abrantes FM, Santos LG, Soares CR, Veloso T. Ocorrência de aflatoxina M₁ em leite consumido na cidade de Belo Horizonte – Minas Gerais / Brasil – agosto/98 à abril/99. *Ciênc Tecnol Aliment* 1999; 19(3):420-3.
22. Souza SVC, Vargas EA, Junqueira RG. Eficiência de um kit ELISA na detecção e quantificação de aflatoxina M1 em leite e investigação da ocorrência no Estado de Minas Gerais. *Ciênc Tecnol Aliment* 1999; 19(3), 401-5.
23. Taveira JA, Midio AF. Incidence of aflatoxin M1 in milk marketed in São Paulo, Brazil. *J Food Sci* 2001; 13(4):443-7.
24. Garrido NS, Iha MH, Ortolani MRS, Fávaro RMD. Occurrence of aflatoxins M1 and M2 in milk commercialized in Ribeirão Preto-SP, Brazil. *Food Addit Contam* 2003; 20(1):70-3.
25. Oliveira CA, Rosmaninho J, Rosim R. Aflatoxin M1 and cyclopiazonic acid in fluid milk traded in São Paulo, Brazil. *Food Addit Contam* 2006; 23(2): 196-201.

Frequência de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* em mulheres, atendidas nas unidades da rede de saúde pública da região metropolitana de São Paulo (2001-2005)

Frequency of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in women attended at public health center network of São Paulo metropolitan region (2001-2005)

RIALA6/1105

Massami KAWARABAYASHI, Débora Picanço AURELIANO, Maria Lúcia RAYMUNDO, Rosângela Aparecida GARCIA, Thaís Alves da COSTA-SILVA, Katia Gomes CASTELLÃO, Helena Hilomi TANIGUCHI, José Eduardo TOLEZANO, Roberto Mitsuyoshi HIRAMOTO*

*Endereço para correspondência: Seção de Parasitoses Sistêmicas, Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr. Arnaldo 355, 8º Andar, CEP 01246-000 São Paulo/SP. Fone: (0xx11) 3068-2891. Fax: 3085-3505. E-mail: rmhiramoto@ial.sp.gov.br.
Recebido: 16/03/2007 – Aceito para publicação: 10/05/2007

RESUMO

Toxoplasma gondii é um parasita intracelular obrigatório que pode infectar o homem e animais homeotérmicos. Nos indivíduos imunocompetentes a infecção é geralmente assintomática, os principais grupos atingidos gravemente pela doença são os indivíduos imunodeprimidos e as gestantes que adquirem a infecção durante a gestação. Neste trabalho foram analisadas 1485 amostras de soros de mulheres atendidas na rede pública de saúde da grande São Paulo, durante o período de janeiro de 2001 a julho de 2005. A detecção de anticorpos IgG anti-*T. gondii* foi realizada por meio de ensaio imunoenzimático (ELISA) e a técnica Imunofluorescência Indireta (IFAT) foi utilizada para detecção de anticorpos IgM e IgG anti- *T. gondii*. Das amostras analisadas 57,10% apresentaram anticorpos IgG anti-*T. gondii*, e 1,95% possuíam anticorpos específicos da classe IgM. Os inquéritos epidemiológicos realizados no Brasil demonstraram que a soroprevalência de anticorpos IgG anti-*T. gondii* varia de 40 a 80%, o que corroboram com os dados obtidos no presente estudo. Existe a necessidade de estudos que identifiquem as taxas de prevalência nas várias regiões brasileiras, com o intuito de implantar trabalhos de informação e conscientização da população para diminuição do risco de infecção congênita por *T. gondii*.

Palavras-chave. *Toxoplasma gondii*, toxoplasmose, sorologia, IgG, IgM.

ABSTRACT

Toxoplasma gondii is an obligatory intracellular parasite that can infect man and homoeothermic animals. In immunocompetent individuals the infection is generally asymptomatic, the foremost groups seriously affected by the infection are the immunocompromised and the pregnant women who acquire the infection during pregnancy. In this survey were analyzed 1485 serum samples from women attended at public health network of São Paulo metropolitan region during the period of January 2001 to July 2005. The detection of IgG antibody anti-*T. gondii* was realized by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), both IgG and IgM antibodies were detected by immunofluorescent antibody technique (IFAT). Among the samples analyzed 57.10% presented IgG antibody anti-*T. gondii* and IgM antibody was detected in 1.95% individuals. Previous epidemiologic studies performed in Brazil demonstrated an IgG anti-*T. gondii* antibody seroprevalence varying from 40% to 80%, which corroborate with the date of the present investigation. There is the necessity of the studies to estimate the *T. gondii* infection prevalence rate in several Brazilian regions, in order to establish a developing health education strategies, and information programs for population to decreased congenital infection risk.

Key words. *Toxoplasma gondii*, toxoplasmosis, serology, IgG, IgM.

INTRODUÇÃO

Toxoplasma gondii é um protozoário parasita intracelular obrigatório, pertencente ao filo Apicomplexa, classe Sporozoa, subclasse Coccidia e ordem Eucoccidia¹ que pode infectar o homem e uma ampla variedade de animais domésticos e selvagens². Os felinos são os hospedeiros definitivos do *T. gondii*, é no intestino desses animais que ocorre a reprodução sexuada e a liberação de oocistos nas fezes que ao serem ingeridos junto com água ou alimentos por mamíferos e aves, liberam os esporozoítos no intestino. Estes após invasão celular transformam-se em taquizoítos que disseminarão no organismo e formarão os bradizoítos e conseqüentemente cistos teciduais que poderão permanecer nos seus hospedeiros por longos períodos^{3,4}. Os felinos e outros animais poderão se infectar pela ingestão de carne contaminada, fechando o ciclo. O parasita, apesar de infectar com frequência o homem, causa geralmente doença benigna, sendo a toxoplasmose ocular um dos agravos em indivíduos imunocompetentes⁵. Pacientes imunodeprimidos, como portadores do vírus HIV e transplantados podem sofrer doença severa levando inclusive ao óbito^{6,7}. Outro grupo que pode ser atingido gravemente pela doença são os fetos de mães que nunca tiveram contato com o parasita, quando isto ocorre pode levar ao aborto ou causar lesões irreversíveis no feto, conhecidas como tríade de Sabin^{8,9}. Na região metropolitana de São Paulo, Brasil, estima-se que devam nascer cerca de 230 a 300 crianças infectadas por ano¹⁰, mas a prevalência de anticorpos anti-*T. gondii* no Brasil é variável e depende da região, hábitos e fatores sócio-econômicos. O presente trabalho tem como objetivo relatar a situação do perfil da toxoplasmose, através das técnicas de Imunofluorescência (IFAT) e Ensaio imunoenzimático (ELISA), das pacientes atendidas na rede pública de saúde do estado de São Paulo.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostra de sangue

Foram analisadas 1485 amostras de soros de mulheres atendidas na rede pública de saúde da grande São Paulo, durante o período de janeiro de 2001 a julho de 2005.

T. gondii

Os parasitas utilizados foram taquizoítos da cepa RH, que são mantidos rotineiramente na Seção de Parasitoses Sistêmicas do Instituto Adolfo Lutz, por meio de passagens sucessivas em camundongos Swiss (não isogênicos) com o peso variando entre 20 e 22 gramas, por meio de lavagem do peritônio com solução salina ou salina tamponada com fosfato - NaCl 0,15M/tampão fosfato de sódio 0,01M pH 7,2 (PBS) e subsequente inóculo intraperitoneal (i.p.) em novos animais ou sendo mantido em estabilato de nitrogênio líquido.

Imunofluorescência indireta (IFAT)¹¹

Os parasitas coletados do peritônio dos camundongos foram centrifugados a 800g durante 10 minutos, o sobrenadante desprezado e o precipitado suspenso em formol 2% tamponado com fosfato de sódio 0,02M pH 7,2, permanecendo em estufa a 37°C por 30 minutos. A seguir, o material foi novamente centrifugado a 800g, o sobrenadante desprezado e o precipitado suspenso em PBS. Em lâminas limpas, era adicionado 20µl (1.10⁴ parasitas) do preparado em cada orifício da lâmina de imunofluorescência. Após secagem cuidadosa, as lâminas foram mantidas a -20°C até o momento do uso.

Para cada amostra de soro foram preparadas cinco diluições para IgG (1/16, 1/256, 1/1024, 1/2048 e 1/4096) e duas para IgM (1/4 e 1/32) a título de triagem. Nas amostras positivas para IgM foi aplicado em cada amostra o reagente para remover o fator reumatóide (Chemicon®), realizando dez diluições (1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320, 1/640, 1/1280, 1/2560 e 1/5120). A diluição do soro foi depositada em cada orifício da lâmina de fluorescência em PBS, contendo taquizoítos formolizados e aderidos; seguiu-se incubação em câmara úmida por 30min a 37°C. Após a primeira incubação, as lâminas foram lavadas duas vezes em PBS por 10min. Em seguida, cada orifício foi recoberto com soro anti-IgG ou anti-IgM humano, produzido em cabra e conjugado ao Isotiocianato de Fluoresceína-FITC (Biolab-Merieux), diluído em solução de Azul de Evans 0,01% em PBS, com incubação a 37°C, ao abrigo da luz, por 30min. As mesmas foram novamente lavadas duas vezes em PBS por 10min, para remoção do excesso de conjugado, secas e montadas com preservativo (Glicerol-PBS 9:1) sob lamínula para observação. A observação foi realizada em microscópio de epifluorescência com lâmpada de mercúrio de 100V (Nikon Eclipse E400), com sistema de filtros para fluoresceína, sendo considerada positiva a diluição em que os taquizoítos apresentassem uma clara fluorescência verde na membrana celular, contra o fundo vermelho das formas coradas pelo Azul de Evans. O título foi considerado a maior diluição de soro com reação positiva.

Ensaio Imunoenzimático - ELISA¹²

Placas de 96 poços (Multiwell Plate/polystyrene - Sigma®) foram sensibilizadas com 100µl de antígeno na concentração de 1µg/ml em tampão carbonato 0,1M pH 9,0 durante 12 - 18h a 4°C. A seguir, foram lavadas com PBS + 0,02% Tween 20 (Sigma®) (PBSTL) + leite desnatado 0,3% (PBSTL) e incubadas com PBSTL por 1 hora em câmara úmida à temperatura de 37°C, para bloqueio de eventuais sítios inespecíficos de ligação. Após novo ciclo de lavagens com PBSTL, foram adicionadas as amostras de soro, 100µl/cavidade, diluídos a 1:500 em PBSTL e incubadas a 37°C em câmara úmida por 1 hora. Após novo ciclo de lavagens com PBSTL, acrescentou-se conjugado de coelho anti-IgG humano (Sigma®), conjugado a peroxidase (100µl/cavidade), na diluição 1/3.000 em

PBSTL. As placas foram incubadas por 1 hora a 37°C em câmara úmida, seguida de novo ciclo de lavagens com PBST. A reação foi revelada pela adição de 100µl/cavidade de solução cromogênica OPD (o - phenylenediamine 1mg/ml, H₂O₂ 0,03% em Tampão fosfato - citrato 0,2 M pH 5.0). Após 30 minutos, as reações foram interrompidas pela adição de HCl 4N (50µl/cavidade). A densidade óptica (D.O.) foi obtida por leitura a 492nm em leitor de microplacas (Labsystems Multiskan MS).

RESULTADOS

Os resultados demonstraram que 57,10%, ou seja, 848 das 1485 pacientes atendidas no período apresentaram anticorpos IgG anti-*T.gondii* detectados por ELISA. Todas as amostras analisadas por ELISA foram tituladas por meio de Imunofluorescência Indireta e houve concordância entre ambas às técnicas.

A porcentagem de amostras positivas para anticorpos IgG anti-*T. gondii* por ano, entre 2001 e 2005 foi sempre superior a 50%, como demonstrado na Figura 1.

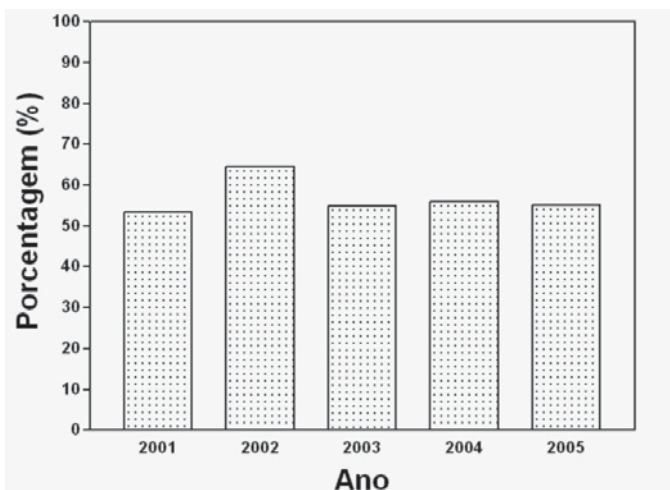


Figura 1. Distribuição anual das 848 amostras positivas de mulheres atendidas na rede pública de saúde de São Paulo, positivas para anticorpos IgG anti-*T. gondii*, no período de 2001 a 2005, detectados por ELISA e IFAT.

Quando as amostras positivas são distribuídas por faixa etária, pode-se observar um aumento da porcentagem de positividade conforme a faixa etária, com incidência anual de 0,6 ± 0,11% (Figura 2).

Foram detectadas por IFAT 1,95% (29 pacientes) com anticorpos IgM. Na Figura 3 foram correlacionados os títulos de anticorpos anti-*T. gondii* IgM com os da classe IgG, demonstrando parte das pacientes que apresentaram anticorpos IgM possuíam altos títulos de anticorpos IgG e outra parte títulos baixos.

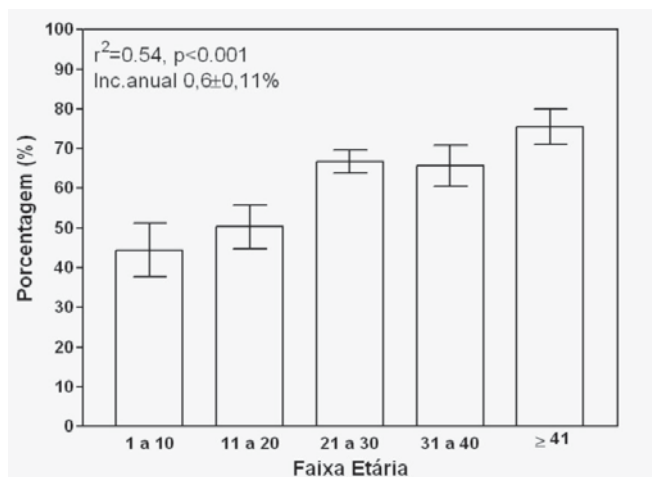


Figura 2. Distribuição por faixa etária das 848 amostras positivas de mulheres atendidas na rede pública de saúde de São Paulo, positivas para anticorpos IgG anti-*T. gondii*, no período de 2001 a 2005, detectados por ELISA e IFAT.

