

# REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ

ISSN 0073-9855  
RIALA6



Volume 65 número 3, 2006



GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO  
SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE



GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO  
SECRETARIA DE ESTADO DE 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 65 número 3, 2006**

**ISSN 0073-9855**

**Setembro – Dezembro – 2006**

---

# INSTITUTO ADOLFO LUTZ

---

## Diretor Responsável

Carlos Adalberto de Camargo Sannazzaro  
Diretor Geral do Instituto Adolfo Lutz

## Corpo Editorial

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

## Setor de Publicações

Rocely Aparecida de Souza Bueno

---



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

1941-2005,  
2006, 65 (3)

ISSN 0073-9855  
RIALA 6

CDD<sub>18</sub> 614.07205

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

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

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

Endereço/Address  
Biblioteca do Instituto Adolfo Lutz

---

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

#### 1. Missão da Revista do Instituto Adolfo Lutz

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 disquete 3 ½ 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. Todo o processo de avaliação é realizado em sigilo. 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 e/ou animais deverão atender as normas oficiais vigentes (Resolução nº196 do CNS, Lei Federal 6638/79 e Resolução Normativa 04/97) e 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 interesses, 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. Categorias

Os seguintes tipos de trabalhos serão aceitos para publicação na RIAL.

##### 6.1. Artigo original

Relato completo de pesquisa original ainda não publicada. Deve apresentar no máximo vinte páginas im, ressas, incluindo figuras, tabelas e referências.

##### 6.2. 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.

##### 6.3. 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.

##### 6.4. 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 anatômicos 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.

##### 6.5. 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.

##### 6.6. 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.

##### 7. Preparação do manuscrito ou artigo

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

**Referências:** as referências devem ser citadas seguindo os "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" produzidos pelo International Committee of Medical Journal Editors, também conhecidos como Vancouver Style. Os autores devem seguir as diretrizes da quinta edição (Annals of Internal Medicine 1997; 126: 36-47 ou na página (website) <http://acponline.org/journals/resource/unifreqr/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 parêntesis “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 AL. Molecular mechanisms of cocaine addiction. N Engl J Med. No prelo 1996.

#### Livros e outras monografias

##### Indivíduo como autor

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

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

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

##### Instituição como autor e editor

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

##### Capítulo num livro

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

##### Resumo/Trabalho de congresso publicado

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

##### Dissertação/Tese

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

##### Material legal

Quanto à legislação, a for na 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, desenhos, mapas 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. Se as ilustrações enviadas já tiverem sido publicadas, mencionar a fonte e a permissão para a reprodução.

#### Da Publicação

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

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

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

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

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

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

#### Da Distribuição

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

SUMÁRIO/CONTENTS

Artigos de Revisão/Review Articles

- 1081 **Potencialidades da terapia com células-tronco na regeneração hepática.**  
Potentialities of stem cell therapy in hepatic regeneration.  
Ana Caroline BRAUN e Patricia PRANKE ..... 146-156
- 1082 **Transdução de sinal: um olhar sobre a insulina.**  
Signal transduction: an overview on insulin.  
Adriana LUCHS ..... 157-164

Artigos Originais/ Original Articles

- 1083 **Influência da irradiação gama na destruição de fumonisina B<sub>1</sub> em farinha de milho e de aflatoxina M<sub>1</sub> em leite fluido e em pó.**  
Gamma-irradiation effect on fumonisin B<sub>1</sub> inactivation in corn flour and on aflatoxin M<sub>1</sub> in fluid and powdered milk.  
Guilherme PRADO, Alexandre S. LEAL, Marize S. OLIVEIRA, Vanessa D. MORAES, Jovita E. C. M. GAZZINELLI, Ionara F. R. VIEIRA, Adriana S. LIMA, Ana Paula A. MOREIRA, Mabel A. CALDEIRA ..... 165-170
- 1084 **Ochratoxin A in raisins marketed in São Paulo, Brazil.**  
Ocratoxina A em amostras de uva passa comercializadas em São Paulo, Brasil.  
Adriana Palma de ALMEIDA, Janete ALABURDA, Valter RUVIERI, Myrna SABINO ..... 171-175
- 1085 **Deteção de glúten em alimentos por meio de ELISA.**  
Detection of gluten in foods by means of ELISA.  
Rejane W. de ABREU, Sônia F. C. BARBOSA, Jussara C. de M. DELLA TORRE, Jaim LICHTIG, Odair ZENEBON ..... 176-180
- 1086 **Avaliação dos teores de ferro em farinhas de trigo fortificadas, São Paulo, Brasil.**  
Evaluation of iron content in fortified wheat flour, São Paulo, Brazil.  
Carmen S. KIRA, Márcia L. BUZZO, Maria de Fátima H. CARVALHO, Maria Cristina DURAN, Alice M. SAKUMA ..... 181-185
- 1087 **Composição centesimal e mineral de diferentes formulações de multimisturas provenientes da região central do Rio Grande do Sul.**  
Centesimal and mineral composition of multimixtures derived from central region of Rio Grande do Sul – Brazil.  
Tiago André KAMINSKI, Leila Picolli da SILVA, Milena BAGETTI ..... 186-193
- 1088 **Avaliação do leite *in natura* comercializado clandestinamente no município de Morrinhos, GO.**  
Avaliation of *in natura* milk commercialized without due authorization in Morrinhos city, GO.  
Rosângela C. QUINTANA, Lílian C. CARNEIRO ..... 194-198

- 1089 **Efeito da adição de *Streptococcus thermophilus* como cultura adjunta na maturação e caracterização físico-química e sensorial de queijo Prato.**  
Effect of the addition of *Streptococcus thermophilus* as adjunct culture on ripening and physicochemical and sensory characterization of Prato cheese.  
Claudia R. B. SILVA, Aline Cristina NABUCO, Bruna R. MORETTI, Ana Lúcia Barretto PENNA ..... 199-203
- 1090 **Avaliação das condições higiênico-sanitárias de cominho e pimenta do reino em pó comercializados em cidades do Estado de São Paulo, Brasil, mediante a presença de matérias estranhas.**  
Evaluation of ground pepper and cumin sold in retail market of São Paulo State, Brazil, based on the presence of extraneous materials.  
Rejane Alexandre S. GRACIANO; Márcia Bittar ATUI; Márcia N. DIMOV ..... 204-208
- 1091 **Avaliação da atividade antimicrobiana de preparações de própolis comercializadas na cidade de São Paulo.**  
Antimicrobial activity evaluation of propolis products for sale in São Paulo city.  
Mariangela T. AURICCHIO, Adriana BUGNO, Adriana Ap. Buzzo ALMODÓVAR, Tatiana C. PEREIRA ..... 209-212
- 1092 **Alterações histológicas no coração de ratos expostos a compostos organofosforados por tempo prolongado.**  
Heart histological changes in rats long-term exposed to organophosphate .  
Edenilson Eduardo CALORE; Emerson NARCISO ..... 213-216
- 1093 **Avaliação dos exames laboratoriais para o diagnóstico das meningites infecciosas no estado de Sergipe, durante o período de 1997 a 2003.**  
Assessment of the laboratorial examinations for diagnosing infectious meningitis performed in the Sergipe state, during the period from 1997 to 2003.  
Antonio M. Barbosa Junior, Dângelly L. F. M. de Mélo, Patrícia O. Santos, Maria de F. Travália, Rita de C. Trindade ..... 217-221

#### Comunicação Científica/Brief Communication

- 1694 **Cabine de segurança biológica: efeito da luz ultravioleta nas micobactérias.**  
Biological safety cabinet: ultraviolet radiation effect on mycobacteria.  
Suely Y. M. UEKI; Ana Livia GEREMIAS; Letícia Lisboa MÔNIZ; Fábio O. LATRILHA; Artemir C. de BRITO; Carmen Maria Saraiva GIAMPAGLIA; Fernanda Cristina dos Santos SIMEÃO; Maria Alice Silva TELLES ..... 222-224

#### RESUMOS DE TESES E DISSERTAÇÕES

- Frequência de anticorpos de *Leishmania* sp em *Rattus norvegicus* no município de Belo Horizonte, Minas Gerais.**  
Frequency of *Leishmania* sp antibodies in *Rattus norvegicus* in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.  
Neiva, H. M ..... 225
- Determinação de isoflavonas em formulações farmacêuticas.**  
Determination of isoflavones in pharmaceutical formulations.  
Yano, H. M ..... 226
- Interaction between poly (ethyleneglycol) and dioctadecyldimethylammonium and didodecyldimethylammonium bromide in aqueous solution.**  
Interação de poli(etileno glicol) com brometo de dioctadecildimetilamônio e didodecildimetilamônio em dispersões aquosas  
Santos, C.C.M ..... 227
- Performance of quality control strategies in cytopathological diagnosis in a reference laboratory.**  
Desempenho das Estratégias de Controle de Qualidade em Diagnóstico Citopatológico em Laboratório de Referência.  
Utagawa M.L ..... 228
- Colaboradores** ..... 229-231

# Potencialidades da terapia com células-tronco na regeneração hepática

## Potentialities of stem cell therapy in hepatic regeneration

RIALA6/1081

Ana Caroline BRAUN<sup>1</sup> e Patricia PRANKE<sup>1,2\*</sup>

\*Endereço para correspondência: Laboratório de Hematologia, Faculdade de Farmácia, UFRGS  
Av. Ipiranga n.2752 Porto Alegre, RS, Brasil, CEP: 90160-000, Tel. +55 51 3308-5275/5257 Fax.+55 51 3308-5437. E-mail: patriciapranke@ufrgs.br

<sup>1</sup> Faculdade de Farmácia, PUC-RS, Porto Alegre, Brasil.

<sup>2</sup> Faculdade de Farmácia e Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas, Faculdade de Medicina, UFRGS, Porto Alegre, Brasil.

Recebido: 01/02/2005 – Aceito para publicação: 06/04/2006

### RESUMO

As células-tronco são capazes de dar origem a diferentes tecidos e órgãos. Muitos artigos e experimentos científicos têm sido realizados com o intuito de conhecer melhor os mecanismos pelos quais essas células agem para regenerar os tecidos danificados e na atividade terapêutica de doenças incuráveis. O fígado possui uma notável capacidade de auto-reparo. As células hepáticas envolvidas na regeneração do fígado expressam os muitos dos marcadores presentes nas células-tronco hematopoéticas. Além disso, já foi demonstrado que as células da medula óssea podem originar células do epitélio hepático. Neste contexto, pode-se sugerir que as células-tronco desempenham um papel de suma importância no reparo das células hepáticas lesadas.