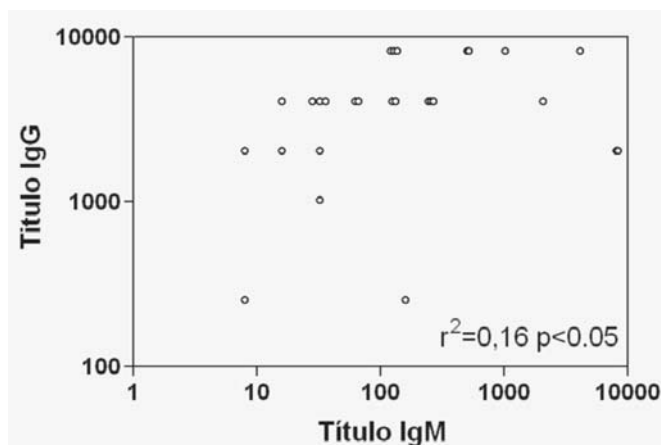


Figura 3. Títulos de anticorpos anti-*T. gondii* IgM (29 pacientes) correlacionados com os da classe IgG das pacientes atendidas na rede pública de saúde no período de 2001 a 2005, detectados por IFAT.

DISCUSSÃO

Inquéritos no Brasil têm mostrado que a taxa de anticorpos IgG anti-*T. gondii* varia de 40 a 80%^{13,14,15,16}, o que corroboram os dados obtidos em nossos ensaios, que verificaram a presença de anticorpos em 57,10% das amostras analisadas. Quando é realizada a distribuição anual das amostras positivas para anticorpos anti-*T. gondii* IgG, verificamos que em todos os anos a porcentagem foi sempre superior a 50%. Trabalhos anteriores demonstraram uma soroprevalência de anticorpos específicos contra *T. gondii* de 58,9% na região metropolitana de São Paulo¹⁰, indicando que provavelmente não ocorreu variação da soroprevalência nessa região. Dessa forma esse estudo reafirma que a prevalência da toxoplasmose em nosso meio é consideravelmente alta tanto quanto em outras áreas do país, outros autores relataram que entre 50 a 80% das mulheres brasileiras em idade fértil

apresentam anticorpos IgG anti-*T. gondii*¹⁷. Na Índia um recente estudo encontrou soroprevalência de anticorpos IgG anti-*T. gondii* de 45%¹⁸ e em países da Europa central têm-se demonstrado que a taxa de positividade em mulheres na idade fértil por *T. gondii* é de 37 a 58%¹⁹. As possíveis explicações para essas elevadas taxas de prevalência no Brasil e no mundo é provavelmente o contato com fatores de risco como ambientes contaminados por oocistos, proximidade com felinos, inadequado consumo alimentar de carne mal cozida e crua e a falta de costumes adequados de higiene^{20,21,19,22,23}.

Além disso, identificou-se uma relação de aumento da prevalência de anticorpos anti-*T. gondii* nos soros conforme o aumento da idade das pacientes, indicando que a idade é um fator de risco e este já foi demonstrado em vários estudos realizados nos Estados Unidos, Europa, Índia e Américas^{22,24,25,19}.

Neste trabalho 1,95% das amostras apresentaram anticorpos IgM anti-*T. gondii*, demonstrando um importante risco de infecção aguda nas mulheres, o que aumenta as chances da transmissão vertical e conseqüentemente de toxoplasmose congênita. Tem se relatado que a infecção aguda na gravidez varia entre 0,06 a 1,4%, sendo que 15% das infecções intra-uterinas resultam em morte fetal e 80% dos que nascem desenvolvem algum tipo de lesão tardia²⁶. Quando é realizada a correlação de anticorpos IgM com os da classe IgG anti-*T. gondii* verificamos que nas amostras positivas para IgM uma grande parte apresentou altos títulos de anticorpos da classe IgG o que pode caracterizar infecção aguda, enquanto uma parcela possui títulos baixos destes anticorpos o que possivelmente pode caracterizar que a infecção esta se tornando crônica^{27,28,29}.

De acordo com os dados obtidos, acredita-se que o contínuo monitoramento da toxoplasmose através de inquéritos sorológicos é importante para a verificação da taxa de prevalência nas várias regiões do país, havendo a necessidade de desenvolver trabalhos de informação e conscientização das mulheres em idade fértil e da população como um todo para os eventuais problemas de saúde que a toxoplasmose pode gerar. Isso acarretará na identificação da infecção aguda em mulheres gestantes, no seu início, para que seja realizado os cuidados pré-natais, o tratamento correto se necessário, assim evitando lesões ao feto.

REFERÊNCIAS

1. Ravdin, JI. Protozoal Diseases. In: Mandell, GL, Benett, JE, Dolin, R. Principles and Practice of Infectious Disease. v.2, 4ed. Edinburg: Churchill Livingstone; 1995.
2. Dubey, JP. Toxoplasma, Neospora, Sarcocystis, and other cyst-forming coccidia of humans and animals. In: Kreier JP, editor. Parasitic Protozoa v VI, New York: Academic Press; 1993.
3. Frenkel JK, Dubey JP, Miller NL. *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. Science 1970; 167: 893-6.
4. Dubey JP. Toxoplasmosis - An overview. Southeast Asian J Trop Med Public Health 1991; 22 (Supl): 88-119.
5. McCannel CA, Holland GN, Helm CJ, Cornell PJ, Winston JV, Rimmer TG. Causes of uveitis in the general practice of ophthalmology. UCLA Community-Based Uveitis Study Group Am J Ophthalmol 1996; 121: 35-46.
6. Ferreira MS, Borges AS. Some aspects of protozoan infections in immunocompromised patients - a review. Mem Inst Oswaldo Cruz 2002; 97: 443-57.
7. Maschke M, Dietrich U, Prumbaum M, Kastrup O, Turowski B, Schaefer UW, Diener HC. Opportunistic CNS infection after bone marrow transplantation. Bone Marrow Transplant 1999; 23: 1167-76.
8. Remington JS, Mcleod R, Desmonts G. Toxoplasmosis. In: Remington JS, Klein JO editors. Infectious Diseases of the fetus & newborn infant. 4^{ed}, W.B. Saunders Company, 1995.
9. Sabin AB. Toxoplasmic encephalitis in children. J Am Med Assoc 1941; 116: 801-7.
10. Guimarães ACS, Kawarabayashi M, Borges MM, Tolezano JE, Andrade Jr HF. Regional variation in toxoplasmosis seronegativity in the São Paulo metropolitan region. Rev Inst Med Trop São Paulo 1993; 35: 479-83
11. Camargo ME, Leser PG. Diagnostic information from serological tests in human toxoplasmosis. II Evolutionary study of antibodies and serological patterns in acquired toxoplasmosis, as detected by hemagglutination, complement fixation, IgG and IgM-immunofluorescence tests. Rev Inst Med Trop São Paulo 1976; 18:227-38.
12. Venkatesan, P, Wakelin, D. Elisias for parasitologists: or lies, damned lies and Elisias. Parasitol Today 1993; 9: 228-32.
13. Cavalcante GT, Aguiar DM, Chiebao D, Dubey JP, Ruiz VL, Dias RA, Camargo LM, Labruna MB, Gennari SM. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in human from rural Western Amazon, Brazil. J Parasitol 2006; 3: 647-9.
14. Spalding MS, Amendoeira MRR, Klein CH, Ribeiro LC. Serological screening and toxoplasmosis exposure factors among pregnant women in South of Brazil. Rev Soc Bras Med Trop 2005; 38(2): 173-7.
15. Coelho RA, Kobayashi M, Carvalho Jr LB. Prevalence of IgG antibodies specific to *Toxoplasma gondii* among blood donors in Recife, northeast Brazil. Rev Inst Med Trop São Paulo 2003; 45(4): 229-31.
16. Reis MM, Tessaro MM, D'Azevedo PA. Perfil sorológico para toxoplasmose em gestantes de um hospital público de Porto Alegre. Rev Bras Ginecol Obstet 2006; 28(3): 158-64.
17. Nóbrega OT, Karnikowski MGO. An estimation of the frequency of gestational toxoplasmosis in the Brazilian Federal District. Rev Soc Bras Med Trop 2005; 38(4): 358-60.
18. Singh S, Pandit AJ. Incidence and prevalence of toxoplasmosis in Indian pregnant women: a prospective study. Am J Reprod Immunol 2004; 52: 276-83.

19. Tenter AM, Heckeroth AR, Weiss LM. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int J Parasitol* 2000; 30: 1258-70.
20. Sukthana Y. Toxoplasmosis: beyond animals to humans. *Trend Parasitol* 2006; 22(3): 137-43.
21. Petersen E. Toxoplasmosis. *Semin Fetal Neonatal Med* 2007; 13: 1-10.
22. Bobic B, Jevremovic I, Marinkovic J, Sibalic D, Djurkovic-Djakovic O. Risk factors for *Toxoplasma* infection in a reproductive age female population in the area of Belgrade, Yugoslavia. *Eur J Epidemiol* 1998; 14(6): 605-10.
23. Roghmann MC, Faulkner CT, Lefkowitz A, Patton S, Zimmerman J, Morris JG Jr. Decreased seroprevalence for *Toxoplasma gondii* in Seventh Day Adventists in Maryland. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 60(5):790-2.
24. Dubey JP. Toxoplasmosis – a waterborne zoonosis. *Vet Parasitol* 2004; 126: 57-72.
25. Studenièaiová C, Benèaiová G, Holková R. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in a healthy population from Slovakia. *Eur J Intern Med* 2006; 17: 470-3.
26. Neto VA, Medeiros EAS, Levi GC, Duarte SIM. Toxoplasmose. 4ed. Sarvier (SP): Sarvier Publishers;1995.
27. Coutinho SG, Vergara TRC. Toxoplasmose. In: Coura JR, editor. *Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias* 1st ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan; 2005. p. 815-32.
28. Moscatelli G, Altcheh J, Biancardi M, Lapena A, Ballering G, Freilij H. Acute toxoplasmosis: clinical and laboratory data in eleven patients. *An Pediatr (Barc)*. 2006; 65(6): 551-5.
29. Cantos GA, Prando MD, Siqueira MV, Teixeira RM. Toxoplasmosis: occurrence of antibodies anti*Toxoplasma gondii* and diagnosis. *Rev Assoc Med Bras* 2000; 46(4): 335-41.

Otimização e avaliação do ensaio de imunofluorescência indireta para pesquisa de anticorpos anti-herpesvírus humano 8 (HHV-8) usando sangue colhido em papel de filtro

Standardization of the indirect immunofluorescence assay to search for human herpesvirus 8 (HHV-8) antibodies using blood collected on filter paper

RIALA6/1106

Joyce Matie Kinoshita SILVA¹, Mariana Cavalheiro MAGRI¹, Fabrício JACOB¹, Elizabeth de los SANTOS-FORTUNA¹, Adele CATERINO-DE-ARAÚJO^{1*}

*Endereço para correspondência: Seção de Imunologia, Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr. Arnaldo, 355, 11º andar, CEP 01246-902, São Paulo, S.P. e-mail: caterino@ial.sp.gov.br

Seção de Imunologia, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, S.P.

Recebido: 17/01/2007 – Aceito para publicação: 25/04/2007

RESUMO

O presente trabalho objetivou a otimização e a avaliação da coleta de sangue em papel de filtro para ser usada em levantamentos soroepidemiológicos de infecção por herpesvírus humano 8 (HHV-8). Foram utilizados os ensaios de imunofluorescência indireta (IFI) LANA e Lítico para a pesquisa de anticorpos anti-HHV-8 em amostras de sangue colhidas em membrana Schleicher Schuell de 28 pacientes com sarcoma de Kaposi (SK)/AIDS e 10 indivíduos sadios sem SK, dos quais os soros haviam sido anteriormente usados na padronização destas técnicas. Lâminas contendo células da linhagem BCBL-1 estimuladas ou não com éster de forbol, eluatos de sangue e conjugado anti-imunoglobulina humana marcado com fluoresceína foram empregados nas reações sorológicas e, as reações e os critérios de positividade seguiram os previamente estabelecidos na Seção de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz. Foi detectada fluorescência verde-amarelada na maioria das células nas diluições 1:50 e 1:100. Isto dificultou a leitura da IFI-Lítico, principalmente em diluições baixas, mas não interferiu na IFI-LANA cujo padrão pontilhado no núcleo coexistiu com a fluorescência de membrana. À medida que se seguiram as diluições, houve desaparecimento da inespecificidade e a leitura prosseguiu normalmente. Houve concordância de resultados positivos e negativos, com diferenças mínimas nos títulos de anticorpos. Os resultados obtidos viabilizam a coleta de sangue em papel para estudos epidemiológicos de infecção por HHV-8.

Palavras-chave. sorologia, papel de filtro, imunofluorescência, herpesvírus humano 8 (HHV-8).

ABSTRACT

The aim of the present study was to standardize the use of blood collected on filter paper in seroepidemiological studies of human herpesvirus 8 (HHV-8) infection. HHV-8 latent and lytic antibodies were searched in eluates of blood collected on Schleicher Schuell membrane from 28 KS/AIDS patients and 10 health individuals without KS, using “in house” immunofluorescence assays (IFAs). Serum samples from the same individuals were previously evaluated by IFA-LANA and IFA-lytic, and the results were compared to the results obtained in this study. IFAs were conducted according to criteria established at Immunology Department of Instituto Adolfo Lutz, using BCBL-1 cells line stimulated or not with phorbol ester, and FITC-anti human IgG conjugate. Non-specific staining on IFAs were detected when 1:50 and 1:100 blood eluated dilutions were employed. This unespecificity disappeared on subsequent blood dilutions. Concordant positive and negative results were obtained between sera and blood samples, but some minor differences were observed on antibodies title. The results obtained confirmed the use of blood collected on paper filter for HHV-8 seroepidemiological purposes.

Key words. serology, paper filter, immunofluorescence assay (IFA), human herpesvirus 8 (HHV-8).

INTRODUÇÃO

Desde a descoberta do herpesvírus humano 8 (HHV-8)¹ como sendo o agente etiológico do sarcoma de Kaposi (SK), vários estudos se seguiram com vistas a identificar populações e regiões endêmicas desta virose². Inicialmente, homens que faziam sexo com homens HIV-soropositivos foram apontados como transmissores do HHV-8, pois neles foi detectada a forma epidêmica do SK associada à AIDS³⁻⁵. Posteriormente, o vírus foi encontrado nas outras formas clínico-epidemiológicas do SK: no SK clássico do mediterrâneo, no SK endêmico africano e no SK iatrogênico associado à terapia imunossupressora e corticosteróide^{2,6-8}.

Com a introdução da sorologia para a pesquisa de anticorpos anti-HHV-8 foi possível mapear populações e regiões endêmicas do vírus que estavam associadas ou não à presença de SK⁹. Curiosamente, ameríndios da Amazônia brasileira foram apontados como portadores de HHV-8, e neles não foi detectado o SK¹⁰. Da mesma forma, em alguns países africanos onde o HHV-8 é endêmico, não há muitos casos de SK. Isto leva a crer que existam fatores presentes no hospedeiro e/ou parasita que podem estar associados ao risco de desenvolver doença relacionada ao HHV-8¹¹.

Até o presente, não existe um consenso de qual o melhor método sorológico para o diagnóstico de infecção por HHV-8, porém devido ao alto custo dos “kits” disponíveis no mercado, as técnicas “in house” continuam sendo as mais utilizadas em levantamentos epidemiológicos¹²⁻¹⁴. A Seção de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo, introduziu no ano de 2001, a técnica de IFI-LANA e IFI-Lítico¹⁵ e com ela realizou uma série de estudos com populações de diferentes categorias de risco para adquirir esta virose. Foram analisados soros de indivíduos saudáveis e infectados pelo HIV/AIDS¹⁶, pacientes com SK/AIDS¹⁷, profissionais saudáveis da área da saúde¹⁷, indivíduos com deficiência física e mental¹⁷, mulheres portadoras do HIV/AIDS¹⁸, crianças nascidas de mães HIV-soropositivas¹⁹, crianças hospitalizadas para tratamento eletivo²⁰, populações indígenas²¹, pacientes em diálise²² e, finalmente, profissionais do sexo feminino²³.

Mais recentemente, com vistas a auxiliar países africanos com poucos recursos financeiros e que têm o SK na sua forma endêmica e epidêmica foi idealizado um estudo para verificar a possibilidade de utilizar sangue colhido em papel de filtro para a detecção de anticorpos anti-HHV-8. As vantagens deste procedimento são: facilidade de coleta, armazenamento, transporte, baixo custo e menor desconforto e risco para o paciente. Com base na Portaria do Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT No 523) de 16/08/2005 que prevê apoio financeiro para intercâmbio técnico-científico entre Brasil e países africanos de língua portuguesa, foi encaminhado ao CNPq e aprovada a Missão Exploratória ProÁfrica, que visa detectar a real magnitude da infecção por HHV-8 em Moçambique. A etapa preliminar desta pesquisa é verificar a viabilidade da coleta de sangue em papel de filtro, objeto deste estudo.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados os ensaios de imunofluorescência indireta (IFI) LANA e IFI-Lítico para a pesquisa de anticorpos IgG anti-HHV-8 em amostras de sangue colhidas em papel de filtro (membrana Schleicher Schuell BioScience Inc., USA) de 28 pacientes com SK/AIDS do Instituto de Infectologia Emílio Ribas e 10 amostras de sangue de indivíduos aparentemente saudáveis, sem SK, colhidas no ano de 1999 e armazenadas a -70 °C. Soros dos mesmos indivíduos foram usados anteriormente na padronização da IFI-LANA e IFI-Lítico¹⁵ e os resultados obtidos comparados aos atuais. Células da linhagem BCBL-1 latentemente infectadas pelo HHV-8 e, as mesmas células estimuladas com éster de forbol, foram usadas para a detecção dos anticorpos LANA e Lítico, respectivamente. As reações e os critérios de positividade seguiram os previamente estabelecidos na Seção de Imunologia do Instituto Adolfo Lutz, sendo considerados positivos na IFI-LANA os soros que a partir da diluição 1:50 apresentaram fluorescência verde maçã com padrão nuclear pontilhado em mais de 90% das células BCBL-1, e na IFI-Lítico, fluorescência intensa de membrana (nuclear e externa) e difusa em toda a célula, em aproximadamente 5% das células BCBL-1 estimuladas com éster de forbol^{15,17}.

Para a pesquisa atual, círculos de 6 mm de diâmetro contendo 10µL de sangue, ou seja 5µL de soro, foram recortados do papel e eluídos em 200µL de PBS 0,01M, pH 7,2, por 16 horas a 4°C. Posteriormente, foi adicionado 50µL de PBS contendo leite desnatado a 5% (diluição final 1:50 em PBS leite 1%) e feita a diluição seriada na razão 2 para titulação dos anticorpos. Todos os casos foram inicialmente testados para as diluições 1:50, 1:100 e 1:200. Foi utilizado como conjugado anti-IgG humana marcada com fluoresceína diluído em azul de Evans-leite 1%. Quatro profissionais treinados, dois dos quais não estavam envolvidos no estudo anterior, realizaram a leitura das lâminas.

A utilização dos soros desta casuística para a padronização da sorologia para HHV-8 na Seção de Imunologia do IAL foi aprovada pelos Comitês de Ética em Pesquisa das Instituições envolvidas, incluindo a coleta de sangue em papel de filtro (CTC # 35/1999).

RESULTADOS

Durante o processo de padronização das técnicas de IFI-LANA e IFI-Lítico para pesquisa de anticorpos anti-HHV-8 nos anos de 1999-2000, foi verificado que o uso de leite desnatado a 1% bloqueava sítios inespecíficos de anticorpos e, assim, o leite foi usado nas várias etapas de reação, também para eluatos de papel de filtro.

Os resultados obtidos com eluatos tanto do grupo de pacientes com SK/AIDS como do grupo sadio mostraram fluorescência verde-amarelada na maioria das células BCBL-

1 nas diluições 1:50 e 1:100. Isto dificultou a leitura principalmente da IFI-Lítico, mas não interferiu na IFI-LANA, cujo padrão pontilhado no núcleo coexistiu com a fluorescência de membrana (Figura 1, Painel A e B, respectivamente). À medida que se seguiram as diluições, houve desaparecimento da inespecificidade e a leitura prosseguiu normalmente (Figura 1, Painel D e E). Para os casos negativos e do grupo sadio, houve apenas padrão amarelado que desapareceu com a diluição do soro (Figura 1, Painel C e F).

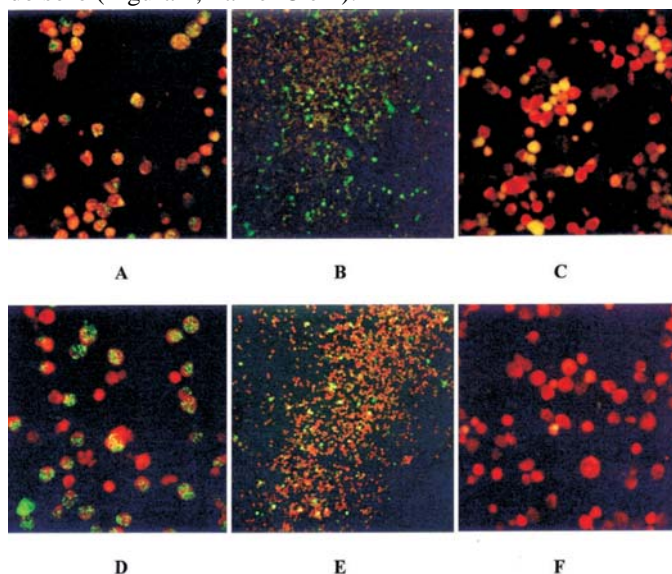


Figura 1. Amostras representativas do padrão de fluorescência obtido com as reações de IFI-LANA e IFI-Lítico, usando eluato de sangue colhido em papel de filtro de casos de SK/AIDS. Painel A e C (soro-reagente e não-reagente na IFI-LANA, diluição 1:50, aumento x400), Painel B (soro-reagente na IFI-Lítico, diluição 1:50, aumento x200). Painel D, E e F (mesmos soros na diluição 1:400).

Houve concordância de resultados positivos e negativos nos dois grupos analisados com diferenças nos títulos de anticorpos em oito casos de SK/AIDS: seis com diferença de um título (Pt. 10, 14, 28, 31, 34 e 39), um com diferença de dois títulos (Pt. 32) e um com diferença de três títulos (Pt. 38). Na maioria dos casos os títulos mais altos foram obtidos com eluato de sangue (Tabela 1).

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Nos últimos anos, vários inquéritos soroepidemiológicos principalmente de doenças parasitárias têm sido realizados usando sangue colhido em papel de filtro. Este material tem se mostrado útil para ser empregado em reações de aglutinação, imunoenzimáticas (ELISA), de imunodifusão (ID) e IFI. Um estudo comparativo usando soro e eluato de sangue para pesquisa de anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* mostrou que o eluato poderia ser usado na pesquisa de toxoplasmose congênita,

Tabela 1. Resultados obtidos com a sorologia para HHV-8 usando soro e eluato de sangue colhido em papel de filtro de 28 pacientes com SK/AIDS.

PACIENTE No	SORO		ELUATO DE SANGUE	
	IFI-LANA*	IFI-LÍTICO*	IFI-LANA*	IFI-LÍTICO*
2	25.600	3.200	25.600	3.200
3	25.600	3.200	25.600	3.200
4	1.600	800	1.600	800
5	200	800	200	800
6	100	100	100	100
7	200	800	200	800
8	-	-	-	-
9	200	6.400	200	6.400
10	-	50	-	-
11	200	800	200	800
12	800	3.200	800	3.200
13	200	-	200	-
14	200	50	100	100
16	400	400	400	400
17	-	50	-	50
18	1600	25.600	1600	25.600
23	-	3200	-	3.200
26	-	-	-	-
28	800	800	1.600	1.600
31	25.600	3.200	51.200	6.400
32	100	400	400	800
34	1.600	200	1.600	400
35	6.400	1.600	6.400	1.600
37	-	-	-	-
38	1.600	1.600	3.200	200
39	25.600	3.200	25.600	1.600
48	-	-	-	-
50	-	-	-	-

* Título de anticorpos (recíproca da maior diluição do soro com resultado reagente).
- (soro não reagente)

reduzindo assim a necessidade de punção sanguínea em crianças e possibilitando o uso de material estocado em papel de filtro²⁴. Já no Programa de Controle do Calazar no Brasil, a Fundação Nacional de Saúde adotou o uso da coleta de sangue em papel para o controle da leishmaniose visceral canina, com vistas a introduzir um programa de eliminação de cães sororeativos. Nele foi feito um estudo comparativo entre soro e eluato, usando as técnicas de IFI e ELISA. Os resultados obtidos provaram ser o eluato de sangue útil para inquéritos soroepidemiológicos²⁵. Na Nicarágua, um estudo em região endêmica de doença de Chagas mostrou que o uso de sangue colhido em papel de filtro poderia substituir o soro nas reações de ELISA e IFI, resultando em sensibilidade de 100% e especificidade de 90% para a pesquisa de anticorpos específicos²⁶. A mesma estratégia para pesquisa de anticorpos anti-*Plasmodium falciparum* foi adotada para controle de malária na Amazônia brasileira²⁷ e na Índia²⁸. Recentemente, foi proposto pelo CDC de Atlanta nos EUA, um protocolo de extração de anticorpos de amostras de sangue

colhidas em papel, para serem utilizadas na sorologia para sarampo/rubéola pela Organização Mundial da Saúde, em situações de surtos²⁹.

Até o presente, não foram encontrados relatos de sorologia para HHV-8 usando sangue colhido em papel de filtro. O presente estudo mostra que esta prática pode ser adotada para pesquisa de anticorpos na IFI-LANA e IFI-Lítico e que os resultados obtidos são concordantes, embora com algumas diferenças no título de anticorpos. Estas diferenças podem estar relacionadas ao lote de células e lâminas empregadas na reação, à forma de armazenamento do soro/sangue e, finalmente, ao critério de leitura dos técnicos envolvidos na análise. Curiosamente, em alguns casos, o título de anticorpos detectado em material colhido em papel de filtro foi superior ao encontrado no soro. Isto pode ser devido ao processo de congelamento/descongelamento que os soros sofreram durante as várias etapas de padronização da IFI-LANA e IFI-Lítico, bem como na avaliação de kits comerciais de ELISA e IFI, realizados em anos anteriores¹⁷, fato que não ocorreu com o sangue colhido em papel de filtro.

Embora mais estudos sejam necessários para a validação do método, a facilidade de coleta, armazenamento, transporte, baixo custo e menor desconforto ao paciente permite a utilização desta metodologia em inquéritos epidemiológicos de infecção por HHV-8 e na Missão Exploratória ProÁfrica onde são parceiros o Instituto Adolfo Lutz de São Paulo, o Centro de Referência e Treinamento em AIDS de São Paulo e a Universidade Eduardo Mondlane de Maputo, Moçambique.

AGRADECIMENTOS

Suporte: CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico). Edital Pró-África, Processo # 490179/2006-1.

Joyce M. K. SILVA (Bolsista do Programa de Aprimoramento da FUNDAP, área Imunologia no Instituto Adolfo Lutz de São Paulo), Mariana C. MAGRI (Bolsista de Mestrado do CNPq e Pós-Graduanda do Curso de Farmácia, Área Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo), Fabrício JACOB (Bolsista de Mestrado da CAPES e Pós-Graduando da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Área Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública), Elizabeth SANTOS-FORTUNA (PqC V, Supervisora FUNDAP), Adele CATERINO-DE-ARAUJO (PqC VI, Bolsista de Produtividade em Pesquisa do CNPq, Orientadora)

REFERÊNCIAS

1. Chang Y, Cesarman E, Pessin MS, Lee F, Culpepper J, Knowles J, et al. Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science* 1994; 266: 1865-9.
2. Hengge UR, Ruzicka T, Tyring SK, Seeber S. Update on Kaposi's sarcoma and other HHV-8 associated diseases. Part. 1: epidemiology, environmental predispositions, and therapy. *Lancet Infect Dis* 2002; 2:281-92.
3. Kedes DH, Operskalski E, Busch M, Kohn R, Flood J, Ganen D. The seroepidemiology of human herpesvirus 8 (Kaposi's sarcoma associated herpesvirus): distribution of infection in KS risk groups and evidence for sexual transmission. *Nature Med* 1996; 2 (8): 918-24.
4. Martin JN, Ganen DE, Osmond DH, Page-Shafer KA, Macrae D, Kedes DH. Sexual transmission and the natural history of human herpesvirus 8 infection. *N Engl J Med* 1998; 338 (14): 948-54.
5. Grulich AE, Olsen SJ, Luo K, Hendry O, Cunningham P, Cooper DA. Kaposi's sarcoma -associated herpesvirus: a sexually transmissible infection? *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1999; 20: 387-93.
6. Schultz TF. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8). *J Gen Virol* 1998; 79: 1573-91.
7. Leão JC, Caterino-de-Araujo A, Porter SR, Scully C. Human Herpesvirus 8 (HHV-8) and the etiopathogenesis of Kaposi's sarcoma. *Rev Hosp Clín Fac Med S. Paulo* 2002; 57 (4): 175-86.
8. Edelman DC. Human herpesvirus 8 - A novel pathogen. *Virol J* 2005; 2 (78): 1-91.
9. Chatlynne LG, Ablashi DV. Seroepidemiology of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV). *Semin Cancer Biol* 1999; 9: 175-85.
10. Biggar RJ, Whitby D, Marshall V, Linhares AC, Black F. Human herpesvirus 8 in Brazilian amerindians: A hyperendemic population with a new subtype. *J Infect Dis* 2000; 181: 1562-8.
11. Ablashi D, Chatlynne L, Cooper H, Thomas D, Yadav M, Norhanom AW et al. Seroprevalence of human herpesvirus 8 (HHV-8) in countries of Southeast Asia compared to the USA, the Caribbean and Africa. *Br J Cancer* 1999; 81 (5): 893-7.
12. Rabkin CS, Schulz TF, Whitby D, Lennette ET, Magpantay LI et al. Interassay correlation of human herpesvirus 8 serologic tests. *J Infect Dis* 1998; 178: 304-9.
13. Edelman DC, Ketema F, Saville RD, Herman J, Sill AM, Gill PS et al. Specifics on the refinement and application of two serological assays for the detection of antibodies to HHV-8. *J Clin Virol* 2000; 16: 225-37.
14. Martin JN, Amad Z, Cossen C, Lam PK, Kedes DH, Page-Shafer KA et al. Use of epidemiologically well-defined subjects and existing immunofluorescence assays to calibrate a new enzyme immunoassay for human herpesvirus 8 antibodies. *J Clin Microbiol* 2000; 38(2): 696-701.
15. Carbone PHL, Santos-Fortuna E, Moreira AA, Cibella SEL, Caterino-de-Araujo A. Padronização da técnica de imunofluorescência indireta para a detecção de anticorpos dirigidos a antígenos de fase latente e lítica na infecção