**Palavras-chave.** células-tronco, hepatócitos, fígado.

### ABSTRACT

Stem cells are capable to originate several and diverse tissues and organs. A considerable number of papers and trials have been performed improve the understanding on the mechanisms by which these cells operate to regenerate damaged tissues and to treat incurable diseases. The liver has a remarkable ability for self-restoration. Hepatic cells involved in liver regeneration express many of the markers as hematopoietic stem cells. Moreover, it has been shown that bone marrow cells can originate cells from hepatic epithelium. Therefore, it is conceivable to suggest that stem cells have an important role in restoring liver injuries.

**Key words.** stem cells, hepatocytes, liver.

### SUMÁRIO

Introdução .....	147
Células-tronco: fatos e promessas .....	148
O fígado e sua regeneração .....	149
Células-tronco e o fígado .....	150
Hepatócitos .....	150
Células ovais hepáticas .....	150
Células da medula óssea .....	151
Células multipotentes progenitoras adultas e células-tronco mesenquimais .....	152
O sangue de cordão umbilical como fonte de células para doenças hepáticas .....	152
Mecanismos de regeneração hepáticas através das células-tronco .....	152
Fusão ou diferenciação? .....	153
Estudo com células-tronco em doenças hepáticas no Brasil .....	153

Conclusões .....	154
Referências .....	154

## INTRODUÇÃO

O estudo das células-tronco é uma das áreas mais fascinantes da biologia, atualmente<sup>1</sup>. Essas células potentes são o foco das últimas pesquisas na esperança de cura de doenças degenerativas e uma das chaves do misterioso desenvolvimento humano<sup>2</sup>. Os estudos nesta área estão constantemente trazendo novas descobertas sobre as fantásticas habilidades dessas células quando transplantadas em camundongos ou ratos, na capacidade dessas células de regenerar órgãos, formar vasos sanguíneos, ossos e repararem danos espinhais e cerebrais<sup>3</sup>.

Até pouco tempo atrás, pensava-se que a formação e a regeneração de órgãos nos adultos só ocorressem através da ação células-tronco órgãos específicas. Desse modo, células-tronco hematopoéticas, por exemplo, produziram apenas células sanguíneas e células-tronco neurais produziram apenas células do sistema nervoso central. Entretanto existem trabalhos recentes que amplificam esta idéia e, atualmente, têm sido mostrado que as células-tronco de um sistema, por exemplo o sistema hematopoético, podem se desenvolver em células diferenciadas dentro de outro sistema, tal como o fígado, cérebro ou rim. Essa plasticidade, a capacidade da célula-tronco de originar diferentes tipos celulares<sup>1</sup>, não é observada apenas em ensaios laboratoriais, mas também tem sido mostrada em humanos após transplantes de órgãos e medula óssea<sup>4</sup>.

As células-tronco têm algumas características importantes que as distinguem dos outros tipos de células: a primeira refere-se ao fato de que são células não-especializadas, ou diferenciadas, que se renovam por longos períodos através de divisão celular; a segunda é que, sob certas circunstâncias fisiológicas e experimentais, elas podem ser induzidas à diferenciação em células com funções especiais, como células produtoras de insulina do pâncreas<sup>1</sup>. Em outras palavras, a célula-tronco possui a capacidade de ser clonogênica<sup>5</sup>.

Os cientistas trabalham com dois tipos de células-tronco de animais e de humanos: células-tronco embrionárias e células-tronco adultas. As células-tronco embrionárias humanas foram isoladas pela primeira vez em 1994<sup>6</sup>.

As células-tronco podem ser classificadas em totipotentes, pluripotentes e multipotentes. Totipotentes são as células com capacidade de originar todos os tipos células do organismo, inclusive os anexos embrionários<sup>7</sup>. Essas células correspondem às células do embrião ou blastocisto até o terceiro dia após a fecundação.

As células-tronco chamadas pluripotentes, são células capazes de formar todos os tipos celulares do organismo das três camadas germinativas, ectoderma, mesoderma e endoderma<sup>7</sup>, mas não as células dos anexos embrionários. Essas

células são aquelas presentes na parte interna do blastocisto, o qual corresponde às células entre o quarto e quinto dias após a fecundação, mas antes ainda da implantação no útero, que ocorre a partir do sexto dia<sup>8,9</sup>. O blastocisto, cujo estágio precede a fase denominada gástrula, é formado por aproximadamente 150 células-tronco embrionárias, as quais são células indiferenciadas<sup>9</sup> e especializadas. Devido ao fato do blastocisto, quando implantado no útero, ser capaz de formar o organismo humano, as células-tronco neste estágio têm a capacidade de originar os mais de 200 tipos celulares diferentes que compreende o corpo humano. Entre esses, neurônios, células musculares (miócitos), células epiteliais, células sanguíneas, células ósseas (osteócitos), cartilagem (condrócitos), células pancreáticas e outras<sup>2,7</sup>.

As células-tronco multipotentes, por sua vez, são as células com a capacidade de plasticidade mais limitada. Ou seja, células capazes de originar diferentes tipos celulares, porém, geralmente, mais limitado ao tipo de tecido nos quais residem.

A célula-tronco adulta é a célula encontrada junto a outras células diferenciadas em um tecido ou órgão e que pode se regenerar e se diferenciar em células especializadas desses tecidos. As células-tronco adultas, normalmente regeneram o tecido onde estão localizadas<sup>1</sup>.

Por isso, até pouco tempo atrás, acreditava-se que as células-tronco adultas eram células-tronco multipotentes ou unipotentes, essas últimas, que originam apenas uma linhagem celular<sup>7</sup>. Entretanto, vários experimentos mostraram a maior plasticidade de alguns tipos de células-tronco adultas<sup>1</sup>. Entre essas estão as chamadas células-tronco mesenquimais e as MAPCs (*Multipotent Adult Progenitor Cells* - Células Multipotentes Progenitoras Adultas). Essas células podem ser encontradas na medula óssea, cordão umbilical entre outros tecidos.

As células-tronco embrionárias são as células encontradas no blastocisto, e são chamadas de células pluripotentes. As células-tronco adultas podem ser isoladas do fígado, pâncreas, rins, sistema nervoso, entre outros órgãos, cada uma com um potencial regenerativo variado<sup>2</sup>. Através de transplantes, foi demonstrado que as células-tronco da medula óssea são capazes de regenerar o fígado e de se diferenciarem em hepatócitos maduros<sup>10,11</sup>. Embora existam células-tronco adultas em inúmeros órgãos e tecidos, as células-tronco adultas mais comumente utilizadas na pesquisa e na terapia celular são as células da medula óssea, do sangue periférico e do sangue de cordão umbilical, devido a maior facilidade na obtenção desse material biológico.

Em relação ao fígado, a regeneração deste órgão, depois de perder tecido hepático, é um parâmetro fundamental da

resposta do fígado a uma lesão. Os gregos ancestrais já se referiam à capacidade de regeneração do fígado com o mito de Prometheus. Segundo a mitologia grega, Prometheus pertencia à raça de Titans que habitava a Terra antes da criação da raça humana. Por ter roubado o fogo secreto de Zeus, o Deus do Olimpos, como punição foi preso a uma rocha no Monte Caucasus e condenado a ter uma porção do seu fígado comida diariamente por um abutre. Seu fígado se regenerava durante a noite, deste modo abastecendo o abutre com comida eterna e Prometheus com tortura eterna<sup>12-14</sup>.

As pesquisas com células-tronco no fígado introduziram uma nova era de controvérsias, otimismo e grandes expectativas<sup>15</sup>. Assim, esse trabalho teve como objetivo elucidar as recentes descobertas sobre células-tronco na terapêutica de doenças hepáticas.

### **Células-tronco: fatos e promessas**

Muito do interesse em torno das células-tronco se deve à habilidade do desenvolvimento celular, presente em embriões, tecido fetal e vários tecidos adultos e à capacidade dessas células trocarem o seu curso normal e se diferenciarem em tipos células diversos, como células musculares, células da medula óssea, hepáticas, entre outras.

Uma célula-tronco embrionária humana desenvolvida em laboratório pode produzir um suprimento essencial ilimitado de células terapêuticas. Esse fenômeno já era conhecido em células-tronco embrionárias de ratos, mas não tinha sido demonstrado em humanos até a década passada<sup>3</sup>.

Entre os mecanismos que têm sido sugeridos como mecanismos de ação biológica das células-tronco estão a transdiferenciação e a fusão celular. Quando ocorre um dano grave em um órgão, a transdiferenciação ocorre mais prontamente. Dessa forma, as células-tronco atuam como um sistema de recuperação quando a própria capacidade regenerativa de um órgão está suprimida. A transdiferenciação é a aquisição de um novo fenótipo<sup>4</sup>. Ou seja, células de um determinado órgão originando células de um outro órgão. A fusão, por sua vez, consiste na união de duas células diferentes, mantendo as características fisiológicas e funcionais de uma delas.

As células-tronco são identificadas como células indiferenciadas capazes de proliferação, manutenção própria, produção de um grande número de progenitores funcionais diferentes e de capacidade de regeneração do tecido depois de lesão<sup>16</sup>. As células que preenchem todos esses critérios são, atualmente, chamadas de as verdadeiras células-tronco. O melhor exemplo de célula-tronco é a célula-tronco embrionária<sup>15</sup>.

As células-tronco mais flexíveis vêm do interior da massa celular do blastocisto. Essas células são essencialmente pluripotentes, ou seja, são capazes de originar todas as células as três camadas germinativas<sup>4</sup>. O potencial terapêutico de diferenciação celular pode controlar os sintomas das doenças degenerativas neurológicas em modelos animais<sup>2</sup>.

Enquanto as células-tronco embrionárias estão crescendo em cultura, sob certas condições, elas podem permanecer indiferenciadas. Mas se permitirem que as células se agrupem para formar um corpo embrionário, estas podem começar a se diferenciarem espontaneamente. Elas podem formar células musculares, células nervosas e vários outros tipos de células. Embora a diferenciação espontânea seja um bom indicador de que a cultura de células-tronco embrionárias é saudável, não é um método eficiente de produção de cultura de tipos celulares específicos. Então, para gerar cultura de tipos celulares específicos, cientistas precisam controlar a diferenciação de células-tronco embrionárias. Com isso, as células-tronco poderão ser usadas para tratar várias doenças no futuro<sup>1</sup>.

Nos transplantes alogênicos (onde o doador e receptor são indivíduos geneticamente diferentes) usando-se células-tronco embrionárias cultivadas e diferenciadas continuam com o problema da incompatibilidade imunológica entre o doador das células-tronco e o receptor. Drogas imunossupressoras podem ser previamente administradas ao transplante, mas seus efeitos colaterais não são facilmente minimizados. A manipulação genética do doador de células antes do transplante é uma alternativa, mas pesquisas neste assunto ainda são vagas<sup>2</sup>.