- pelo herpesvírus humano tipo 8 (HHV-8). In: IV Encontro do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, 2001. Resumos, *Rev Inst Adolfo Lutz* 2001; 60 (Supl. 1): 136.
16. Caterino-de-Araujo A, Calabrò ML, Santos-Fortuna E, Suleiman J, Chieco-Bianchi L. Searching for human herpesvirus 8 antibodies in serum samples from patients infected with human immunodeficiency virus type 1 and blood donors from São Paulo, Brazil. *J Infect Dis* 1999; 179: 1591-2.
 17. Carbone PHL. Pesquisa de anticorpos dirigidos a antígenos de fase latente e lítica do herpesvírus humano tipo 8 (HHV-8): prevalência em populações sob risco epidemiológico e em população sadia de São Paulo. [Dissertação de Mestrado]. São Paulo, S.P.: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, 2003. 150 pp.
 18. Caterino-de-Araujo A, Santos-Fortuna E, Carbone PHL, Cibella SEL, Moreira AA. Human herpesvirus 8 (HHV-8) antibodies among women from São Paulo, Brazil. Association with behavioral factors and Kaposi's sarcoma. *Brazilian J Infect Dis* 2003; 7 (6): 395-401.
 19. Caterino-de-Araujo A, Cibella SEL. Searching for antibodies to HHV-8 in children born to HIV-1 infected mothers from São Paulo, Brazil. Relationship to maternal infection. *J Trop Pediatr* 2003; 49 (4): 247-50.
 20. Avelleira JCR, Lupi O, Caterino-de-Araujo A, Santos-Fortuna E. Seroprevalence of HHV-8 infection in the pediatric population of two university hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *Intern J Dermatol* 2006; 45: 381-3.
 21. Cunha AMG, Caterino-de-Araujo A, Costa SCB, Santos-Fortuna E, Boa-Sorte NCA, Gonçalves MS et al. Increasing seroprevalence of human herpesvirus 8 (HHV-8) with age confirms HHV-8 endemicity in Amazon Amerindians from Brazil. *J Gen Virol* 2005; 86 (9): 2433-7.
 22. Magri MC, Caterino-de-Araujo A. Pesquisa da prevalência de anticorpos anti-HHV-8 em pacientes em diálise e em fila de transplante renal. BEPA – Boletim Epidemiológico Paulista [serial online] 2006 Dezembro; 3(36). Available from: URL: http://www.cve.saude.sp.gov.br/agencia/bepa36_monografia.htm.
 23. Caterino-de-Araujo A, Santos-Fortuna E, Magri MC, Schuelter-Trevisol F, Silva MV. Latent Human Herpesvirus – 8 (HHV-8) infection in female commercial sex workers from Imbituba, Santa Catarina, Brazil. *Brazilian J Infect Dis* 2007; 11(1): 9-11.
 24. Patel B, Holliman RE. Antibodies to *Toxoplasma gondii* in eluates from filter paper specimens. *Br J Biomed Sci* 1994; 51(2): 104-8.
 25. Braga MD, Coelho IC, Pompeu MM, Evans TG, MacAullife IT, Teixeira MJ et al. Control of canine visceral leishmaniasis: comparison of results from a rapid elimination program of serum-reactive dogs using an immunoenzyme assay and lower elimination of serum-reactive dogs using filter paper elution indirect immunofluorescence. *Rev Soc Bras Med Trop* 1998; 31 (5): 419-24.
 26. Palácios X, Bellei A, Espino AM. Detection of antibodies against *Trypanosoma cruzi* in Somoto, Nicarágua, using indirect ELISA and IFI on blood samples on filter paper. *Rev Panam Salud Publica* 2000; 8 (6): 411-7.
 27. De Carvalho ME, Ferreira MU, De Souza MR, Ninomia RT, Matos GF, Camargo LM et al. Malaria seroepidemiology: comparison between indirect fluorescent antibody test and enzyme immunoassay using bloodspot eluates. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1992; 87 (2): 205-8.
 28. Biswas S. Inter-test comparison between filter paper absorbed blood eluate and serum for malaria serology by enzyme immunoassay: an operational feasibility. *J Immunoassay Immunochem* 2004; 25 (4): 399-410.
 29. Mercader S, Featherstone D, Bellini WJ. Comparison of available methods to eluate serum from dried blood spot samples for measles serology. *J Virol Methods* 2006; 137(1): 140-9.

Cutaneous secretion from the giant African snail, *Achatina fulica*, as a source of Antileishmanial compounds

Secreção cutânea do caramujo gigante africano, *Achatina fulica*, como fonte de compostos anti-*Leishmania*

RIALA6/1107

André Gustavo TEMPONE*

*Corresponding author: André G. Tempone Cardoso (Tempone, AG), M.Sc., Ph.D. (atempone@ial.sp.gov.br/atempone@usp.br). Lab. Toxinologia Aplicada, Depto. Parasitologia, Div. Biologia Médica, Instituto Adolfo Lutz - Av. Dr. Arnaldo, 351, 8º andar CEP: 01246-902, São Paulo, Brasil.

Recebido: 15/03/2007 – Aceito para publicação: 25/04/2007

ABSTRACT

Leishmaniasis is a severe protozoan parasite disease, causing clinical symptoms from a single cutaneous ulceration to a progressive and fatal disease. The treatment is based on toxic chemotherapeutic compounds, being pentavalent antimonials the first line drugs. Natural products from Brazilian fauna, especially animal venoms and cutaneous secretions, are a rich source of novel chemical molecules which could be used as drug prototypes for the development of new therapeutics. This study describes for the first time the effective antileishmanial activity of crude cutaneous secretion from the giant African snail, *Achatina fulica*, and its mammalian cells cytotoxicity and also its potential mode of action against *Leishmania* promastigotes. The crude secretion showed an 50% Effective Concentration (EC_{50}) of 98.37 $\mu\text{g/mL}$ against *L.(L.) chagasi* promastigotes. By means of enzymatic assays, a L-amino acid oxidase (L-AAO) activity was detected in crude secretion, and the hydrogen peroxide produced by this enzyme revealed to be one of the compounds responsible for the antileishmanial effect. The use of catalase for H_2O_2 scavenging in *Leishmania* cultures incubated with crude secretion abolished 54% of parasite death. Despite a moderate toxicity of the snail cutaneous secretion on LLC-MK2 mammalian cells (EC_{50} of 83.25 $\mu\text{g/mL}$), these promising data provided the valuable information for further chromatographic isolation of novels antiparasitics, which could be a useful tool for the development of new drugs against Leishmaniasis.

Key words. venoms, secretions, *Leishmania*, *Achatina*, drugs, L-amino acid oxidase.

RESUMO

A Leishmaniose é uma doença parasitária grave que causa desde uma única ulceração cutânea até uma doença progressiva e fatal. O tratamento é baseado em agentes quimioterápicos tóxicos, sendo indicados como fármacos de primeira escolha os antimoniais pentavalentes. Os produtos naturais derivados da fauna brasileira, especialmente venenos e secreções cutâneas de anfíbios, são fontes ricas de novas moléculas químicas, as quais podem ser utilizadas como protótipos farmacêuticos no desenvolvimento de novos fármacos. No presente trabalho, é feita a descrição inédita sobre a efetiva atividade anti-*Leishmania* da secreção cutânea do caramujo gigante Africano, *Achatina fulica*, bem como a sua citotoxicidade em células de mamíferos e seu possível mecanismo de ação contra os promastigotas. A secreção bruta apresentou Concentração Efetiva 50% de 98,37 $\mu\text{g/mL}$ contra promastigotas de *L.(L.) chagasi*. Por meio de ensaios enzimáticos, foi detectada a atividade L-aminoácido oxidase (L-AAO) na secreção bruta, e também foi demonstrado que o H_2O_2 gerado por esta enzima é um dos compostos responsáveis pelo efeito anti-*Leishmania*. O uso de catalase, para eliminar a ação do H_2O_2 nas culturas de *Leishmania*, causou a diminuição de 54% na morte dos parasitos. Apesar da ocorrência de citotoxicidade moderada da secreção bruta contra as células LLC-MK2 (CE_{50} de 83,25 $\mu\text{g/mL}$), estes são dados promissores que possibilitam isolamentos cromatográficos futuros de novos antiparasitários, os quais poderão servir como valiosas ferramentas no desenvolvimento de fármacos contra a Leishmaniose.

Palavras-chave. venenos, secreções, *Leishmania*, *Achatina*, drogas, L-aminoácido oxidase.

INTRODUCTION

The African giant snail (*Achatina fulica*, Ferussac), is one of the largest land snail species in the world, now found abundantly in tropical and subtropical regions¹. In Brazil, the snail was supposed to be used for human consumption as "escargot". Its dispersal from the artificial breeding has widespread the risk of human contamination by *Angiostrongylus cantonensis*, a common nematode parasite found in this snail². The cutaneous secretions of many animals, especially amphibians, have been representing an important source of antiparasitic and antifungal compounds³. *A. fulica* presents an abundant cutaneous secretion that recently has been demonstrating significant therapeutic potential, with biological activities related to antibacterial^{4,5} and antiangiogenic activity in tumor cells⁶. Leishmaniasis is a complex disease where the protozoan parasite spread by a sandfly insect vector, can cause from a single cutaneous ulceration to a progressive and fatal disease. The disease is a significant health problem in many parts of the world resulting in an estimated of 12 million cases⁷. The treatment is based on toxic chemotherapeutics, which is difficulty to administer, expensive and becoming ineffective due to the emergence of drug resistance⁸. Despite the increased number of cases, no considerable effort has been made for new drug development. The lack of efficient and less toxic drugs against Leishmaniasis and the mainstay of Gaspar Vianna's antimonial for clinical therapy for almost one century show the imperative necessity of new lead compounds⁹. In this work, we have described the potential antileishmanial activity of the crude cutaneous secretion of *A. fulica* against promastigotes, studied the *in vitro* mammalian cytotoxicity and its possible mode of action.

MATERIAL AND METHODS

Materials

M-199 and RPMI-PR⁻ 1640 medium (without phenol red) were purchased from Sigma. Pentavalent antimony (Aventis-Pharma) and pentamidine (Eurofarma) were used as the standard drugs. Sodium dodecyl sulphate (SDS) was purchased from Merck, 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (Thiazol blue; MTT) was purchased from Sigma.

Animals

Animals were supplied by the Animal Breeding Facility at Instituto Adolfo Lutz de São Paulo. They were maintained in sterilized cages under a controlled environment, receiving water and food *ad libitum*. Animal procedures were performed under the approval of the Research Ethics Commission, according to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals from the National Academy of Sciences (<http://www.nap.edu>). *A. fulica*

cutaneous secretion was obtained from Dr. Sylvio Rocco at Instituto Adolfo Lutz through slightly mechanical compression of 1 animal in distilled water. The secretion was immediately kept at -20°C and lyophilized. The mass of the dried secretion was weighted, diluted in Phosphate Buffered-Saline and sterilized through 0.22 µm membranes (Millipore).

Parasites

L. (L.) chagasi (MHOM/BR/1972/LD) was maintained in golden hamsters. Promastigotes were maintained in M-199 medium supplemented with 10% calf serum, 2% male human urine and 0.25% hemin at 24°C.

Determination of the 50% Effective Concentration (EC₅₀)

The antileishmanial activity against promastigotes was determined using 96-well microplates, with pentamidine as the standard drug. Briefly, promastigotes were counted in a Neubauer haemocytometer and seeded at 1 x 10⁶/well in 96-well microplates. The *A. fulica* secretion was incubated in a range concentration of 500 to 0.1 µg/mL for 48 h at 24°C. Parasite viability was determined using the MTT assay at 570 nm¹⁰. The antileishmanial activity against intracellular amastigotes was determined with infected macrophages, using pentavalent antimony as the standard drug. Macrophages were obtained from the peritoneal cavity of BALB/c mice and added to 24-well plate at 4x10⁵/well. The parasite burden was defined as the number amastigotes/macrophage out of 500 cells. Each assay was determined in duplicate and at least in 2 independent assays¹¹. The EC₅₀ values were determined using a sigmoid dose-response analysis at Graph Pad Prism 3.0, considering the 95% Confidence Intervals. Data represents the mean (± S.D.) of duplicate samples from two independent assays.

Cytotoxicity Assay

LLC-MK2 (ATCC –Rhesus Monkey Kidney Epithelial Cells) cells were kept in RPMI-PR⁻ 1640 medium, seeded at 4x10⁴/well in 96-well microplates and incubated at 37°C for 48 hours in the presence of *A. fulica* secretion in a 5% CO₂ humidified incubator. The viability of the cells was determined with the MTT¹⁰. Data represents the mean (± S.D.) of duplicate samples from two independent assays.

L-amino acid oxidase (L-AAO) activity

Crude secretion of *A. fulica* (100 µg/mL) was assayed for L-AAO activity using a colorimetric assay in a 96-well microplate. The assay was derived by an adaptation of a reported peroxidase test¹². The reaction mixture contains 100 mM Tris/HCl, pH 8.5, 3 mM L-leucine as substrate, horseradish peroxidase (10 IU/mL) and o-phenylenediamine (OPD), (0.1 mg/mL). Samples were incubated for 1 hour at 25°C, and Optical Density (O.D.) was determined at 414 nm at 10 minutes intervals on a microplate reader for kinetics. Hydrogen peroxide standards were used and the linear regression data calculated with the Graph Pad Prism 3.0 software. L-AAO activity was

expressed as nmoles H_2O_2 /mL. Data represents the mean (\pm S.D.) of duplicate samples from two independent assays.

Characterization of L-AAO action on promastigotes

Promastigotes of *L. (L.) chagasi* (1×10^6 /well) were incubated with *A. fulica* secretion ($100 \mu\text{g/mL}$) and catalase ($300 \mu\text{g/mL}$) in a final volume of $150 \mu\text{L}$ /well for 24 h at 24°C in a 96-well microplate assay, in order to abolish the action of H_2O_2 ¹³. Control groups without *A. fulica* secretion, with or without catalase were also tested. The viability of *L. (L.) chagasi* was determined by the MTT assay¹⁰. Data represents the mean (\pm S.D.) of duplicate samples from two independent assays.

Leishmania Permeability Assay

Pore formation in *L. (L.) chagasi* promastigote membrane was studied in the presence of *A. fulica* secretion through the ethidium bromide assay¹⁴. The *A. fulica* secretion was incubated at $100 \mu\text{g/mL}$ with promastigotes (1×10^6 /well) in the presence of ethidium bromide ($25 \mu\text{g/mL}$) in 96-well microplates for different times (0 to 120 min) at 24°C . In each time a sample was added to glass coverslips and observed in a fluorescence microscopy. Each image was saved as TIFF file. Amphotericin B was incubated with parasites at the same conditions and used as internal control.

RESULTS AND DISCUSSION

Antileishmanial Activity and Cytotoxicity Studies: Determination of the 50% Effective Concentration (EC_{50})

The crude secretion of *A. fulica* showed an 50% Effective Concentration (EC_{50}) of $98.37 \mu\text{g/mL}$ (95% Confidence Interval= 81.62 - $118.6 \mu\text{g/mL}$) against *L. (L.) chagasi* promastigotes, showing 100% of killing activity at the highest dose (Figure 1). In order to evaluate the activity against the intracellular form of the parasite, *Leishmania*-infected macrophages (intracellular amastigotes) were incubated with the test *A. fulica* secretion at different concentrations. No detectable antileishmanial activity could be observed at the highest concentrations, as macrophage damage was clearly seen. Future isolation of the active compound in the *A. fulica* secretion by chromatographic techniques could eliminate the mammalian cytotoxic fraction and further activity against *Leishmania*-infected macrophages could be properly evaluated. Although antibacterial activity of *A. fulica* secretion has been described^{4,5,15}, neither antileishmanial nor any other antiparasitic activity was described. Kubota and co-workers¹⁵, isolated the antibacterial factor of the *A. fulica* secretion. The glycoprotein presented a molecular weight of 160 kDa, being composed of two subunits of 70 – 80 kDa. Ehara and co-workers⁵ have sequentially isolated and characterized the antibacterial compound. They named it Achacin, an antibacterial glycoprotein with L-amino acid oxidase (L-AAO) activity, which generates cytotoxic hydrogen peroxide.

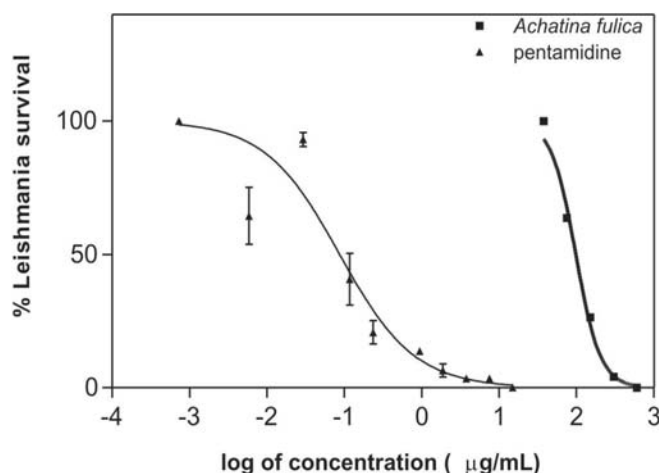


Figure 1. Determination of the 50% Effective Concentration (EC_{50}) of *A. fulica* secretion against *L. (L.) chagasi* promastigotes. The viability of parasites was determined through the oxidative mitochondrial function by MTT at 570 nm. Pentamidine was used as standard drug. Sigmoid dose-response curve was analyzed in Graph Pad Prism 3.0 software. Data represents the mean (\pm S.D.) of duplicate samples from two independent assays.

We have also studied the cytotoxicity of the crude secretion against mammalian cells through the *in vitro* incubation with LLC-MK2 cells. The crude mucus showed a moderate cytotoxicity, with an EC_{50} of $83.25 \mu\text{g/mL}$ (95% Confidence Interval= 63.70 - $108.8 \mu\text{g/mL}$) as determined by oxidative mitochondrial function by MTT (Figure 2).

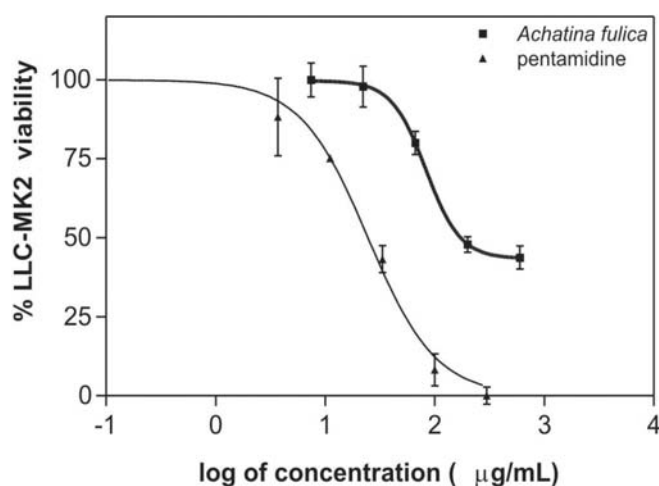


Figure 2. Cytotoxicity studies of *A. fulica* secretion against LLC-MK2 cells. Pentamidine was used as standard drug. The viability of mammalian cells was determined through the oxidative mitochondrial function by MTT at 570 nm. Sigmoid dose-response curve was analyzed in Graph Pad Prism 3.0 software. Data represents the mean (\pm S.D.) of duplicate samples from two independent assays.

Biochemical Characterization of Crude Secretion: L-AAO Activity

Through enzymatic assays, we have found L-amino acid oxidase (L-AAO) activity in the crude secretion of *A. fulica*. The kinetic parameters showed that the enzyme produced 0.104 nmoles/min/mL of H_2O_2 (Figure 3). The venom of the snake *Bothrops moojeni* was used as standard and produced 0.451 nmoles/min/mL of H_2O_2 . Our data about the presence of L-AAO activity in *A. fulica* secretion corroborates those observed elsewhere⁵.

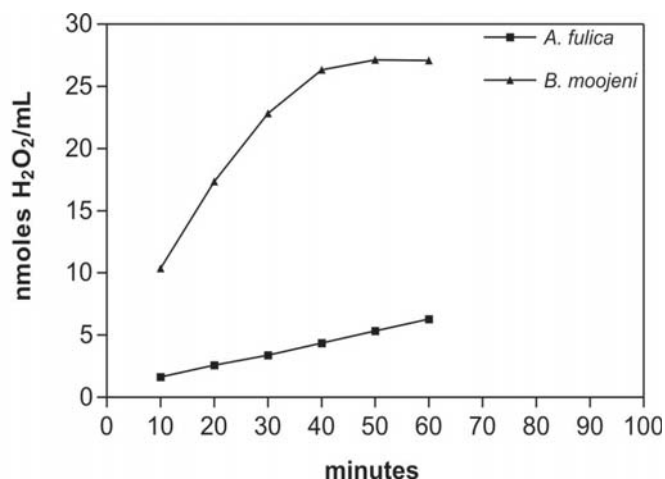
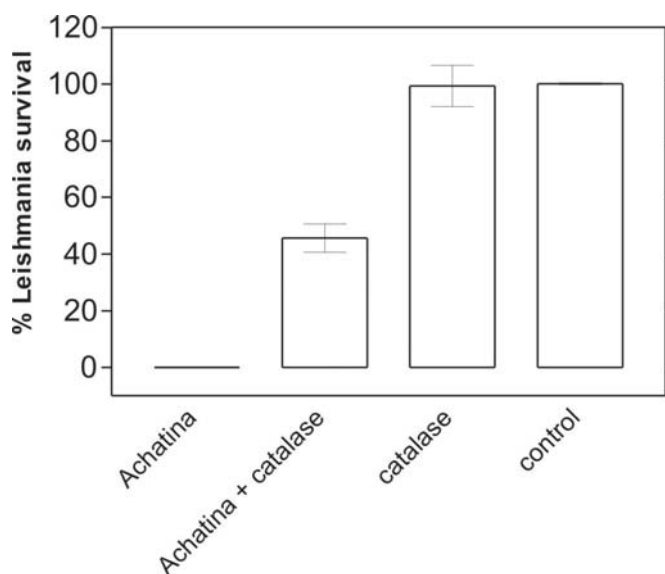


Figure 3. L-amino acid oxidase (L-AAO) activity of *A. fulica* secretion. Samples were incubated for 1 hour at 25°C with the reagents described in material and methods, and Optical Density (O.D.) was determined at 414 nm at 10 minutes intervals on a microplate reader for kinetics. Hydrogen peroxide standards were used and the linear regression data calculated with the Graph Pad Prism 3.0 software. *Bothrops moojeni* venom was used as positive control for H_2O_2 production. Data represents the mean (\pm S.D.) of duplicate samples from two independent assays.

Leishmania and *A. fulica* Secretion: Possible Mode of Action on Promastigotes

The incubation of *L. (L.) chagasi* promastigotes with *A. fulica* secretion using catalase for H_2O_2 scavenging, abolished 54% of parasite death (Figure 4). L-amino acid oxidases (L-AAO) catalyzes the oxidative deamination of L-amino acids to produce the corresponding α -keto-acid, hydrogen peroxide and ammonia^{16,17}. Tempone and co-workers¹³ have previously demonstrated that *Leishmania* sp. is not affected by the α -keto-acid and ammonia produced by L-AAO. Consequently, our data suggest that other compounds than L-AAO presented in the crude secretion of *A. fulica* might be involved in the antileishmanial activity, corresponding to the 46% of the killing activity when incubated with catalase. The presence of other compounds like peptides and proteins might be associated to the antiparasitic effect.



We have also studied the effect of the crude secretion on the membrane of *L. (L.) chagasi* promastigotes through the permeability assay using ethidium bromide¹⁴. The fluorescent microscopy images (data not shown) suggest that the killing activity of *A. fulica* secretion on *Leishmania (L.) chagasi* might be other than pore-forming activity in the parasite membrane, as no fluorescence marker was found in the intracellular environment of promastigotes. Amphotericin B was used as a standard drug, since its pore-forming activity in *Leishmania* sp. membrane has been described¹⁴ (data not shown). Further assays would evaluate other possible intracellular targets of *A. fulica* secretion in *Leishmania* promastigotes, by using transmission electron microscopy.

CONCLUSIONS

This is the first paper which describes the effective antileishmanial activity of the Giant African snail, *A. fulica*, and also demonstrates that other compounds than the high molecular weight enzyme L-AAO might be involved in the killing effect. This valuable information, if adequately studied, could be a useful tool for chromatographic isolation of active compounds. These results could lead in the development of new drug prototypes which could be used as novel and less toxic chemotherapeutics for neglected diseases as Leishmaniasis.

ACKNOWLEDGEMENTS

The author thanks Ms. Ivete A. R. de Lima for laboratory assistance, Ms. Cleide P.C. Santos and Maria F.A. Silva for animal care. This work was supported by grants from FAPESP (2005/00974-9) and Instituto Adolfo Lutz.

REFERENCES

1. Takeuchi H, Araki Y, Emaduddin M, Zhang W, Han XY, Salunga TL, Wong SM. Identifiable *Achatina* giant neurones: their localizations in ganglia, axonal pathways and pharmacological features. *Gen Pharmacol* 1996; 27(1): 3-32.
2. Teles HM, Vaz JF, Fontes LR, Domingos Mde F. Occurrence of *Achatina fulica* Bowdich, 1822 (Mollusca, Gastropoda) in Brazil: intermediate snail host of angiostrongyliasis. *Rev Saude Pública* 1997; 31(3): 310-2.
3. Tempone AG, Melhem MSC, Prado FO, Motoie G, Hiramoto RM, Antoniazzi MM, Haddad CFB, Jared C. Amphibian secretions for drug discovery studies: a search for new antiparasitic and antifungal compounds. *Lett Drug Des & Discovery* 2007; 4 (1): 67-73.
4. Otsuka-Fuchino H, Watanabe Y, Hirakawa C, Tamiya T, Matsumoto JJ, Tsuchiya T. Bactericidal action of a glycoprotein from the body surface mucus of giant African snail. *Comp Biochem Physiol C* 1992; 101 (3): 607-13.
5. Ehara T, Kitajima S, Kanzawa N, Tamiya T, Tsuchiya T. Antimicrobial action of achacin is mediated by L-amino acid oxidase activity. *FEBS Lett* 2002; 531 (3): 509-12.
6. Lee YS, Yang HO, Shin KH, Choi HS, Jung SH, Kim YM, Oh DK, Linhardt RJ, Kim YS. Suppression of tumor growth by a new glycosaminoglycan isolated from the African giant snail *Achatina fulica*. *Eur J Pharmacol* 2003; 465(1-2): 191-8.
7. Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH. Drug resistance in leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19 (1): 111-26.
8. Davies CR, Kaye P, Croft SL, Sundar S. Leishmaniasis: new approaches to disease control. *BMJ* 2003; 326(7385): 377-82.
9. Balanã-Fouce R, Reguera RM, Cubria JC, Ordonez D. The pharmacology of leishmaniasis. *Gen Pharmacol*. 1998 Apr; 30(4): 435-43.
10. Tada H, Shiho O, Kuroshima K, Koyama M, Tsukamoto K. An improved colorimetric assay for interleukin 2. *J Immunol Methods* 1986; 93 (2): 157-65.
11. Tempone AG, Perez D, Rath S, Vilarinho AL, Mortara RA, de Andrade HF Jr. Targeting *Leishmania (L.) chagasi* amastigotes through macrophage scavenger receptors: the use of drugs entrapped in liposomes containing phosphatidylserine. *J Antimicrob Chemother* 2004; 54 (1): 60-8.
12. Torii S, Naito M, Tsuruo T. Apoxin I, a novel apoptosis-inducing factor with L-amino acid oxidase activity purified from western diamondback rattlesnake venom. *J Biol Chem* 1997; 272: 9539-42.
13. Tempone AG, Andrade HF Jr, Spencer PJ, Lourenco CO, Rogero JR, Nascimento N. Bothrops moojeni venom kills *Leishmania* spp. with hydrogen peroxide generated by its L-amino acid oxidase. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 280 (3): 620-4.
14. Cohen BE, Benaim G, Ruiz MC, Michelangeli F. Increased calcium permeability is not responsible for the rapid lethal effects of amphotericin B on *Leishmania* sp. *FEBS Lett* 1990; 259 (2): 286-8.
15. Kubota Y, Watanabe Y, Otsuka H, Tamiya T, Tsuchiya T, Matsumoto JJ. Purification and characterization of an antibacterial factor from snail mucus. *Comp Biochem Physiol C* 1985; 82 (2): 345-8.
16. Tan N-H, Swaminathan S. Purification and properties of L-amino acid oxidase from monocellate cobra (*Naja naja kaouthia*) venom. *Int J Biochem* 1992; 24: 967-73.
17. Pessatti ML, Fontana JD, Furtado MFD, Guimarães MF, Zanette LRS, Costa WT, Baron M. Screening of *Bothrops* snake venoms for L-amino acid oxidase activity. *Appl Biochem Biotech* 1995; 51: 197-210.