Uma vez que, para se obter células-tronco embrionárias necessita-se de embrião humano, os estudos com as células-tronco embrionárias têm encontrado vários obstáculos em relação às questões éticas. Nos diferentes países ao redor do mundo os quais permitem o uso destas células, os critérios normalmente são: 1) as células-tronco devem ser provenientes de um embrião criado para propósitos reprodutivos, 2) o embrião criado não precisou ser usado para esse propósito estando, portanto, excedente, 3) um consentimento informado da doação do embrião deve ser obtido. Nenhuma ajuda financeira pode ser dada para doação de embriões. E, obviamente, a clonagem humana tem sido condenada e deve ser banida da humanidade.

Por outro lado, sem envolver grandes discussões éticas, paralelamente as células-tronco adultas hematopoéticas já são usadas na clínica com sucesso há mais de 30 anos, através do antigo procedimento chamado transplante de medula óssea. Atualmente, esse procedimento é denominado transplante de células-tronco<sup>2</sup>, uma vez que, além da medula óssea, o sangue periférico e o sangue de cordão umbilical também são usados como fontes de células-tronco adultas.

Uma célula-tronco adulta é uma célula não diferenciada, encontrada entre células de um tecido ou órgão especializados. O primeiro papel das células-tronco adultas em um organismo vivo é manter e reparar o tecido no qual estão. As pesquisas com células-tronco adultas começaram há 40 anos atrás. Nos anos 60, cientistas descobriram que a medula óssea continha dois tipos de células-tronco. Uma população chamada célula-tronco hematopoética, que forma todo tipo de células sanguíneas. A segunda população, chamada células do estroma da medula óssea, foi descoberta alguns anos depois. As células

estromais são uma população de células que podem gerar ossos, cartilagem, gorduras e tecido fibroso. Atualmente, as células estromais são identificadas como sendo as chamadas células-tronco mesenquimais<sup>1</sup>.

Vários tecidos contêm células-tronco adultas como sistema nervoso central, medula óssea, sangue periférico, vasos sangüíneos, músculo esquelético, pele, fígado, entre outros. Cientistas de vários laboratórios estão tentando encontrar maneiras de fazer crescer células-tronco adultas em cultura e manipulá-las para gerar tipos específicos de células, para que elas possam ser usadas para tratamento de doenças e lesões. Um exemplo de tratamento inclui o restabelecimento da produção de dopamina no cérebro de pacientes com Parkinson<sup>1</sup>.

O uso terapêutico das células-tronco adultas e embrionárias apresentam vantagens e desvantagens. Essas células diferem no número e no tipo de células em que podem se diferenciar. Embora cada vez mais têm sido identificados tipos de células-tronco adultas com plasticidade semelhante às embrionárias, as células-tronco embrionárias podem crescer em cultura facilmente, enquanto que células-tronco adultas são raras em tecidos maduros e seus métodos de cultura ainda não funcionaram bem. Essa é uma distinção muito importante, pois é necessário um grande número de células para a terapia com células-tronco. Uma grande vantagem no uso de células-tronco adultas é que as próprias células do paciente podem ser expandidas em cultura e re-introduzidas no paciente, o que significa que não serão rejeitadas pelo sistema imune. Porém, esse uso autólogo, ou seja, uso das células do próprio paciente, não pode ser realizado para doenças genéticas. As células-tronco embrionárias de um doador introduzidas em um paciente podem causar rejeição. Por outro lado, se forem utilizadas tanto células-tronco adultas como embrionárias de um doador imunologicamente compatível, o problema de rejeição estaria resolvido. Em alguns casos, as células-tronco podem atravessar as camadas germinativas e contribuir para a regeneração de tecidos de outra camada germinativa. Por exemplo, as células-tronco da medula óssea, que se originam da camada mesodérmica, podem contribuir para a regeneração do fígado que se origina da camada endodérmica. O cruzamento de camadas germinativas mostra outra dimensão da plasticidade das células-tronco adultas<sup>1</sup>.

Uma vez que as células-tronco multipotentes persistem até a idade adulta e são responsáveis pela propriedade de regeneração de diversos órgãos<sup>2</sup>, vários autores acreditam que as células-tronco provenientes da medula óssea podem fazer crescer hepatócitos e células do ducto biliar. A importância deste fato está em que as células hepáticas geradas pelo próprio paciente não provocam rejeição pelo sistema imune e, portanto, não há necessidade de administrar drogas imunossupressoras ao paciente<sup>12</sup>. Esse fato, se cientificamente comprovado, irá revolucionar o estudo das células-tronco e da terapia celular para as lesões hepáticas.

## O fígado e sua regeneração

Ao final da primeira semana, o blastocisto, se presente no organismo materno, será implantado superficialmente no endométrio uterino. As três camadas germinativas começam a aparecer na terceira semana de gestação, durante a gastrulação. O ectoderma dá origem à epiderme, ao sistema nervoso central e periférico, à retina do olho e a várias outras estruturas. O endoderma é a fonte dos revestimentos epiteliais das vias respiratórias, do trato gastrointestinal, incluindo as glândulas que nele desembocam, assim como as células glandulares dos órgãos associados, tais como fígado e o pâncreas. O mesoderma dá origem às capas do músculo liso, tecido conjuntivo e vasos associados aos tecidos e órgãos. O mesoderma também forma a maior parte do sistema cardiovascular e é a fonte das células do sangue e da medula óssea, do esqueleto, músculos estriados e órgãos reprodutores e de excreção<sup>9</sup>.

O fígado, a vesícula biliar e o sistema de ductos biliares surgem de uma invaginação central da parte caudal do intestino anterior no início da quarta semana. O fígado cresce rapidamente e, da quinta a décima semana, preenche grande parte da cavidade abdominal. A quantidade de sangue oxigenado que flui da veia umbilical para o fígado determina o desenvolvimento e a segmentação funcional do fígado. Inicialmente, os lobos direito e esquerdo são aproximadamente do mesmo tamanho, mas o lobo direito logo se torna maior. A hematopoese, no fígado, começa durante a sexta semana, conferindo ao fígado seu aspecto vermelho brilhante. Essa atividade hematopoética é a principal responsável pelo tamanho relativamente grande do fígado entre a sétima e a nona semanas do desenvolvimento e na nona semana, o fígado perfaz cerca de 10% do peso total do feto<sup>9</sup>.

O fígado é bem conhecido por sua capacidade de regeneração. O órgão inteiro pode regenerar-se novamente a partir de um pequeno pedaço, como um terço do tecido original. Essa resposta restaurativa é atribuída à grande habilidade dos hepatócitos em se dividirem, que é mais de 12 a 16 divisões por célula. Além disso, estudos recentes em modelos animais demonstraram a existência de células-tronco hepáticas endógenas e exógenas capazes de formar hepatócitos e ductos biliares<sup>2</sup>.

Já há muitas décadas, foi mostrada a capacidade regenerativa do fígado. O modelo experimental de Higgins e Anderson<sup>17</sup> para o estudo da regeneração desse órgão consistia em, através de um procedimento cirúrgico, remover dois terços do fígado de rato. Lobos específicos do fígado eram removidos intactos, sem danos aos lobos que ficaram. Os lobos residuais ampliaram-se refazendo a massa dos lobos removidos, ainda que os lobos retirados nunca mais cresceram. A resposta regenerativa do fígado é proporcional à quantidade de células que foram removidas.

Ao contrário da regeneração de outros tecidos como a medula óssea ou a pele, a regeneração do fígado não depende de um pequeno grupo de progenitores ou de células-tronco. Entretanto, células com propriedades de células-tronco podem aparecer em grande número quando a proliferação de hepatócitos maduros é inibida<sup>13</sup>.

Os animais, inclusive a espécie humana, podem sobreviver a uma remoção cirúrgica de mais de 75% da massa hepática. Dependendo do organismo, o número original de células é restabelecido dentro de uma semana e a massa original dentro de 2 a 3 semanas. Esse processo pode ocorrer repetitivamente, indicando uma capacidade regenerativa muito alta ao contrário dos outros órgãos parenquimais como rins e pâncreas<sup>18</sup>.

### **Células-tronco e o fígado**

Uma das primeiras demonstrações de plasticidade de células-tronco foi observada no fígado<sup>12</sup>. Em uma simples perda de hepatócitos, como a causada por uma hepatectomia parcial sem complicações de infecção viral ou inflamação, ocorre uma resposta regenerativa rápida para restaurar a massa do fígado<sup>19</sup>.

O Transplante de Medula Óssea tem sido usado por décadas, com sucesso, experimentalmente e na medicina clínica para reconstituir o sistema hematopoético, incluindo o sistema imune do receptor com células derivadas do doador. Recentemente, foi sugerido que as células-tronco hematopoéticas humanas, particularmente as do sangue de cordão umbilical, também podem fazer crescer células hepáticas em xenotransplantes<sup>18</sup>.

De acordo com Mitaka<sup>20</sup>, a questão da existência de células-tronco no fígado de animais adultos tem sido debatida por cerca de meio século. Embora muitos pesquisadores em todo mundo tentaram identificar e caracterizar essas células no fígado, resultados convincentes ainda não foram notificados. A partir de estudos sobre o desenvolvimento hepático, parece que a maioria dos hepatócitos e células do ducto biliar do fígado adulto derivem originalmente de hepatoblastos residentes no fígado fetal. Dessa maneira, hepatoblastos são considerados as células-tronco progenitoras de células epiteliais hepáticas. Entretanto, não é possível encontrar células morfológica e fenotipicamente similares aos hepatoblastos no fígado adulto normal, até mesmo no fígado em regeneração. Assim, persiste a dúvida se há ou não células-tronco no fígado dos animais adultos<sup>20</sup>. Por outro lado, embora células-tronco hepáticas adultas não tenham sido isoladas ainda, tem sido demonstrada uma enorme capacidade de repopulação de hepatócitos maduros transplantados sob condições de dano contínuo hepático<sup>15</sup>.

Theise et al.<sup>21</sup> mostraram que uma única célula-tronco hematopoética não só reconstitui o sistema hematopoético de rato mas também contribui para multiplicar outros tecidos, inclusive o epitélio do fígado. Foi observado, também, que existem hepatócitos derivados da medula óssea, mas os resultados ainda são considerados controversos quanto a sua importância funcional no dano hepático. Em um modelo animal, o restabelecimento das células do fígado derivadas da medula óssea mostrou resposta ao dano hepático, particularmente na regeneração dependente de progenitor.

Os hepatócitos podem ser originados por diferenciação direta das células-tronco hematopoéticas ou por via indireta, com uma célula hepática oval intermediária. Células ovais são as células que surgem da resposta ao dano hepático e são derivadas do ducto biliar. Essas células ovais são células-tronco hepáticas que existem no canal de Hering. O modelo oposto a esse, sugere que os precursores de células ovais hepáticas residem somente no fígado e que a medula óssea contribui muito pouco com as células epiteliais hepáticas, mesmo durante o dano<sup>18</sup>.