Células atípicas de *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* observadas em líquido cefalorraquidiano

Atypical *Cryptococcus neoformans* cells isolated from cerebrospinal fluid samples

RIALA6/1108

Regina C. PASCHOAL¹, Márcia S.C. MELHEM², Tamara GUELLI², Maria Walderez SZESZS²

¹ Instituto Adolfo Lutz – Laboratório I de Santos. Rua Silva Jardim, 90 – Santos – SP, CEP - 11015-020. e-mail: rcpaschoal@ial.sp.gov.br

² Instituto Adolfo Lutz Central. Av. Dr. Arnaldo, 355 – São Paulo-SP CEP – 01246-902

Recebido: 20/06/2006 – Aceito para publicação: 25/04/2007

RESUMO

Muitos fungos patogênicos apresentam morfologias diferentes nas formas parasíticas e saprofíticas. Essas leveduras podem apresentar morfologias diversas como hifas curtas e aberrantes, formas gigantes em pus fresco, abscesso cerebral, cortes histológicos e presença de cápsula espessa geralmente no sorotipo B em tecidos. No presente relato é descrito o caso de um homem de 39 anos de idade, solteiro e HIV positivo, com os seguintes sintomas clínicos: candidíase oral, tuberculose pulmonar, insuficiência cardíaca, meningite por *Corynebacterium sp* e neurocriptococose por *C. neoformans* var. *neoformans*. O paciente foi tratado com anfotericina B durante 45 dias, com dose total de 1960mg. Foram observadas e isoladas do líquido cefalorraquidiano (LCR) células atípicas de *C. neoformans* de diferentes tamanhos e formas de blastoconídios. O exame direto do LCR em tinta da China apresentou células ovóides, ramificadas, com pseudo-hifas envolvidas por uma fina cápsula. A variedade foi identificada como *C. neoformans* var. *neoformans*. O teste de suscetibilidade aos antifúngicos realizados segundo a técnica de EUCAST indicou que a cepa isolada era sensível a: anfotericina B (Concentração Inibitória Mínima - MIC = 0,12µg/mL), Fluconazol (2µg/mL) e itraconazol (0,06µg/mL). Os relatos anteriores sobre leveduras atípicas descrevem a ocorrência de blastoconídios múltiplos e irregulares em materiais biológicos humanos.

Palavras-chave. células atípicas, *Cryptococcus neoformans*, morfologia.

ABSTRACT

Most pathogenic fungi show dual morphology features in their saprophytic and parasitic stage. Occasionally, yeast cells produce short and aberrant hyphae, or large cells which can be seen on granulomas histological analysis, and otherwise as giant forms in fresh pus from abscesses, or also as highly encapsulated - serotype B in tissue specimens. The present study reports a HIV positive 39 years old single male patient, who presented oral candidiasis, pulmonary tuberculosis, cardiac insufficiency, *Corynebacterium sp* meningitis, and neurocryptococcosis due to *C. neoformans* var. *neoformans*. The patient was treated with amphotericin B for 45 days, who received approximately a total of 1,960 mg of drug. Atypical *C. neoformans* cells in diverse sizes and blastoconidia forms were isolated from cerebrospinal fluid (CSF). CSF stained with a China ink preparation revealed the presence of ovoid, branched, and pseudohyphae forms surrounded by a thick capsule. The isolate variety was identified as *C. neoformans* var. *neoformans*. Antifungal susceptibility testing performed by means of EUCAST⁵ technique indicated that the strain was sensitive to amphotericin B (MIC = 0.12µg/mL), fluconazole (2µg/mL), and itraconazole (0.06 µg/mL). The previous reports on atypical yeast cells form described the occurrence of multiple and irregular blastoconidia in human clinical samples.

Key words. atypical cells, *Cryptococcus neoformans*, morphology.

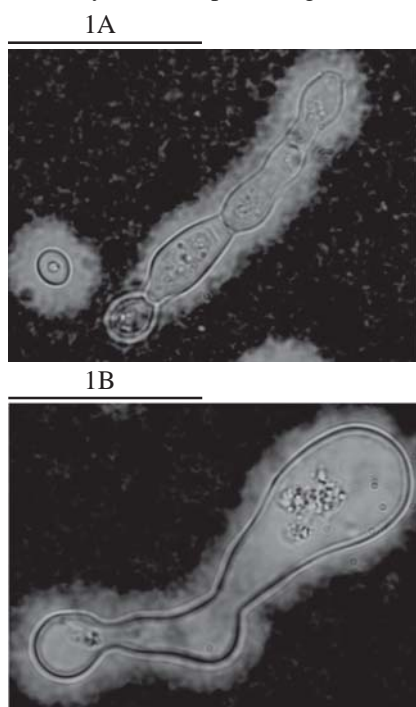
INTRODUCTION

It is well established that pathogenic organism grown in a parasitic state are different in many aspects from those grown on culture media¹. Most pathogenic fungi show dual aspects of the morphology of fungi in their saprophytic and parasitic state². Giant forms of *C. albicans*^{3,4} and *C. neoformans* have occasionally been observed in vivo. A *C. neoformans* yeast cell has an average diameter of 8-10µm. The yeast cell is surrounded by a polysaccharide capsule of various thicknesses. Occasionally, yeast cells have been reported to produce short aberrant hyphae⁵ large cells may be seen histologically in *C. neoformans* granulomas⁸ giant form in fresh pus⁶, large cells isolated from cerebral abscess⁷ and highly encapsulated *C. neoformans* serotype B from tissue^{4,8}.

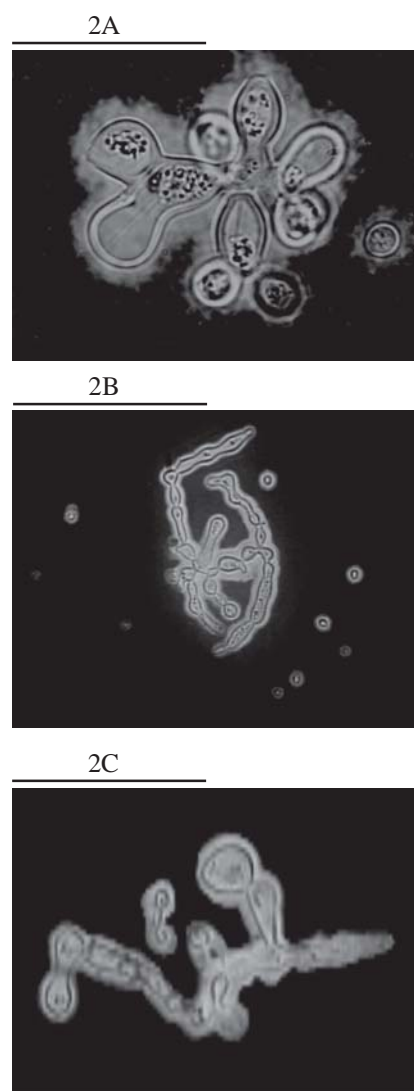
CASE RELATE

This case relate a single man, admitted at the Instituto de Infectologia Emílio Ribas, São Paulo-Brazil, 39 years-old, positive HIV, presented oral candidosis, pulmonary tuberculosis, cardiac insufficiency, *Corinebacterium* meningitis and neurocryptococcosis to *C. neoformans* var. *neoformans*. The patient was treated with amphotericin B for 45 days, total doses 1960mg.

Pleomorphic *C. neoformans* cells were isolated from CSF, and an China ink preparation from Central Nervous System (CNS) revealed different sizes and pseudohyphae forms (Figures 1A and 1B), blastoconidia, ovoid, branched and pseudohyphae forms surrounded by a thick capsule (Figure 2A, 2B and 2C).



Figures 1A and 1B. Pleomorphic *C. neoformans* with different sizes and pseudohyphae forms isolate from CSF of Central Nervous System of a man, positive HIV and ink China preparation.



Figures 2A, 2B and 2C. Pleomorphic *C. neoformans* with blastoconidia, ovoid, branched and pseudohyphae forms isolate from CSF of Central Nervous System of a man, positive HIV and ink China preparation.

The CNS samples were cultured in Niger agar. Brown pigmentation and mucoid colonies were found on all media. The culture samples were also tested by the API 20C AUX (Biomerieux) which revealed an assimilation pattern of *C. neoformans*. Urease activity was observed on the Christensen's urea agar. A subculture of the isolate was tested for varieties on the CGB agar medium⁹. The variety of the isolate was *neoformans*.

The antifungal susceptibility testing performed by EUCAST, Cuenca-Estrella¹⁰ method indicated a sensible strain to amphotericin B (Minimal Inhibitory Concentration: MIC= 0.12µg/mL), fluconazole (2µg/mL) and itraconazole (0.06µg/mL).

DISCUSSION

The origin of atypical *C. neoformans* in our patient is unknown. Sometimes HIV patient present atypical yeast like cells and filaments. The purpose of this paper is to alert the mycologist for the importance of the China ink preparation to demonstrate capsule and showing diversity of morphology of *C. neoformans* presented in immunocompromised patients.

REFERENCES

1. Takeo K, Uesaka I, Uehira K, Nishiura M. Fine structure of *Cryptococcus neoformans* grown in vivo as observed by freeze-etching. *J Bacteriol* 1973; 113: 1449-54.
2. Mariat F. Saprophytic and parasitic morphology of pathogenic fungi. In: Smith H, Taylor J. *Microbial behavior "in vivo" and "in vitro"*. Cambridge University Press, Cambridge UK: 1964. p. 85-111.
3. Alasio TM, Lento PA, Bottone EJ. Giant blastoconidia of *Candida albicans*. *Arch Pathol Labor Med* 2003; 127: 868-71.
4. Bottone EJ, Horga M, Abrams J. Giant blastoconidia of *Candida albicans*: Morphologic presentation and concepts regarding their production. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1999; 34: 27-32.
5. Shadomy HJ, Lurie HI. Histopathological observations in experimental cryptococcosis caused by a hyphae producing strain of *Cryptococcus neoformans* (Coward stain) in mice. *Sabouraudia* 1971; 9: 6-9.
6. Cruickshank JG, Cavil R, Jelbert M. *Cryptococcus neoformans* of unusual morphology. *Appl Microbiol* 1973; 25: 309-12.
7. Love GL, Boyd G, Greer DL. Large *Cryptococcus neoformans* isolated from brain abscess. *J Clin Microbiol* 1985; 22: 1068-70.
8. Bottone EJ, Kirschner PA, Alkin I.F. Isolation of Highly encapsulated *Cryptococcus neoformans* serotype B from a patient in New York City. *J Clin Microbiol* 1986; 23: 186-8.
9. Kwon-Chung KJ, Polacheck I, Bennett JE. Improved diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotypes A and D) and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (serotypes B and C). *J Clin Microbiol* 1982; 15: 535-7.
10. Cuenca-Estrella M, Lee-Yang W, Ciblak MA, Arthington-Skaggs BA, Mellado E, Warnock DW, et al. Comparative Evaluation of NCCLS M27-A and EUCAST Broth Microdilution Procedures for Antifungal Susceptibility Testing of *Candida* Species. *J Antimicrob Chemother* 2002; 49: 981-7.

Variedades de *Cryptococcus neoformans* isoladas de pacientes com AIDS em hospital da cidade de São Paulo durante 1996-1999

Cryptococcus neoformans varieties isolated from patients with aids referred to a hospital of São Paulo city during 1996-1999

RIALA6/1109

Regina C. PASCHOAL*¹, Alvaro. M. NAKASHITA², Ana L. LIMA², Marilena A. MARTINS³, Wilma A. IULIANO², Mara C.S.M. PAPPALARDO²

*Endereço para correspondência: ¹ Instituto Adolfo Lutz, Laboratório I de Santos. Rua Silva Jardim, 90 – Santos-SP CEP - 11015-020

e-mail: rcpaschoal@ial.sp.gov.br

²Instituto de Infectologia Emílio Ribas. Av. Dr. Arnaldo, 165 – São Paulo-SP CEP – 01246-900

³Instituto Adolfo Lutz Central. Av. Dr. Arnaldo, 355 – São Paulo – SP CEP – 01246-902

Recebido: 20/06/2006 – Aceito para publicação: 25/04/2007

RESUMO

Cryptococcus neoformans é uma levedura capsulada que apresenta tropismo pelo sistema nervoso central causando meningoencefalite. É a micose mais freqüente em pacientes com AIDS, e é responsável pela alta morbidade e mortalidade. Há duas variedades: var. *neoformans* e var. *gattii*. *C. neoformans* var. *neoformans* está distribuído mundialmente e é comumente encontrado em fezes de aves, principalmente de pombo. *C. neoformans* var. *gattii* está geograficamente limitado a regiões tropicais e subtropicais e está associado a algumas espécies de árvores, principalmente, *Eucalyptus* sp. A proposta desse estudo foi de avaliar a prevalência das variedades de *Cryptococcus neoformans* isoladas de 452 amostras de líquido cefalorraquiano (LCR) provenientes de 183 pacientes com AIDS, internados no Instituto de Infectologia Emílio Ribas – São Paulo-SP, de 1996 a 1999, utilizando meio canavanina-glicina-azul de bromotimol (CGB). Do total 452 amostras, em 446 (98,7%) foram detectados *C. neoformans* var. *neoformans* e *C. neoformans* var. *gattii* em 6 (1,3 %) amostras.

Palavras-chave. *Cryptococcus neoformans*, variedades de *Cryptococcus neoformans*, Líquido Cefalorraquiano, AIDS.

ABSTRACT

Cryptococcus neoformans is an encapsulated yeast that presents tropism for central nervous system, and causes meningoencephalitis. Cryptococcosis is the most frequent mycosis in patients with AIDS, and it is the cause of high morbidity and mortality. *C. neoformans* presents two varieties var. *neoformans* and var. *gattii*. *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* has been world-wide isolated from avian feces, especially pigeon excreta. *C. neoformans* var. *gattii* is geographically restricted to tropical and subtropical regions, and it is associated with some trees species, mainly *Eucalyptus* sp. The proposal of this study was to evaluate the prevalence of *Cryptococcus neoformans* varieties isolated from 452 cerebrospinal fluid (CSF) samples from 183 patients with AIDS referred to the Instituto de Infectologia Emílio Ribas - Sao Paulo-SP, from 1996 to 1999. CSF samples were cultured on canavanine-glycine-bromothymol blue medium. Of 452 samples, *C. neoformans* var. *neoformans* was isolated in 446 (98.7%), and *C. neoformans* var. *gattii*. in 6 (1.3%) samples.

Key words. *Cryptococcus neoformans*, cerebrospinal fluid, varieties *Cryptococcus neoformans*, AIDS.

INTRODUCTION

Cryptococcus neoformans is an encapsulated yeast that presents tropism for the central nervous system and causes meningoencephalitis¹. Two varieties and five serotypes of *Cryptococcus neoformans* are recognized: var. *neoformans* (serotypes A, D, AD) and var. *gattii* (serotypes B e C)^{2,3}. The two varieties of *C. neoformans* were differentiating by using the canavanine-glycine-bromthymol blue agar (CGB) medium⁴ and the serotypes are characterize by slide agglutination tests^{5,6}.

In 1999, a third variety, *C. neoformans* var. *grubii*, was proposed for *C. neoformans* var. *neoformans* serotype A⁷.

Cryptococcus neoformans var. *neoformans* has been isolated worldwide from avian droppings, especially pigeon excreta and soil enriched with this avian excreta^{8,9,10,11}. The *C. neoformans* var. *gattii* is geographically restricted to mainly tropical and subtropical regions. The first isolation of this variety (*gattii*) was made in Australia were the investigators established its specific ecological association with *Eucalyptus camaldulensis*¹². In this country, the molecular studies indicated that exist epidemiological association between mammalian disease and exposure¹³. To date the var. *gattii* has been isolated from native trees in the Brazil (*Moquilea tomentosa*, *Cassia grandis*, *Guettarda acreana*) and in Colombia (*Terminala catappa*)^{14,15,16,17}.

In Brazil, 4.7% of acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) related infections are caused by *C. neoformans* var. *neoformans*¹⁸. Since then the HAART, after toxoplasmosis, cryptococcosis is the most prevalent neurological disease in AIDS patient and a frequent AIDS-defining condition^{19,20}.

C. neoformans var. *gattii* rarely is the agent of cryptococcosis in AIDS patient, even in areas where the infection by this variety occurs endemically, is associated with immunosuppressed patient^{1,9,21}. In the city of São Paulo both *C. neoformans* var. *neoformans* and *C. neoformans* var. *gattii* were presents in urban environment at sites where large numbers of people normally gather²².

Some studies carried through in the states of Rio de Janeiro and São Paulo had shown that the majority of the patients were infected by the *C. neoformans* var. *neoformans* (serotype A and D) and, a minority was infected by *C. neoformans* var. *gattii* (serotype B)^{21,23-30}.

The purpose of this study was to verify the prevalence of *C. neoformans* varieties in AIDS patients during a period of time in an Infectology Hospital in the city of São Paulo and knowledge more about the epidemiology of this pathogen in our city.

MATERIALS AND METHODS

We retrospectively analyzed 452 *C. neoformans* isolated of cerebrospinal fluid (CSF) samples from 183 patients with AIDS admitted at the Instituto de Infectologia Emilio Ribas, in São Paulo city, during 1996 to 1999.

The laboratory diagnosis of cryptococcal infection was based on positive India ink preparation and/or positive culture of CSF in Sabouraud dextrose agar.

The identification of the colonies of yeasts was based on cellular micro morphology and by API 20C AUX (BioMerieux, France), a commercial kit.

The identification was confirmed by standard physiological and biochemical methods that included thermo tolerance at 37°C, urease and phenoloxidase activity and assimilation tests³¹.

The varieties of *C. neoformans* were determined by using the canavanine-glycine-bromothymol blue (CGB) medium. The growth and the change of color of the medium identified the variety *gattii*^{2,4-31}.

RESULTS

The results shown that 446 CSF samples (98.7%) from 177 AIDS patients were *C. neoformans* var. *neoformans* and 6 CSF samples (1.3%) were *C. neoformans* var. *gattii*, during 1996 to 1999, at the Instituto de Infectologia Emílio Ribas, in São Paulo city.

DISCUSSION

Prior to the AIDS epidemic, cryptococcosis occurred sporadically throughout the world². Despite the incidence of cryptococcal infections has increased dramatically as a result of the AIDS epidemic, other conditions have been associated with an increased risk for *C. neoformans* infections like lymphoproliferative disorders, corticosteroid therapy and organ transplantation⁸.

Pigeon excreta are the saprophytic source most commonly associated with *C. neoformans* mainly var. *neoformans* so the high prevalence of pigeons in urban area favor the exposure of humans to this variety⁸.

C. neoformans var. *neoformans* is the variety overwhelmingly recovered from patients with AIDS in contrast with *C. neoformans* var. *gattii* infections that are rare in these patients^{8,21}.

Some studies indicated that the majority of infections in AIDS patients with cryptococcal meningoencephalitis are caused by *C. neoformans* var. *neoformans* and serotype A^{9,23-30,32}. Despite the serotypes of *C. neoformans* hasn't been determined; this study is in agreement with others in which the variety *neoformans* was the more prevalent than var. *gattii* in AIDS patients.

CONCLUSION

The variety *neoformans* was the most prevalent in CSF samples from AIDS patients in Instituto de Infectologia Emílio Ribas located in São Paulo city, during 1996 to 1999.

REFERENCES

1. Severo LC, Oliveira FM, Londero AT. Cryptococcosis due to *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in Brazilian patients with AIDS. Report of the three cases. *Rev Iberoam Micol* 1999; 16: 152-4.
2. Kwon-Chung KJ, Bennett JE. Cryptococcosis. In: Kwon-Chung KJ, Bennett JE. *Medical Mycology*. Lea & Febiger, Philadelphia PA, 1992. p.397-446.
3. Richardson MD, Warnock DW. Cryptococcosis. In: *Fungal Infection: Diagnosis and Management*. Blackwell Science, 2th edition, Oxford UK, 1998. p.149-59.
4. Kwon-Chung KJ, Polacheck I, Bennett JE. Improved diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotypes A and D) and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (serotypes B and C). *J Clin Microbiol* 1982; 15: 535-7.
5. Ikeda R, Shinoda T, Fukazawa Y, Kaufman L. Antigenic characterization of *Cryptococcus neoformans* serotypes and its application to serotyping of clinical isolates. *J Clin Microbiol* 1982; 16: 22-9.
6. Ikeda R, Nishikawa A, Shinoda T, Fukazawa Y. Chemical characterization of capsular polysaccharide from *Cryptococcus neoformans* serotype A-D. *Microbiol Immunol* 1985; 29: 981-91.
7. Franzot SP, Salkin IF, Casadevall A. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii*: separate varietals status for serotype A isolates. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 838-40.
8. Casadevall A, Perfect JR. *Cryptococcus neoformans*. American Society for Microbiology, Washington DC, 1998. 540p.
9. Mitchell TG, Perfect JR. *Cryptococcosis* in the era of AIDS-100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*. *Clin Microbiol Rev* 1995; 8: 515-48.
10. Sorrell TC, Ellis DH. Ecology of *Cryptococcus neoformans*. *Rev Iberoam Micol* 1997; 14: 42-3.
11. Machado CC, Amaral AA, Severo LC. *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* isolado do solo. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1993; 1: 77-9.
12. Ellis DH, Pfeiffer J. Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* variety *gattii*. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 1693-4.
13. Sorrell TC, Chen SC, Ruma P, Meyer W, Pfeiffer TJ, Ellis DH, Brownlee AG. Concordance of clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* by random amplification of polymorphic DNA analysis and PCR fingerprinting. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 1253-60.
14. Lazera MS, Cavalcanti MAS, Trilles L, Nishikawa MM, Wanke B. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* – evidence for a natural habitat related to decaying wood in a pottery tree hollow. *J Med Vet Mycol* 1998; 36: 119-22.
15. Lazera M, Cavalcanti MAS, Londero AT, Trilles L, Nishikawa MM, Wanke B. Possible primary ecological niche of *Cryptococcus neoformans*. *Med Mycol* 2000; 38: 379-83.
16. Fortes ST, Lazera MS, Nishikawa MM, Macedo RC, Wanke B. First isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from a native jungle tree in the Brazilian Amazon rainforest. *Mycoses* 2001; 44: 137-40.
17. Callejas A, Ordoñez N, Rodriguez MC, Castaneda E. First isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*, serotype C, from the environment in Colômbia. *Med Mycol* 1998; 36: 341-4.
18. Brasil. Ministério da Saúde. Programa Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis. *Bol Epidemiol AIDS*. Brasília/DF, 1999. p. 44.
19. Pappalardo MC, Melhem MS. Cryptococcosis: a review of the Brazilian experience for the disease. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 2003; 45: 299-305.
20. Silva MT, Araujo A. Highly active antiretroviral therapy access and neurological complications of human immunodeficiency virus infection: Impact versus resources in Brazil. *J Neurovirol* 2005; 11: 11-5.
21. Rozenbaum R, Gonçalves AJR. Clinical and epidemiological study of 171 cases of cryptococcosis. *Clin Inf Dis* 1994; 18: 369-80.
22. Montenegro H, Paula CR. Environmental isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* and *C. neoformans* var. *neoformans* in the city of São Paulo, Brazil. *Méd Mycol* 2000; 38: 385-90.
23. Lacaz CS, Rodrigues MC. Sorotipagem de *Cryptococcus neoformans*. *Rev Bras Med* 1983; 40: 297-300.
24. Rozenbaum R. Criptococose. Contribuição ao estudo da micose e de seu agente no Brasil. [Tese de Mestrado]. Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio de Janeiro-UFRJ, Rio de Janeiro, 1990.
25. Rozenbaum R, Gonçalves ARJ, Wanke B, Caiuby MJ, Clemente H, Lazera MS et al. *Cryptococcus neoformans* varieties as agent of cryptococcosis in Brazil. *Mycopathologia* 1992; 119: 133-6.
26. Morales BMC. Avaliação dos perfis de susceptibilidade a antifúngicos e cariotipagem eletroforética de isolados clínicos de *Cryptococcus neoformans*, do Brasil, Chile e Venezuela, segundo variedades e sorotipos. [Tese de doutorado]. Universidade Federal de São Paulo-UNIFESP, São Paulo, 1999.
27. Calvo BM, Colombo AL, Fischman O, Santiago A, Thompson L, Lazera MS et al. Antifungal susceptibilities, varieties, and electrophoretic karyotypes of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans* from Brazil, Chile, and Venezuela. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 2348-50.
28. Fernandes OFL, Costa TR, Costa MR, Soares AJ, Pereira AJSC, Silva MRR. *Cryptococcus neoformans* isolados de pacientes com AIDS. *Rev Soc Bras Med Trop* 2000; 33: 75-8.
29. Martins MA, Melhem MSC, Pukinskias SRBS, Cabrera MI, Soares MCB, Meira MCA et al. Variedades de cepas

- clínicas de *Cryptococcus neoformans* no Estado de São Paulo: dez anos de estudo multicêntrico. *Rev Inst Adolfo Lutz* 2003; 62 (Suppl 2): 12.
30. Nishikawa MM, Lazera MS, Barbosa GG, Trilles L, Balassiano BR, Macedo RCL et al. Serotyping of 467 *Cryptococcus neoformans* isolates from clinical and environmental sources in Brazil: analysis of host and regional patterns. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 73-7.
31. Kwon-Chung KJ. *Cryptococcus*. In: Kurtzman CP, Fell JW. *The yeasts: a taxonomic study*. Elsevier B.V. 4th edition, Amsterdam, 1998. p. 656-62.
32. Chen SCA, Brownlee AG, Sorrell TC, Ruma P, Nimmo G. Identification by random amplification of polymorphic DNA of a common molecular type of *Cryptococcus neoformans* var *neoformans* in patients with Aids or other immunosuppressive conditions. *J Infec Dis* 1996; 173: 754-8

Avaliação microbiológica de esponjas contendo agentes bactericidas usadas em cozinhas de unidades de alimentação e nutrição da região de Campinas/SP, Brasil

Microbial survey of sponges containing bactericide agents used in kitchens of food and nutrition units from Campinas region/SP, Brazil

RIALA6/1110

Silvana Mariana SREBERNICH^{1*}, Maria Magali Stelato Rocha SOARES², Sônia Maria Ferreira da SILVA¹, Thayane Carla Rodrigues Costa CAOBIANCO³.

*Endereço para correspondência: Faculdade de Nutrição, PUC-Campinas, Av. John Boyd Dunlop s/n°, Jardim Ipaussurama, CEP 13059-740, Campinas – SP - Brasil, E-mail: srebernich@uol.com.br.

¹Docente da Faculdade de Nutrição da PUC-Campinas

²Docente das Faculdades de Ciências Farmacêuticas e Ciências Biológicas da PUC-Campinas

³Nutricionista

Recebido: 26/01/2007 – Aceito para publicação: 23/04/2007

RESUMO

Em unidades de alimentação e nutrição são utilizadas esponjas e detergentes para a lavagem de equipamentos e utensílios. Contudo, se a higienização não for adequada corre-se o risco de haver contaminação cruzada. O objetivo desta pesquisa foi avaliar as condições higiênico-sanitárias de esponjas contendo agentes bactericidas, empregadas na lavagem dos equipamentos e utensílios das unidades. Analisou-se 48 esponjas, utilizando técnicas microbiológicas tradicionais e Método rápido, para a determinação de coliformes totais e *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, além de bolores e leveduras. Os resultados mostraram que todas as esponjas apresentavam contaminação por coliformes totais e *E. coli*, com variação de 10^5 a $>10^8$ UFC (unidades formadoras de colônias)/ml. Para os demais microrganismos a contaminação variou de 10^1 a 10^4 UFC/ml sendo esta maior no Método rápido que no método tradicional. A contaminação encontrada, neste estudo, demonstrou condições sanitárias inadequadas das esponjas, devido a falta de higiene dos manipuladores, restos de alimentos contaminados ou o não seguimento das normas de Boas Práticas de Fabricação pelos funcionários da Empresa, o que pode levar à um aumento no risco para o consumidor.

Palavras-chave. contaminação cruzada, esponjas, agentes bactericidas, contaminantes, equipamentos e utensílios.

ABSTRACT

Sponges and detergents are used for cleaning and washing equipments and utensils in industrial restaurant kitchens. However, if the hygienic action is not adequate there is the risk of having cross contamination. The aim of this research was to evaluate the sanitary-hygienic conditions of sponges containing bactericide, used for washing equipments and utensils in industrial restaurant kitchens. It was analyzed 48 sponges using traditional microbial techniques and rapid methods, for determining total coliforms and *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, besides molds and yeasts. The results showed that all the sponges presented contamination by total coliforms and *E. coli*, being the variation from 10^5 to $>10^8$ CFU (Colony Formation Unit)/ml. For the other microorganisms the contamination varied from 10^1 to 10^4 CFU/ml being this higher when using rapid methods than traditional methods. The contamination found in this study demonstrated inadequate sanitary conditions, due to the lack of hygienic practices of manipulators, left over of contaminated foods or the absence of Good Manufacturing Practices by the Company employees increase the risk for the consumers.

Key words. cross contamination, sponges, bactericide agents, contaminants, kitchen equipment and utensils.

INTRODUÇÃO

Por um longo período, o homem se alimentou somente com os recursos da natureza. Os indivíduos passaram a plantar, criar animais e produzir seu próprio alimento, começando, assim, a surgir os problemas relacionados a doenças transmitidas pela manipulação. O ser humano tomou conhecimento da existência de microrganismos e de sua importância para os alimentos de forma bastante lenta. Sabe-se, também, que os alimentos se constituem em um excelente meio de cultura para um grande número de microrganismos, uma vez que possuem todos os substratos necessários, como proteínas, hidratos de carbono e sais minerais, para seu crescimento e proliferação¹.

Dentre as exigências do mundo contemporâneo, encontra-se a necessidade de haver empresas produtoras de alimentos que ofereçam produto seguro a seus consumidores. Os Serviços de Alimentação Coletiva (produtores de grande número de refeições de consumo direto) têm aumentado em todo o mundo, inclusive no Brasil². Segundo dados da Associação Brasileira das Empresas de Refeições Coletivas (ABERC)³, no Brasil, os Serviços de Alimentação vêm crescendo cerca de 20% ao ano e estima-se que hoje aproximadamente 4,7 milhões de refeições são produzidas diariamente em cozinhas industriais atendendo cerca de 28% da população economicamente ativa.

Com o crescimento desses serviços, os alimentos ficaram mais expostos a uma série de oportunidades de contaminação⁴, que pode ter origem física (terra, areia, metal, entre outros) química (agrotóxicos, álcool etc.), biológica (moscas, lesmas, baratas, roedores, entre outros) e microbiológica (fungos, bactérias e vírus)⁵. Dentro de uma Unidade de Alimentação e Nutrição existem regras e deveres a serem cumpridos, a fim de que a refeição atenda a qualidade esperada. Contudo, existem irregularidades, descuidos, desconhecimentos e, até mesmo, acidentes que podem tornar determinado alimento contaminado. Por sua vez, Deschamps et al.⁶ afirma que às Unidades de Alimentação e Nutrição, associam-se a maioria das doenças veiculadas por alimentos. Dentre as causas mais comuns estão a limpeza inadequada de equipamentos e utensílios, a higiene pessoal deficiente, as contaminações cruzadas e a má utilização da temperatura no preparo e conservação dos alimentos⁷.