Vários modelos de transplantes celulares têm mostrado que hepatócitos podem passar por uma expansão clonal significativa. Algumas observações indicam que hepatócitos são uma população de células-tronco funcionais do fígado. Um dano hepático mais grave ativa o compartimento de uma segunda população de células-tronco facultativas (as células ovais) localizado na árvore biliar intra-hepática, dando crescimento ao epitélio biliar inclusive os lóbulos antes que estas células se diferenciem em hepatócitos. Uma terceira população de células-tronco com potencial hepático reside na medula óssea. Essas seriam as células-tronco hematopoéticas que, segundo alguns estudos, fazem a contribuição mais significativa para a regeneração hepática<sup>19</sup>, contradizendo outros achados<sup>18</sup>. Como essas três populações de células-tronco se integram para manter a homeostasia ainda não foi claramente entendido<sup>19</sup>.

### **Hepatócitos**

Thiese et al.<sup>21</sup> e Alisson et al.<sup>22</sup> também demonstraram que os hepatócitos podem ser gerados de uma população celular da medula óssea em humanos<sup>4</sup>. O transplante de hepatócitos tem sido sugerido como uma alternativa para pacientes esperando um transplante de fígado<sup>2</sup>. Até pouco tempo atrás, acreditava-se que hepatócitos só podiam ser derivados de células de origem endodérmicas e seus progenitores. Entretanto estudos recentes sugerem que células não endodérmicas também podem formar hepatócitos *in vivo* e *in vitro*<sup>23</sup>.

O transplante de hepatócitos pode ser realizado nos casos em que há doador de fígado para o transplante do órgão inteiro, tem demonstrado que células hepáticas transplantadas são capazes de expansão clonal significativa. Apesar de não se conhecer um tráfego de células entre o pâncreas e o fígado, está claro que as células pancreáticas podem se diferenciar em hepatócito, que é o seu tipo celular embrionicamente relacionada<sup>19</sup>.

### **Células ovais hepáticas**

As células ovais hepáticas, células pequenas com citoplasma escasso e núcleo ovóide<sup>20</sup>, são uma população celular que deve constituir o compartimento de células-tronco no fígado<sup>2,23</sup>. Essas células-tronco hepáticas existem em pequenas unidades da árvore biliar, nos canais de Hering<sup>2</sup>, de onde essas células migram para o parênquima hepático<sup>23</sup>.

Pelo fato das células ovais só se proliferarem quando a replicação dos hepatócitos é prejudicada, elas são consideradas progenitoras das células-tronco hepáticas similares que podem se diferenciar em linhagens hepática, biliar, intestinal e pancreática em vários modelos de roedores<sup>24</sup>. Vários estudos têm demonstrado a capacidade das células ovais em se diferenciar em hepatócitos<sup>1</sup>. Exames detalhados revelaram que, primeiramente, as células ovais se transformam em pequenos hepatócitos basofílicos para, então, se transformarem em hepatócitos maduros<sup>20</sup>.

As células ovais hepáticas expressam diversos marcadores hematopoéticos, como Thy 1.1, CD34, receptor de Flt3 e c-Kit<sup>4,18,23,25,26</sup>. Esses achados corroboram com os diversos estudos que têm mostrado que as células da medula óssea podem originar diversos tipos de células epiteliais hepáticas, incluindo células ovais, hepatócitos e epitélio do ducto<sup>18</sup>. No entanto, a origem dessas células-tronco não é completamente conhecida<sup>4</sup>. Porém, quando um grande dano ocorre sobre o fígado ou a sua regeneração depois de uma lesão está comprometida, ocorre a ativação das células ovais e o número dessas células aumenta proporcionalmente à gravidade da doença do fígado humano<sup>19</sup>.

Mesmo que a localização anatômica da proliferação das células ovais sugere a existência de um progenitor de hepatócitos no canal de Hering, as propriedades precisas e a origem das células ovais permanecem incertas. Porém, estudos recentes em ratos e humanos sugerem que as células ovais sejam derivadas da medula óssea<sup>18</sup>.

### **Células da medula óssea**

Estudos recentes mostram que a pesquisa de células-tronco no fígado, é uma área de importante investigação científica. Um dos mais importantes achados, é que as células-tronco do fígado podem ser derivadas da medula óssea. Têm-se sugerido que as células da medula óssea seriam a terceira fonte de células durante o processo de regeneração hepática ao lado dos hepatócitos e das células-tronco endógenas do fígado<sup>25</sup>.

A medula óssea apresenta vários tipos de células-tronco, como as células-tronco hematopoéticas, as células-tronco mesenquimais, as MAPCs, entre outras. As células-tronco da medula óssea podem escapar para a corrente circulatória podendo, portanto, serem encontradas também (embora em pequena quantidade) no sangue periférico do indivíduo. Essas células-tronco também podem ser encontradas no sangue do cordão umbilical do recém-nascido.

Shu et al.<sup>26</sup> e Petersen et al.<sup>27</sup> demonstraram que as células da medula óssea de ratos têm o potencial de se desenvolver em células ovais e em hepatócitos *in vivo*, mostrando a potente função das células da medula óssea na regeneração do fígado<sup>11,28</sup>. Essas observações aumentam a possibilidade de que essas células possam ser usadas, além da terapia celular, para a terapia genética no fígado.

Alison et al.<sup>22</sup> mostraram que algumas células da medula óssea humana se tornaram células hepáticas em pacientes que receberam transplante de medula óssea. Nesse estudo, mulheres que receberam transplante de medula óssea de doadores masculinos apresentaram células hepáticas que continham o cromossomo Y, provavelmente derivadas do transplante de medula óssea ocorrido anteriormente. Se por um lado, esse fato sugere o possível uso das células de medula óssea no tratamento de doenças hepáticas<sup>3</sup>, por outro lado, outros estudos sugerem que hepatócitos derivados da medula óssea existem, mas são extremamente raros, pois esses hepatócitos seriam gerados por fusão celular e não por diferenciação de células-tronco. Entretanto as células derivadas da medula óssea podem ter um importante papel indireto na regeneração do fígado.

Apesar das observações de que as células hepáticas epiteliais possam ser derivadas da medula óssea, duas questões importantes permanecem. Primeiro, não está claro qual o tipo de célula na medula óssea é o precursor de células hepáticas. Segundo, a capacidade funcional dessas células ainda não está comprovada<sup>18</sup>.

O atual interesse no papel das células-tronco da medula óssea na regeneração do fígado começou com o descobrimento de que as células ovais de rato induzidas por um clássico regime carcinogênico expressavam genes tipicamente associados a células-tronco hematopoéticas. No entanto, a expressão de marcadores de células-tronco hematopoéticas não ocorre unicamente em ratos. Células ovais humanas, isoladas de pacientes com doenças biliares crônicas, expressam CD34 como também marcadores do ducto biliar (CK19). A molécula CD34 é o marcador de superfície clássico de células-tronco hematopoéticas. Trabalhos recentes têm mostrado que somente células que apresentam os marcadores c-Kit, Lin-, Sca-1+ e Thy-1 promovem o crescimento de hepatócitos. Esse achado sugere, embora não comprove, que as células-tronco hematopoéticas possam ser precursoras de hepatócitos<sup>18</sup>.

Corroborando essa hipótese, está o fato de que a hematopoese e o ambiente hepático são conhecidos por ter um íntimo relacionamento no momento do desenvolvimento hepático e em doenças sistêmicas. Na vida intra-uterina, o fígado fetal é o órgão responsável pela formação das células sanguíneas, durante alguns meses. Recentemente, o transplante de células isoladas da medula óssea de roedores e de humanos, tem se diferenciado em células ovais, as quais são consideradas as células-tronco hepáticas e em hepatócitos no fígado<sup>20</sup>.

Petersen et al.<sup>27</sup> mostraram que no transplante de células da medula óssea, em rato letalmente irradiados, as células migravam para o fígado e então se diferenciavam em células ovais e hepatócitos. Lagasse et al.<sup>29</sup> mostraram que células-tronco hematopoéticas purificadas podem se diferenciar em hepatócitos e recompor partes do fígado em camundongo com tiroseemia hereditária com novos hepatócitos maduros originados da medula óssea<sup>20</sup>. Estudos mais recentes mostraram que células-tronco do sangue periférico, mobilizadas por fatores de

crescimento hematopoéticos, também apresentaram um campo promissor na capacidade de regeneração hepática, através da formação de hepatócitos<sup>30</sup>.

Apesar das células-tronco hematopoéticas serem considerada uma fonte de células para a diferenciação em hepatócitos, alguns estudos mostram que subgrupos de células não-hematopoéticas também exercem este papel. Essas células seriam, portanto, células CD45 negativas<sup>25</sup>, uma vez que esta molécula de superfície celular é considerada um marcador leucocitário.

Assim, a medula óssea contém, além das células-tronco hematopoéticas, células-tronco mesenquimais<sup>25</sup> entre outras.

### **Células multipotentes progenitoras adultas e células-tronco mesenquimais**

As células multipotentes progenitoras adultas (MAPCs) são uma população de células-tronco adultas que podem ser isoladas da medula óssea de várias espécies de mamíferos. Essas células têm propriedades similares às células-tronco embrionárias que podem se diferenciar em diferentes linhagens *in vitro* em condições apropriadas. Esses tipos celulares incluem a linhagem mesenquimal, como músculo, cartilagem e ossos, linhagem neuroectodérmica como as diferentes classes de neurônios e linhagem endodérmica como os hepatócitos<sup>18,23</sup>. As células multipotentes progenitoras adultas também foram transplantadas *in vivo* e células derivadas dessas também foram encontradas no fígado e pareciam ser hepatócitos<sup>25,31</sup>.

Alguns autores, no entanto, consideram que as MAPCs seriam um subtipo das células-tronco mesenquimais (CTM). As CTM são células originadas da camada do mesoderma da fase embrionária<sup>31</sup>. As CTM são células indiferenciadas, altamente capazes de fazer auto-renovação, proliferação e diferenciação celular<sup>32</sup>. As CTM exercem um importante papel na regulação da hematopoese, bem como no sucesso do transplante de células hematopoéticas, uma vez que são o principal componente na formação do microambiente medular<sup>33</sup>. As CTM são candidatas promissoras para o desenvolvimento de futuras estratégias terapêuticas na terapia com células-tronco<sup>34</sup> por serem capazes de se diferenciar em diversos tipos celulares como fibroblastos, osteoblastos, condroblastos, miócitos, células nervosas, adipócitos<sup>33</sup> e, inclusive, hepatócitos<sup>25,31,35</sup>.