Por sua vez, durante o processo de limpeza de equipamentos e utensílios (facas, tábuas de cortar, tigelas, panelas, cubas, entre outros), as etapas de pré-lavagem e lavagem são feitas com auxílio de esponjas visando à eliminação de resíduos dos alimentos. Como consequência deste processo, parte dos resíduos fica aderida à superfície das esponjas e juntamente com a água, nelas retidas, podem transformá-las em um ótimo meio de cultura, favorecendo o desenvolvimento de microrganismos. Deste modo, as esponjas podem servir de reservatório e veículo de transmissão de microrganismos patogênicos, o que pode provocar contaminação cruzada dos alimentos e colocar em risco a saúde do consumidor. Visando

solucionar este problema a indústria fornece atualmente esponjas já contendo um agente bactericida. Assim, este trabalho teve por objetivo verificar a eficiência bactericida dessas esponjas em presença de detergentes convencionais através de análises microbiológicas.

MATERIAL E MÉTODOS

Seis Unidades de Alimentação e Nutrição participaram da pesquisa em esquema de rodízio para que houvesse utilização das esponjas em quatro períodos diferentes, sendo analisadas 48 esponjas.

Para este estudo, em cada período foram utilizadas duas esponjas de poliuretano e fibra sintética contendo agentes bactericidas, as quais foram colocadas em sacos plásticos estéreis e transportadas à temperatura ambiente para as Unidades de Alimentação e Nutrição (UAN's). Estas esponjas (duas por empresa) foram empregadas na lavagem de utensílios, utilizando detergente convencional por três dias consecutivos. Os manipuladores foram orientados para que usassem as esponjas da mesma forma que utilizavam em sua rotina normal de trabalho.

Após esse período, coletaram-se as esponjas em seus devidos sacos plásticos estéreis e, em seguida, estes foram transportados até o laboratório de microbiologia (Campus II, PUC-Campinas) sob refrigeração, sendo processadas no mesmo dia (máximo de quatro horas). No laboratório, adicionou-se às esponjas água salina peptonada esterilizada a 0,1% (na base de 0,1ml/cm² de superfície externa da esponja). Posteriormente, estas foram comprimidas manualmente com o auxílio de uma bagueta estéril para a retirada do líquido remanescente, o qual se constituiu na amostra a ser analisada⁸.

Na análise microbiológica foram realizadas diluições decimais de 10⁻¹ a 10⁻⁸ desse líquido, sendo posteriormente utilizado para contagem e identificação de coliformes totais com diferenciação para *E. coli*, *S. aureus*, bolores e leveduras pelo método microbiológico tradicional⁹, realizando-se testes bioquímicos, teste de coagulase, provas micromorfológicas e fisiológicas, respectivamente; e pelo método rápido PETRIFILM 6410, 6423 e 6407 da 3M do Brasil.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Apesar de não existirem padrões microbiológicos (nacionais e internacionais) para esponjas, pode-se afirmar que ocorreu uma contaminação elevada de coliformes totais e *E. coli* independente da Empresa analisada, com contagens que variaram de 10⁵ a >10⁸ UFC/ml (Tabela 1). Comparando-se esses resultados com os limites máximos estabelecidos pela RDC 12 de 2001¹⁰ para alimentos prontos para consumo, a qual é até 10² para coliformes a 45°C/g verificou-se que as esponjas apresentavam para *E. coli* contaminação bem acima desse valor.

Tabela 1. Avaliação microbiológica de esponjas contendo agente bactericida após três dias de uso em Unidades de Alimentação e Nutrição.

Microrganismos	Contaminação microbiana das esponjas nas Empresas (UFC/ml***)					
	A	B	C	D	E	F
<i>C. totais</i> **	6,5x10 ⁵ a 1,6x10 ⁸	>10 ⁵ a >10 ⁷	>10 ⁵ a >10 ⁸	2,9x10 ⁷ a >10 ⁸	3,2x10 ⁶ a >10 ⁸	2,0x10 ⁵ a >10 ⁸
<i>E. coli</i> **	6,0x10 ⁵ a 3,0x10 ⁷	>10 ⁵ a >10 ⁷	5,0x10 ⁶ a >10 ⁸	3,0x10 ⁶ a >10 ⁸	3,0x10 ⁵ a >10 ⁸	2,0x10 ⁵ a >10 ⁸
Bolores*	1,0x10 ³ a 2,0x10 ³	1,0x10 ²	1,0x10 ²	Ausente	1,0x10 a 2,0x10 ²	3,0x10 a 2,0x10 ²
Bolores**	2,0x10 ³ a 1,6x10 ⁴	2,0x10 ² a 3,1x10 ³	1,5x10 a 4,0x10 ²	Ausente	4,0 x 10	6,0x10 a 3,4x10 ³
Leveduras*	6,0x10 ³ a 8,2x10 ⁴	1,2x10 ²	Ausente	Ausente	3,3x10 a 7,4x10 ³	5,0x10 a 1,5x10 ³
Leveduras**	3,5x10 ³	1,6x10 ³ a 3,2x10 ⁴	2,5x10	Ausente	8,5 x 10 ²	1,0x10 ² a 2,3x10 ⁴
<i>S. aureus</i> *	2,6x10 ² a 5,3x10 ²	2,0x10 a 5,1x10 ²	1,8x10 ² a 5,3x10 ³	1,0x10 a 4,9x10 ³	2,0x10 a 6,5x10 ³	1,2x10 ² a 7,5x10 ³
<i>S. aureus</i> **	2,3x10 ² a 1,7x10 ⁴	2,4x10 ² a 4,0x10 ³	1,0x10 a 1,5x10 ³	2,2x10 ² a 2,7x10 ³	3,6x10 ² a 8,4x10 ⁴	2,2x10 ² a 7,8x10 ³

*método tradicional; **método PETRIFILM; ***Unidades Formadoras de Colônias/mililitro.

Em trabalho anterior realizado com esponjas de cozinhas industriais em dois períodos diferentes e utilizando-se somente a técnica tradicional, também foi verificada uma contaminação alta por coliformes totais e fecais¹¹, no entanto, não foi pesquisada *E. coli*, a qual além de ser ótimo bio-indicador de higiene de alimentos, também possui cepas patogênicas que podem causar desde gastroenterites até síndrome urêmica hemolítica⁵.

Enriquez et al.⁸ em pesquisa com esponjas de cozinhas domésticas de quatro cidades do USA, utilizando técnica de contagem em meios de cultura tradicionais, encontraram 1,15x10⁵ e 4,46x10² UFC/ml de coliformes totais e fecais, respectivamente, sendo relativamente mais baixas do que as encontradas no presente estudo, podendo-se constatar que ocorre maior contaminação em esponjas de cozinhas de UANs do que nas domésticas.

Curtis et al.¹² avaliaram microbiologicamente amostras de equipamentos, utensílios, superfícies e ambientes, tendo como resultado alto índice de contaminação por *Escherichia coli*, diagnosticando higienização inadequada, o que pode aumentar a probabilidade de transmissão de patógenos para os alimentos. Outra pesquisa, realizada por Gonçalves et al.¹³ em equipamentos, utensílios e manipuladores de creches do Município de Recife-PE, também demonstrou níveis fora dos padrões permitidos para bactérias de origem fecal.

André et al.¹⁴ em estudo realizado em frigoríficos/matadouros de Goiânia, ressaltaram que 73,1% dos equipamentos que entraram em contato com a carne bovina, durante o abate, estavam contaminados por coliformes de acordo com a seguinte distribuição: 80% das bandejas de aço inoxidável, 78,6% das mesas e 57,1% das serras. Essas pesquisas reforçam a probabilidade de ocorrer contaminação das esponjas utilizadas para a lavagem e higienização dos utensílios e, até mesmo, de superfícies e ambientes.

Srebernich et al.¹¹ encontraram contaminação por *S. aureus* em esponjas de uma cozinha industrial analisada enquanto que Enriquez et al.⁸ verificaram que 20% das esponjas

de cozinhas domésticas estavam contaminadas com essa bactéria. No presente estudo foi encontrada contaminação elevada (1,0x10 a 8,4x10⁴) por *S. aureus* nas esponjas analisadas, observando-se pequena diferença nos resultados, sendo esta maior quando se utilizou o método PETRIFILM (nas empresas A, B e C). Entretanto, essa bactéria, não foi encontrada em duas esponjas da Empresa A (na mesma etapa), em quatro da B (em duas etapas seguidas) e em duas da C (na mesma etapa). Comparando-se esses resultados com os limites máximos estabelecidos pela RDC 12 de 2001¹⁰ para alimentos prontos para consumo, a qual é até 10³ para estafilococos coagulase positivo/g, verificou-se que pelo método tradicional 66,7% das esponjas das empresas apresentaram valores de contaminação acima do permitido, enquanto que para o método rápido Petrifilm todas se apresentaram fora do limite estabelecido pela RDC n° 12. Esse microrganismo pode ser oriundo de cavidade nasal, mãos contaminadas ou feridas etc., podendo se atribuir a sua presença aos maus hábitos de higiene dos funcionários^{2,5,14}.

Segundo dados da OMS o microrganismo responsável por maior número de surtos de toxinfecção alimentar é o *S. aureus*¹⁴. Deste modo, é de fundamental importância que os funcionários das UAN's sejam treinados para realizar suas tarefas observando as práticas higiênico-sanitárias de maneira adequada. Estudo realizado por Miranda et al.¹⁵ analisando mãos de manipuladores detectou a presença de *S. aureus* em 54% dos casos (13 de 24 mãos analisadas).

Quanto a bolores nas esponjas, praticamente não houve diferença em função dos métodos utilizados, detectando-se somente maior contagem em PETRIFILM nas Empresas A e B (Tabela 1). A Empresa D não apresentou contaminação por bolores. Mesmo levando-se em consideração essas diferenças, a contaminação por bolores foi detectada, sendo considerada preocupante, pois fungos filamentosos além de deteriorarem alimentos são produtores de micotoxinas, que têm ação cancerígena, mutagênica, hepatotóxica, além de nefro e

neurotóxica⁵. Quanto a leveduras obtiveram-se diferenças significativas entre o método tradicional e o PETRIFILM. Deste modo, nas Empresas A e E notou-se menor contagem no PETRIFILM. No entanto, as leveduras são apenas deteriorantes de alimentos e não potencialmente patogênicas, quando adquiridas por ingestão⁵.

Em estudo anterior¹¹ também foi encontrada contaminação por bolores e leveduras em todas as esponjas analisadas, entretanto, não foi realizada contagem diferencial entre esses microrganismos.

A contaminação encontrada nas esponjas da presente pesquisa pode ter sido oriunda da falta de higiene dos manipuladores, de restos de comida contaminados ou, até mesmo, o não seguimento das normas de Boas Práticas de Fabricação pelos funcionários.

CONCLUSÃO

As esponjas utilizadas nas UAN's apresentaram alta contaminação, principalmente por coliformes totais e *E. coli*, demonstrando a ineficiência do agente bactericida, como também a falta de higiene das empresas analisadas. Cabe às UAN's adequar-se às técnicas mais específicas voltadas ao controle higiênico-sanitário das esponjas utilizadas nos seus setores. Entretanto, devido à falta de pesquisas sobre o tema, torna-se necessário mais estudos voltados ao uso de esponjas relacionado a vários aspectos, tais como o tempo de uso da mesma ou quantidade de utensílios higienizados etc., a fim de validar uma sistemática que atenda a padrões de qualidade sanitária de higiene de esponjas utilizadas em UAN's.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Priscila Garcia Justo Duarte pelo auxílio prestado em técnicas realizadas e à PUC-Campinas pelo apoio financeiro dado ao projeto e pela bolsa de iniciação científica do quarto autor.

REFERÊNCIAS

1. Nunes IFS, Ferreira GP, Albuquerque WF. Perfil microbiológico dos microrganismos causadores de DTA's em restaurantes self-services na cidade de Teresina-PI. *Hig Aliment* 2002; 16(102/103):59-62.
2. Almeida RCC, Almeida PF, Kuaye AY. Pontos Críticos em Serviços de Alimentação. *Hig Aliment* 1994; 8 (30):17-20.
3. Associação Brasileira das Empresas de Refeições Coletivas – ABERC. Mercado real de refeições servidas. [acesso em julho de 2002]. Disponível em: <http://www.aberc.com.br>.
4. Almeida RCC, Kuaye AY, Serrano AM, Almeida PF. Avaliação e controle da qualidade microbiológica de mãos de manipuladores de alimentos. *Rev Saúde Pública* 1995; 29 (4):290-4.
5. Franco DBG, Landgraf M, editores. *Microbiologia dos Alimentos*. São Paulo: Atheneu; 2000.
6. Deschamps C, Freygang J, Bramarski, A, Tommasi, D, Garcia GF. Avaliação higiênico-sanitária de cozinhas industriais instaladas no município de Blumenau, SC. *Hig Aliment* 2003; 17 (112):12-5.
7. Tommasi D, editor. *Manual de boas práticas de produção e serviços na área de alimentos*. São Paulo: CIPS; 2002.
8. Enriquez CE, Enriquez-Gordillo R, Kennedy DI, Gerba CP. Bacteriological survey of used cellulose sponges and cotton dishcloths from domestic kitchens. *Dairy, Food Environ Sanit* 1997; 17(1): 20-4.
9. Downes, F P, Ito K, editors. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods* 4th ed. Washington: American Public Health Association; 2001.
10. Brasil. Resolução nº 12, de Jan. 2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Dispõe sobre o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos [acesso 7 abr. 2006]. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br>.
11. Srebernick, SM, Balioni GA, Santos TBA, Soares MMSR, Silva, SMF. Avaliação microbiológica de esponjas comerciais utilizadas em cozinhas industriais na cidade de Campinas, SP. *Hig Aliment* 2005; 19 (102): 75-8.
12. Curtis ML, Franceschi, Castro N. Determinación de la calidad microbiológica de alimentos servidos em comedores de empresas privadas. *Arch Latinoam Nutr* 2000; 50 (2):177-82.
13. Gonçalves MO, Oliveira AM, Cruz YS, Stamford TLM. Manipuladores de alimentos, equipamentos e utensílios como fatores de risco em cozinhas de creches no município de Recife-PE. *Nutrição Brasil* 2003; 2:211-7.
14. André MCDPB, Serafini AB, Vieira JDG, Correa MHS, Campos MRH. Avaliação microbiológica dos equipamentos que entram em contato com carne bovina durante o abate em matadouros frigoríficos de Goiânia-GO. *Rev Patol Tropical* 1999; 28 (2): 202-10.
15. Miranda LK, Damasceno KSFSC, Cardonha MAS. Panos de prato e mãos de manipuladores: Avaliação das condições higiênico-sanitárias. *Hig Aliment* 2002; 16(102/103): 51-62.

ISSN 0073-9855



9 770073 985009