Além da medula óssea, em vários outros órgãos já foram descritos a presença de CTM, entre eles, o tecido adiposo, o pâncreas, o fígado<sup>36,37</sup> e, também, o sangue cordão umbilical<sup>38-40</sup>.

### **O sangue de cordão umbilical como fonte de células para doenças hepáticas**

O sangue de cordão umbilical tem sido utilizado, nos últimos anos, como uma importante fonte de células-tronco para reconstituir a medula óssea nos transplantes. No entanto, mais recentemente, foi identificado que as CTM presentes no sangue do cordão umbilical podem se diferenciar em hepatócitos. Esse material tem sido visto como uma nova e importante fonte de

células na terapia e transplante de células contra doenças hepáticas incuráveis<sup>35,39</sup>.

Em 2004, foi identificado um novo tipo de células-tronco no sangue de cordão umbilical, denominado células-tronco somáticas irrestritas (*unrestricted somatic stem cells*), chamadas de USSCs. Essa é uma população rara de células não-hematopoéticas (CD45-negativas) pluripotentes presentes no sangue de cordão umbilical e que apresenta grande capacidade de proliferação e diferenciação celular<sup>41</sup>. Para verificar a capacidade de diferenciação *in vivo* das USSCs humanas em células hepáticas, em estudo experimental com modelo animal, as células transplantadas conseguiram, com grande eficiência, diferenciar-se em hepatócitos no fígado do receptor.

Embora o número de estudos sobre a utilização terapêutica de células-tronco a partir do sangue de cordão umbilical em doenças hepáticas seja ainda muito restrito, uma das razões de se acreditar que esta será uma importante fonte de células no futuro no tratamento das doenças hepáticas, é devido às vantagens que este material oferece em relação à medula óssea. Entre essas vantagens estão o menor risco de transmissão de vírus, a menor rejeição de células quando doadas por outro indivíduo mesmo se não totalmente compatível com o receptor, a facilitada da obtenção do material, devido ser um processo não invasivo, além da oferta praticamente ilimitada de células-tronco<sup>38</sup>.

### **Mecanismos de regeneração hepáticas através das células-tronco**

As células-tronco hepáticas podem ser classificadas de diferentes maneiras: 1) células responsáveis pelo “turnover” normal do tecido; 2) células responsáveis pela resposta à hepatectomia parcial; 3) células responsáveis pela regeneração dependente de progenitor; 4) células com capacidade de “repopoamento” no transplante de fígado e 5) células que resultam em fenótipos dos hepatócitos e do ducto biliar *in vitro*. Fortes evidências sugerem que diferentes tipos celulares e mecanismos são responsáveis pela reconstituição do órgão dependendo do tipo de dano hepático. Além disso, o restabelecimento do tecido por células endógenas (regeneração) deve ser distinguida da reconstituição por transplante de células (“repopoamento”)<sup>18</sup>.

Assim, diversos trabalhos sobre a plasticidade de células-tronco e observações sobre a expressão de marcadores hematopoéticos em células ovais, levaram à hipótese de que as células-tronco da medula óssea podem, também, originar as células epiteliais, inclusive as células ovais hepáticas<sup>18,27</sup>. A expressão de várias moléculas normalmente associadas com a medula óssea talvez explique porque a hematopoese é normalmente encontrada no fígado com células ovais ativas. No entanto, a maioria desses marcadores são perdidos quando as células ovais se diferenciam em hepatócitos.

Numerosos fatores de crescimento e citocinas, fator de crescimento de hepatócitos, fator de crescimento de

epiderme, TGF- $\alpha$ , TNF- $\alpha$  e IL-6, triiodotironina, insulina e agentes adrenérgicos podem ou facilitar ou iniciar a resposta regenerativa normal dos hepatócitos. Muitos desses mesmos fatores estão implicados no comportamento das células ovais<sup>42</sup>.

Os estudos de Theise et al<sup>21</sup> sugerem que o transplante de células da medula óssea deve ser considerado como uma opção terapêutica no tratamento de doenças do fígado. No entanto, segundo os autores, as células epiteliais surgem por fusão e não por diferenciação, e as células ovais são geradas por células-tronco intra-hepáticas e não precursoras na medula óssea<sup>18</sup>. Esses achados mostram a grande controvérsia sobre a origem das células-tronco no fígado e a necessidade de ampliar os estudos.

Por outro lado, tem sido sugerido que as células-tronco hepáticas de qualquer linhagem, os hepatócitos, as células ovais ou as células-tronco hematopoéticas podem ter uso terapêutico no tratamento de várias doenças que afetam o fígado<sup>18,43</sup>. Entre essas, estão diversas doenças genéticas que produzem doenças hepáticas, como a doença de Wilson e a síndrome de Crigler-Najjar, e em casos que possuem uma expressão extra-hepática da doença, como a deficiência do fator IX<sup>19</sup>.

Não está suficientemente claro como a diferenciação e/ou maturação de células-tronco hepáticas ocorrem na vida adulta. Como, por exemplo, as células-tronco hematopoéticas podem se diferenciar em células ovais ou células do ducto biliar e como as células ovais podem se tornar hepatócitos ou células do ducto biliar<sup>20</sup>. No entanto, segundo estudo de Dabeva e colaboradores<sup>15</sup>, as células-tronco de um fígado fetal, quando isoladas, podem ser transplantadas com sucesso e repovoar mais de 10% do fígado normal.

### Fusão ou diferenciação?

As condições apropriadas de cultura na qual as células da medula óssea se diferenciam em hepatócitos é de fundamental importância. Esse fato é determinante, não só para entender os mecanismos de diferenciação, mas também para uma eficiente amplificação das células progenitoras de hepatócitos originadas da medula óssea, como sendo um pré-requisito para o uso terapêutico<sup>44</sup>.

Tanto a transdiferenciação como a fusão celular podem ser mecanismos de diferenciação de fenótipos de células em cultura e transplantadas. No entanto, seria necessário definir o mecanismo da formação de hepatócitos e de outras células diferenciadas das células-tronco hepáticas<sup>45</sup>. A maioria dos experimentos que sugerem a transdiferenciação de células-tronco extra-hepáticas em hepatócitos também podem ser explicados por fusão entre as células doadas e os hepatócitos hospedeiros. Isto mostra que fusões entre células-tronco embrionárias e células diferenciadas, assim como entre progenitores da medula óssea e hepatócitos, podem ser um fenômeno comum<sup>15</sup>.

Há três mecanismos básicos que devem ser considerados quanto ao aparecimento de hepatócitos do doador após um transplante de células-tronco da medula óssea. Primeiro, a

medula óssea pode, teoricamente, abrigar células-tronco endodérmicas especializadas capazes de produzir hepatócitos e outras células epiteliais. Essa célula seria análoga às células-tronco mesenquimais que produzem derivados de mesoderma como músculo, cartilagem e gordura. Segundo, os hepatócitos e as células sangüíneas podem ser derivadas de uma mesma célula-tronco por diferenciação hierárquica. Terceiro, os hepatócitos derivados da medula óssea podem não ser totalmente derivados da diferenciação, mas preferencialmente da fusão celular. Essa possibilidade cresceu pela observação de que as células hematopoéticas podem espontaneamente se fundir com células-tronco embrionárias *in vitro* e produzir múltiplos tecidos em embrião de camundongo. Por fim, embora a fusão celular espontânea seja um evento muito raro mesmo na presença de um dano hepático muito grande, os hepatócitos derivados da medula óssea, mesmo se gerados por fusão celular, são totalmente funcionais e, conseqüentemente, poderão ter uso terapêutico<sup>18</sup>.

### Estudo com células-tronco em doenças hepáticas no Brasil

A possibilidade da utilização de células-tronco na terapia e transplante em diferentes doenças hepáticas tem sido interesse da comunidade científica ao redor do mundo, inclusive no Brasil. No câncer hepático, na regeneração de uma lesão aguda do fígado, nas hepatites, na cirrose, entre outras doenças, bem como no estabelecimento de protocolos para a terapia gênica, as pesquisas com células-tronco mostram com um futuro promissor para sua utilização terapêutica<sup>46,47</sup>.

Embora resultados de estudos clínicos com células-tronco em doenças hepáticas em seres humanos ainda sejam praticamente inexistentes na literatura científica, estudos preliminares mostram a capacidade terapêutica dessas células neste novo campo de investigação clínica. O Brasil vem se destacando internacionalmente em estudos clínicos com células-tronco em algumas áreas da saúde, como nas doenças cardíacas, em algumas doenças auto-imune e, mais recentemente, nas doenças hepáticas.

Um grupo de pesquisadores brasileiros realizou, em setembro de 2005, o primeiro transplante de células-tronco da medula óssea em paciente com cirrose crônica, em Salvador, Bahia<sup>48</sup>. Com a iniciativa, o Brasil é o pioneiro no mundo em transplantes com células-tronco para tratamento de doenças hepáticas<sup>49</sup>. O sucesso da utilização terapêutica de células-tronco é resultado de uma pesquisa iniciada há alguns anos pela unidade da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) na Bahia. A utilização de células-tronco no tratamento reduziu em torno de 60% a fibrose hepática. A intenção dos pesquisadores foi tentar melhorar a qualidade de vida do paciente e aumentar a sobrevida até que o mesmo pudesse receber um novo fígado<sup>50</sup>. Segundo os autores do estudo, o transplante das células-tronco não substitui a necessidade de transplante do fígado, mas poderá auxiliar centenas de pessoas que estão na fila à espera de um órgão para o transplante<sup>49,50</sup>. Outros pacientes já estão sendo submetidos ao tratamento experimental com células-tronco<sup>48</sup>.

O avanço na área de pesquisas clínicas marca uma nova era no estudo das doenças hepáticas e coloca o Brasil como uma importante referência no que diz respeito aos estudos com células-tronco para tratamento em seres humanos.

## CONCLUSÕES

A falta de doadores de órgãos tem limitado muito o uso de transplantes na medicina. Desde os primeiros relatos, há dez anos atrás, que células-tronco embrionárias totipotentes podem ser extraídas de células pré-embriônicas humanas e se proliferam com sucesso, tanto o público em geral quanto a comunidade científica têm se interessado na esperança de potentes terapias baseadas em células-tronco para o tratamento de uma ampla variedade de doenças que afetam nossos órgãos vitais<sup>12</sup>.

O fígado, amplamente estudado em relação às células-tronco, possui células que podem ser originadas da medula óssea, ou podem residir no próprio fígado e são ativadas quando necessárias. O transplante de hepatócitos, desenvolvido devido à falta de fígado doado para o transplante total, tem mostrado capacidade de expansão clonal significativa dentro do fígado lesado<sup>4</sup>.

Os próximos passos na pesquisa de células-tronco hepáticas são elucidar os mecanismos de diferenciação e maturação de cada célula e entender o papel dessas células na linhagem hepática.

Ao lado dos mecanismos de transdiferenciação ou fusão, há uma terceira hipótese que pode explicar o mecanismo de ação das células-tronco e que deverá ser amplamente investigada nos próximos anos. Talvez não seja nem a fusão e nem a transdiferenciação o principal mecanismo de regeneração tecidual das células-tronco. Até porque, alguns trabalhos vêm mostrando a presença de apenas um pequeno percentual de células do doador que permanece após a reconstituição funcional do tecido. Tal fato têm sido observado pela ausência de marcadores das células dos doadores, o que deveria permanecer na transdiferenciação.

Pode ser que as células-tronco implantadas no local da lesão ajudem na “modulação” do ambiente que foi danificado, através da liberação de fatores de crescimento. Esses, por sua vez, podem estimular as próprias células-tronco locais (ou circulantes) a regenerar aquele tecido. Com certeza, muitos estudos ainda devem ser realizados para o entendimento desses ou de outros mecanismos de funcionamento das células-tronco, ainda desconhecidos.

Ainda serão necessários alguns anos até que se possa usar com grande eficiência e em larga escala a terapia com células-troncos para diversas doenças. Novas terapias revolucionárias ainda deverão ser descobertas como, por exemplo, investigações usando células-tronco hematopoéticas que poderão contribuir para a construção de um fígado artificial e formação de tecidos hepáticos “*ex vivo*”, assim como a terapia

de transplante celular<sup>2</sup>. No entanto, a medicina regenerativa, através do uso das células-tronco no tratamento de inúmeras doenças incuráveis, é uma esperança cada vez mais próxima ao alcance da humanidade.

## REFERÊNCIAS

1. Stem Cell Information 2004. Available from: URL: <http://stemcells.nih.gov/infocenter/stemCellBasics.asp>. Último acesso em 02/06/2005.
2. Lo K, Chuang W, Lamb D. Stem Cell Research: the facts, the myths and the promises. *J Urol* 2003; 170: 2453-8.
3. Vogel G. Stem cells: New Excitement, Persistent Questions. *Science* 2000; 290: 1672-74.
4. Forbes S, Vig P, Poulsom R, Wright NA, Alison MR. Adult stem cell plasticity: new pathways of tissue regeneration become visible. *Clin Sci* 2002; 103: 355-69.
5. Alison M. Characterization of the Differentiation Capacity of Rat-Derived Hepatic Stem Cells. *Semin Liver Dis* 2003; 23: 325-36.
6. Bongso TA, Fong CY, Ng CY, Ratnam SS. Blastocyst transfer in human in vitro: fertilization; the use of embryo co-culture. *Cell Biol Int* 1994; 18: 1181-9.
7. National Institutes of Health. Kirschstein R, Skirboll L. Stem Cells: Scientific Progress and Future Research Directions, 2001. The Stem Cell. Available from: URL: <http://stemcells.nih.gov/stemcell/pdfs/chapter1.pdf>. Último acesso em 02/06/2005.
8. National Institutes of Health. Kirschstein, R.; Skirboll, L. Stem Cells: Scientific Progress and Future Research Directions, 2001. The Embryonic Stem Cell 2001. Available from: URL: <http://stemcells.nih.gov/stemcell/pdfs/chapter2.pdf>. Último acesso em 02/06/2005.
9. Moore KL, Persaud TVN, Shiota K. Color atlas of clinical embryology. In: *The First Two Weeks of Human Development*. Chapter 1. Philadelphia, London, New York, St. Louis, Sydney, Toronto; WB Saunders Company; 2000. p. 1-12.
10. Darlington G. Molecular mechanisms of liver development and differentiation. *Curr Opin Cell Biol* 1999; 11: 678-82.
11. Okumoto K, Saito T, Hattori E, Ito JI, Adachi T, Takeda T, et al. Differentiation of bone marrow cells into cells that express liver-specific genes in vitro: implication of the Notch signals in differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 304: 691-5.
12. Alison, M. Liver regeneration with reference to stem cells. *Semin Cell Dev Biol* 2002; 13: 385-87.
13. Michalopoulos G, DeFrances M. Liver Regeneration. *Science* 1997; 276: 60-5.
14. Sell S. The hepatocyte: heterogeneity and plasticity of liver cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2003; 35: 267-71.
15. Dabeva M, Shafritz D. Hepatic Stem Cells and Liver Repopulation. *Semin Liver Dis* 2003; 23: 349-62.

16. Potten C, Loeffler M. Stem cell attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development* 1999; 110: 1001-20.
17. Michalopoulos G, DeFrances M. Liver Regeneration. *Science* 1997; 276: 60-5.
18. Grompe M. The Role of Bone Marrow Stem Cells in Liver Regeneration. *Semin Liver Dis* 2003; 23: 363-70.
19. Alison M, Poulsom R, Forbes S. Update on hepatic stem cells. *Liver* 2001; 21: 367-73.
20. Mitaka T. Hepatic Stem Cells: From Bone Marrow Cells to Hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 281: 1-5, 2001.
21. Theise N, Nimmakayalu M, Gardner R, Illei PB, Morgan G, Teperman L, et al. Liver from Bone Marrow in Humans. *Hepatology* 2000; 32: 11-6.
22. Alison M, Poulsom R, Jeffery R, Dhillon AP, Quaglia A, Jacob J, et al. Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. *Nature* 2000; 406: 257.
23. Schwatz R, Reyes M, Koodie L, Jiang Y, Blackstad M, Lund T, et al. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest* 2002; 109: 1291-302.
24. Faris R, Tamako K, Halpert G. Liver Stem Cells: A Potential Source of Hepatocytes for the Treatment of Human Liver Disease. *Int Soc Artif Organs* 2001; 25: 513-21.
25. Shu SN, Wei L, Wang JH, Zhan YT, Chen HS, Wang Y. Hepatic differentiation capability of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 2818-22.
26. Stamp L, Crosby HA, Hawes SM, Strain AJ, Pera MF. A novel cell-surface marker found on human embryonic hepatoblasts and a subpopulation of hepatic biliary epithelial cells. *Stem Cells* 2005; 23: 103-12.
27. Petersen B, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, et al. Bone Marrow as a Potential Source of Hepatic Oval Cells. *Science* 1999; 284: 1168-70.
28. Inderbitzin D, Avital I, Keogh A, Beldi G, Quarta M, Gloor B, et al. Interleukin-3 induces hepatocyte-specific metabolic activity in bone marrow-derived liver stem cells. *J Gastrointest Surg* 2005; 1: 69-74.
29. Lagass E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, et al. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med* 2000; 6: 1229-34.
30. Huiling X, Inagaki M, Arikura J, Ozaki A, Onodera K, Ogawa K, et al. Hepatocytes derived from peripheral blood stem cells of granulocyte-colony stimulating factor treated F344 rats in albuminemic rat livers. *J Surg Res* 2004; 122: 75-82.
31. Lee KD et al. In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Hepatology* 2004; 40: 1275-84.
32. Wexler SA, Donaldson C, Denning-Kendall P, Rice C, Bradley B, Hows J M et al. Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal 'stem' cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not. *Br J Haematol* 2003; 121: 368-74.
33. Otto WR, Rao J. Tomorrow's skeleton staff: mesenchymal stem cells and the repair of bone and cartilage. *Cell Prolif* 2004; 37: 97-110.
34. Feldmann RE Jr, Bieback K, Maurer MH, Kalenka A, Burgers HF, Gross B. Stem cell proteomes: a profile of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord blood. *Electrophoresis* 2005; 26: 2749-58.
35. Kang XQ, Zang WJ, Bao LJ, Li DL, Song TS, Xu XL, et al. Fibroblast growth factor-4 and hepatocyte growth factor induce differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells into hepatocytes. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 7461-5.
36. Gotherstrom C, Gotherstrom C, Ringden O, Tammik C, Zetterberg E, Westgren M, et al. Immunologic properties of human fetal mesenchymal stem cells. *Am J Obstet Gynecol* 2004; 190: 239-45, 2004.
37. Ryden M, Dicker A, Gotherstrom C, Astrom G, Tammik C, Arner P, et al. Functional characterization of human mesenchymal stem cell-derived adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 311: 391-7.
38. Gang EJ, Hong SH, Jeong JA, Hwang SH, Kim SW, Yang IH, et al. In vitro mesengenic potential of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 321: 02-8.
39. Hong SH, Gang EJ, Jeong JA, Ahn C, Hwang SH, Yang IH, et al. In vitro differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells into hepatocyte-like cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 330: 1153-61.
40. Li CD, Zhang WY, Li HL, Jiang XX, Zhang Y, Tang P, et al. Isolation and Identification of a Multilineage Potential Mesenchymal Cell from Human Placenta. *Placenta*. 2005, Sept 17. Available from URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list\\_uids=16174531&dopt=Citation](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=16174531&dopt=Citation). Último acesso em 01/03/2007.
41. Kogler G, Sensken S, Airey JA, Trapp T, Muschen M, Feldhahn N, et al. A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. *J Exp Med* 2004; 200: 123-35.
42. Alison M. Liver stem cells: a two compartment system. *Curr Opin Cell Biol* 1998; 10: 710-15.
43. Ishikawa H, Nakao K, Matsumoto K, Nishimura D, Ichikawa T, Hamasaki K, et al. Bone marrow engraftment in a rodent model of chemical carcinogenesis but no role in the histogenesis of hepatocellular carcinoma. *Gut* 2004; 53: 884-9.
44. Miyazaki M, Akiyama I, Sakaguchi M, Nakashima E, Okada M, Kataoka K, et al. Improved conditions to induce hepatocytes from rat bone marrow cells in culture. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 298: 24-30.

45. Thorgeirsson S, Grisham J. Overview or Recent Experimental Studies on Liver Stem Cells. *Semin Liver Dis* 2003; 23: 303-12.
46. Kamiya A, Gonzalez FJ, Nakauchi H. Identification and differentiation of hepatic stem cells during liver development. *Front Biosci* 2006; 11: 1302-10.
47. Sell S. The role of progenitor cells in repair of liver injury and in liver transplantation. *Wound Repair Regen* 2001; 9: 467-82.
48. Saúde Pública. Biblioteca virtual em saúde. Portal FIOCRUZ de 21/09/2005. Brasil faz transplante com uso de células-tronco de medula óssea para problemas do fígado. Available from: URL: <http://saudepublica.bvs.br/noticias/?act=view&id=30>. Último acesso em 27/02/2007.
49. Radis. Fiocruz. Comunicação em Saúde, Nº 39, novembro de 2005, página 5. Células-tronco em socorro do fígado. Available from: URL: <http://www.ensp.fiocruz.br/radis/39/sumula.html>. Último acesso em 27/02/2007.
50. Gestão C & T, Brasília, 26 a 28 de setembro de 2005, Nº 410, Ano 6. Pesquisa com células-tronco realizada na Bahia gera resultado clínico inédito. Available from: URL: <http://www.gestaoct.org.br/electronico/jornais/numero410.htm>. Acesso em 27/02/2007.

# Transdução de sinal: um olhar sobre a insulina

## Signal transduction: an overview on insulin

RIALA6/1082

Adriana LUCHS<sup>1\*</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Seção de Vírus Entéricos. Serviço de Virologia. Divisão de Biologia Médica. Instituto Adolfo Lutz. Av. Dr. Arnaldo, 355 CEP 01246-902 – Cerqueira César – São Paulo – SP – Fone: 3068-2909

Recebido: 03/03/2006 – Aceito para publicação: 18/05/2006

### RESUMO

Os esforços de muitos laboratórios têm concentrado no desenvolvimento de pesquisas e na descoberta de vias moleculares que atuam na mediação da resposta pleiotrópica da insulina. Os estudos sobre o mecanismo de ação insulínico levaram a descoberta do receptor tirosina quinase e várias proteínas ligantes que são diretamente ativadas por meio de sítios de tirosinas fosforiladas existentes nesses receptores. A família dos substratos do receptor de insulina (IRSs) são as principais proteínas envolvidas na transdução do sinal intracelular desencadeado pela insulina as quais são encontradas em uma grande variedade de células e tecidos. Esse trabalho de revisão versa sobre o tema referente ao complexo do receptor de insulina e a cascata de sinalização induzida por esse hormônio.

**Palavras-chave.** insulina, receptor insulínico, substrato do receptor insulínico (IRSs), sinalização intracelular, sítios tirosinafosforilados.

### ABSTRACT

Several laboratories efforts largely focus on investigating and discovering the molecular pathways that mediate the pleiotropic insulin responses. Studies on the mechanism of insulin action led to the discovery of the insulin receptor tyrosine kinase, the central role of tyrosine phosphorylation during insulin signaling and various signaling binding proteins directly activated by phosphotyrosine motifs occurring in the activated receptors complexes. Insulin receptors substrate family (IRSs) is the main proteins involved in intracellular signaling pathways, and it is found in a large variety of cells and tissues. This paper is a review on insulin receptor complex and the signaling cascades induced by this hormone.

**Key words.** insulin, insulin receptor, insulin receptor substrates (IRSs), intracellular signaling, phosphotyrosine motifs.

### SUMÁRIO

Introdução .....	158
A Insulina .....	158
O Receptor de Insulina (IR) .....	158
Os Domínios SH2 e SH3 .....	159
Os Substratos do Receptor de Insulina (IRSs) .....	160
Fosfatidilinositol 3 quinase (PI3K) .....	161
Proteína Homóloga ao Colágeno com Domínio SH2 (Shc) .....	162
Proteína Ras .....	162
A Proteína Quinase B/Akt (PKB/Akt) .....	162
Proteína Tirosina Fosfatase 1D (PTP1D) .....	162
Proteína Tirosina Fosfatase 1B (PTP1B) .....	162
Integrinas .....	162
Referências .....	163

## INTRODUÇÃO

### A Insulina

A insulina é uma proteína de pequeno peso molecular formada por duas cadeias polipeptídicas ligadas por pontes dissulfetos constituídas por 21 e 30 aminoácidos, respectivamente. Essa proteína é sintetizada nas células  $\beta$  pancreáticas como uma longa cadeia de polipeptídeos proveniente de um único gene, recebendo o nome de pró-insulina<sup>1</sup>. A pró-insulina é composta por insulina e peptídeo C<sup>2</sup>. Esta molécula é clivada por ação de uma enzima proteolítica após a cadeia proteica dobrar-se em um formato específico. A excisão de parte da cadeia polipeptídica de pró-insulina provoca uma perda irreversível da formação necessária para a proteína dobrar-se espontaneamente em sua conformação normal<sup>1</sup>. Desde o seu isolamento, a insulina é o hormônio peptídico mais intensamente estudado quanto a seu mecanismo de ação, refletindo sua importância na biologia humana e medicina. Um entendimento bioquímico claro dos mecanismos insulínicos é de máxima importância<sup>3</sup>.

Insulina é o agente anabólico mais potente fisiologicamente conhecido<sup>4</sup>. Em nível celular, este hormônio controla o transporte iônico, a captação de glicose e substrato (ex. aminoácidos), bem como a fosforilação e desfosforilação de enzimas, além de afetar o metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídios. Os efeitos desse hormônio variam desde respostas rápidas de sistemas de transporte e enzimas (de segundos a minutos) até modulações lentas, como proliferação celular, que pode levar horas para ser expressa. Além dos seus bem conhecidos efeitos metabólicos, há evidências de que exerça ações sobre componentes da estrutura celular como o citoesqueleto. Adicionado à complexidade da ação insulínica, há evidências que sugerem que esse hormônio exerça parte de seus efeitos metabólicos via mudanças no volume celular<sup>3</sup>. Uma dúvida resta: ainda não está claro se as ações metabólicas e mitogênicas da insulina compartilham uma via comum ou é o resultado de duas ou mais vias divergentes que emanam de seu receptor<sup>5</sup>.

Longe da ativação do receptor, a insulina regula o grau de fosforilação em serina e treonina, paradoxalmente estimulando fosforilação de algumas proteínas e causando desfosforilação em outras<sup>4</sup>. Está claro que algumas, mas não todas desfosforilações são efeitos insulínicos que controlam a elevação de 3', 5'-monofosfato cíclico de adenosina (AMPc), sendo a redução deste nucleotídeo um dos mecanismos fisiológicos mais importantes da ação insulínica. É bem estabelecido que a insulina ativa uma, e provavelmente mais, AMPc fosfodiesterases responsáveis pela redução dos níveis de AMPc. O hormônio também inibe a produção de AMPc através da inibição da adenilato ciclase. Esse efeito faz com que o AMPc seja um mensageiro secundário da insulina, embora não o principal<sup>6</sup>. Muitas dessas fosforilações em serina/treonina são compartilhadas com outros fatores de crescimento. Em contraste, a desfosforilação de proteínas é uma característica

única da insulina, incluindo muitas enzimas envolvidas no metabolismo de glicose e lipídios, tais como piruvato desidrogenase, glicogênio sintetase e lipase sensível a hormônio. Portanto essas desfosforilações parecem ser críticas para muitos dos efeitos metabólicos do hormônio como síntese de lipídios e carboidratos e inibição de lipólise<sup>4</sup>.

É interessante notar que pró-insulina, insulina e fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGFs) são peptídeos intimamente relacionados quanto a sua seqüência de aminoácidos, estrutura tridimensional e atividades biológicas. Enquanto a insulina age conhecidamente como um hormônio endócrino, o fator de crescimento relacionado à insulina 1 (IGF-1) é classicamente considerado como um regulador parácrino de crescimento e diferenciação celular. Ambos os peptídeos se ligam com alta afinidade a distintos receptores de membrana, os quais compartilham grande homologia. A pró-insulina é capaz de se ligar ao receptor de insulina com 10% menos afinidade que o hormônio original e promove ativação da sinalização, mas provavelmente com efeitos biológicos diferentes. Em fibroblastos de embrião de frangos a pró-insulina é descrita como mais efetiva que a insulina em estimular crescimento celular<sup>2</sup>.

### O Receptor de Insulina (IR)

O receptor de insulina (IR) está presente virtualmente em todos os tecidos dos vertebrados, embora sua concentração varie de 40 receptores em eritrócitos circulantes a 200 em adipócitos e hepatócitos<sup>7</sup>.

O gene do receptor humano está localizado no braço curto do cromossomo 19, sendo constituído por mais de 150 quilobases (Kb) e 22 éxons, codificando um cDNA de 4,2 Kb. Este receptor migra com peso molecular de 300-400 kDa em eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)<sup>7</sup>. O IR é sintetizado como pró-receptor e sofre uma série de mudanças pós-transdacionais, incluindo ligação covalente, pontes dissulfeto, dimerização e clivagem proteolítica para formar o tetrâmero  $\alpha_2\beta_2$ <sup>8</sup>. O IR consiste num heterotetrâmero composto por duas cadeias externas  $\alpha$ <sup>9</sup>, as quais estão localizadas totalmente fora da membrana e possuem os sítios de ligação à insulina<sup>7</sup> e duas cadeias transmembrânicas  $\beta$ , as quais possuem o domínio intracelular tirosina quinase<sup>9,10</sup> (Figura 1). A N-glicosilação ligada a aspargina presente no receptor é uma modificação necessária para a dimerização do mesmo, transporte intracelular e aquisição da capacidade de ligar-se a insulina. Na subunidade  $\beta$ , a glicosilação está envolvida com transmissão transmembrânica do sinal, enquanto na subunidade  $\alpha$  parece promover o processamento do pró-receptor e seu transporte a partir do retículo endoplasmático. Pró-receptores retidos no retículo possuem domínios quinásicos ativos *in vitro*, mas são praticamente insensíveis às estimulações insulínicas<sup>8</sup>.

Uma ou duas moléculas de insulina podem se ligar ao receptor e os sítios de ligação exibem um comportamento cooperativo negativo<sup>7</sup>. Esta ligação promove mudanças conformacionais, movendo os domínios quinásicos para perto,

permitindo a fosforilação cruzada da tirosina 1.162 e tirosinas adjacentes presentes na alça de ativação. Depois da fosforilação, a tirosina 1.162 é deslocada do sítio ativo e presume-se que irá estabilizar a nova conformação. Essas mudanças permitem a ligação do adenosina trifosfato (ATP) e estimulam intensamente a atividade catalítica do receptor<sup>9</sup>.

A ativação da tirosina quinase presente na subunidade  $\beta$  do receptor resulta numa imediata autofosforilação de seis resíduos de tirosina, onde a mutação em um dos três resíduos do domínio quinásico do receptor causa redução na magnitude do sinal insulínico e mutação nos três sítios inativa completamente o receptor. Carel et al<sup>11</sup> relatou em fibroblastos Rat-1 que a deleção de 43 aminoácidos do domínio C-terminal do receptor resulta na dissociação entre efeitos metabólicos e mitogênicos da insulina.

Proteínas quinases são enzimas que catalisam a transferência de grupos fosfatos para resíduos de aminoácidos das proteínas. No caso do receptor de insulina há uma reação de autofosforilação, levando a incorporação de grupos fosfatos dentro da subunidade  $\beta$  do receptor. A insulina estimula a fosforilação do receptor em 3-5 resíduos de tirosina, sendo que esse efeito é máximo em 1 minuto. A quinase uma vez ativada parece manter o estado fosforilado mesmo na ausência da insulina<sup>3</sup>. O receptor de insulina fosforila diretamente inúmeras proteínas, incluindo a família dos substratos do receptor de insulina (IRSs), proteína homóloga ao colágeno com domínio SH2 (Shc) e proteína ligante de fator de crescimento 2 (Grb-2)<sup>12</sup> (Figura 1).

Uma vez ativado, o receptor não sofre desfosforilação ou desativações espontâneas, sendo necessário um processo catalisado por uma proteína tirosina fosfatase celular para reverter os receptores ao seu nível basal, ou seja, no estado de quinase inativa. A principal tirosina fosfatase do IR é uma proteína integral de membrana chamada LAR (proteína integral de membrana relacionada a antígeno de leucócito)<sup>13</sup>.

Entre as tirosinas quinases específicas, o grande grupo dos receptores quinásicos ocupa um lugar especial devido a sua natureza transmembrânica, pois são capazes de interpretar diretamente o sinal extracelular e iniciar a cascata de sinalização dentro da célula<sup>14</sup>. Embora, saiba-se que esses receptores possuam um papel decisivo na tumorigênese, é importante enfatizar que eles também são reguladores cruciais do desenvolvimento, crescimento e diferenciação tanto no adulto quanto no embrião<sup>9</sup>. Análises moleculares de tumores humanos mostram que algumas malignidades estão associadas ao aumento da expressão ou amplificação de certos protooncogenes de receptores tirosina quinase. Para esses tumores nota-se uma forte relação estatística entre amplificação/superexpressão e o prognóstico clínico. Esses dados suportam a hipótese de que esses genes estão envolvidos, pelo menos, em estágios tardios do processo de transformação maligna, com a progressão tumoral e metástase. O gene humano codificador para o receptor de fator de crescimento epidérmico (EGFR) é encontrado amplificado em células de carcinoma de cabeça e pescoço e

em 40% dos gliomas malignos. Rearranjos do DNA nesse gene amplificado levam a deleções no domínio extracelular do receptor. Esses receptores truncados não se acoplam ao ligante extracelular, mas exibem uma atividade de fosforilação constante. Como a formação tumoral é geralmente considerada um processo constituído de múltiplos passos é difícil avaliar em tumores humanos qual o papel dessas alterações na expressão de protooncogenes ou estruturas que poderiam estar envolvidos na iniciação do tumor, progressão e metástase, ou seja, qual seria a consequência bioquímica e fisiológica e como poderiam contribuir para o fenótipo neoplásico. Um exemplo de superexpressão gênica de receptor tirosina quinase como responsável na formação de um tumor é fornecido pelo modelo de gênese de melanoma em peixe, onde o agente transformador identificado foi um novo membro da subclasse I (receptores relacionados ao fator de crescimento epidérmico-EGF) dos receptores tirosina quinásicos, o Xmrk (receptor tirosina quinase do peixe *Xiphophorus* semelhante ao receptor de fator epidérmico)<sup>14</sup>.

O IR é intimamente relacionado com o receptor do fator de crescimento 1 relacionado à insulina (IGFR-1)<sup>15</sup>, chegando a exibir 70% de homologia. Sabe-se que concentrações supra-fisiológicas de insulina ligam-se ao IGFR-1, o qual regula a proliferação das células *in vivo* e *in vitro*, através de três mecanismos diferentes: mitogênese, estabilização e manutenção do fenótipo transformado e proteção das células contra apoptose<sup>16</sup>. O mecanismo de autofosforilação quinásico é similar ao que ocorre com receptores tirosina quinase monoméricos de fatores de crescimento, como os receptores para fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGFR) e de fator de crescimento fibroblástico (FGFR) e EGFR<sup>15</sup>. A interação dos ligantes com receptores tirosina quinase geralmente faz com que receptores monoméricos se oligomerizem no plano da membrana e se autofosforilem através de uma reação intermolecular. Autofosforilação nos resíduos de tirosina dentro do domínio catalítico está associada com ativação enzimática, enquanto fosforilações em regiões não catalíticas do domínio citoplasmático providenciam sítios de ligação para proteínas sinalizadoras<sup>9</sup>. A transfosforilação de receptores monoméricos gera sítios que reconhecem proteínas efetoras detentoras de domínios SH2, as quais se associam diretamente com os respectivos receptores. Já a autofosforilação de receptor de insulina geralmente causa a ativação do seu substrato, o qual funciona como uma proteína de ancoragem para outras moléculas SH2<sup>15</sup>.

O IR também é fosforilado em resíduos de serina e treonina no estado basal e em resposta a estimulação das células por ésteres de forbol, análogos do AMPc e pela própria insulina. Algumas fosforilações em serina diminuem a atividade tirosina quinásica estimulada pela insulina<sup>7</sup>.

### Os Domínios SH2 e SH3

Vários componentes da via de transdução do sinal intracelular contêm regiões conhecidas como SH2 e SH3. Os

domínios SH2 e -3 são regiões homólogas aos sítios não catalíticos da família de tirosina quinase Src e, portanto, respectivamente denominados: homólogo 2 a Src (SH2) e homólogo 3 a Src (SH3). Os domínios SH2 são formados por uma cadeia lateral de arginina que interage com grupos fosfotirosina dos receptores tirosina quinásicos e outras proteínas citoplasmáticas. Os domínios SH3, por sua vez, apresentam grande afinidade por resíduos de prolina<sup>17</sup> e são encontrados em várias proteínas que se associam ao citoesqueleto e a membrana. As proteínas do citoesqueleto não possuem SH2, indicando que esses dois domínios não são obrigatoriamente inseparáveis. O papel dos domínios SH3 parece estar envolvido com localização subcelular. Sugere-se então que os domínios SH2 e -3, quando combinados, confirmam aos complexos multiproteicos, localização subcelular apropriada para a ativação de vias de transdução do sinal específicas<sup>18</sup>.

### Os Substratos do Receptor de Insulina (IRSs)

O substrato 1 do receptor de insulina (IRS-1), foi originalmente descoberto em células de hepatoma Fao como sendo uma ampla banda que surgiu durante a eletroforese em SDS-PAGE com uma massa molecular de aproximadamente 185 kDa, sendo chamada pp185. Foi subsequentemente identificado em várias outras células e tecidos estimulados pela insulina com peso variando de 160 a 190 kDa, sugerindo que sua fosforilação pode variar ou ser uma mistura de várias fosfoproteínas diferentes. O IRS-1 é imediatamente fosforilado após estimulação insulínica, indicando que exerça um papel importante nos passos iniciais da transdução do sinal pós-receptor<sup>19</sup> (Figura 1).

A partir de células mielóides foi descoberta e clonada uma proteína chamada 4PS, a qual exibia grande semelhança com o IRS-1, sendo posteriormente identificada como substrato 2 do receptor de insulina (IRS-2) e principalmente expressa no músculo, pulmão, cérebro, fígado, rins, coração e baço<sup>20</sup> (Figura 1).

Em adipócitos de ratos a insulina induz a fosforilação de uma proteína de 60 kDa, chamada pp60, a qual pode se associar a Fosfatidilinositol 3 quinase (PI3K)<sup>21</sup>. Posteriormente, essa proteína ficou conhecida como substrato 3 do receptor de insulina (IRS-3)<sup>22</sup> (Figura 1).

O substrato 4 do receptor de insulina (IRS-4) foi identificado por Lavan et al<sup>23</sup> sob a denominação de PY160. Esse novo membro da família das proteínas IRSs sofria fosforilação em tirosina após estímulo com insulina e IGF-1 em células HEK293, mas era imunologicamente distinta do IRS-1<sup>12</sup> (Figura 1).

As proteínas IRSs são compostas por um domínio terminal NH<sub>2</sub> de homologia pleckstrin (PH) e um domínio ligante a fosfotirosina (PTB), seguido por uma cauda terminal COOH contendo múltiplas regiões fosforiladas em tirosina. Os domínios PH e PTB são bem conservados em cada uma das proteínas IRSs e possuem uma estrutura quaternária comum, mas funcionam de maneira diferente quando acoplados ao IR. Estudos indicam que o domínio PH se ligue a fosfolipídios de

membrana ou regiões ácidas de várias proteínas<sup>10,24</sup> e embora não interajam diretamente com os receptores, esses domínios aparentemente são necessários para uma eficiente fosforilação em tirosina promovida pelo receptor<sup>12</sup>. O domínio PTB interage com regiões NPEY (N = asparagina; P = prolina; E = glutamato; Y = tirosina) fosforiladas na região de justamembrana da subunidade β do IR<sup>24</sup>. Os domínios PH e PTB do IRS-1 e -2 possuem uma similaridade de 69 e 75%, respectivamente<sup>23</sup>. O domínio PH do IRS-4 exibe um alto grau de homologia com o domínio presente no IRS-1, -2 e -3, sendo de 49, 50 e 43%, respectivamente. Por sua vez, o domínio PTB do IRS-4 também exibe um alto grau de homologia com o mesmo domínio dos IRS-1, -2 e -3, sendo 66, 62 e 43%, respectivamente<sup>23</sup>. A porção C-terminal dos domínios PH e PTB recebe o nome de domínios SAIN também conhecido por ligante NPXY (N = asparagina; P = prolina; X = qualquer aminoácido; Y = tirosina) de Shc e IRS-1, sendo que o IRS-1 possui um e o IRS-2 dois. Os domínios SAIN, também chamados domínios não-PTB, são importantes para a interação com o receptor e estão pouco conservados entre as diferentes moléculas de IRSs<sup>12</sup>. Esses resíduos são as regiões que se ligam às proteínas contendo domínios SH2, incluindo as subunidades regulatórias da PI3K (p85α, p55α, p50α, p83β e p55<sup>PIK</sup>), Grb-2, proteína multiadaptadora com estrutura de domínios SH3-SH3-SH3-SH2 (Nck), proteína tirosina quinase citoplasmática (c-fyn), fosfatase 2 que contem domínios de homologia SH2 (SH-PTP2 ou PTP1 D)<sup>24</sup> e fosfolipase Cγ (Plcγ)<sup>12</sup> (Figura 1).

Portanto, os IRSs podem ser vistos como proteínas com múltiplos sítios, os quais após a fosforilação em tirosina ativam várias vias sinalizadoras através da interação com proteínas contendo domínios SH2. Conseqüentemente, vários efeitos biológicos da insulina poderiam ser separados na altura da fosforilação desses substratos, e mesmo por diferentes sítios presentes nos IRSs. Alternativamente, o tempo de duração e magnitude do sinal poderia ser um importante fator de discriminação entre respostas biológicas diferentes<sup>5</sup>.

A ocorrência de quatro IRSs levanta uma questão que versa sobre a regra fisiológica de cada uma dessas proteínas. Apesar de similares, as IRSs possuem estruturas, padrões de fosforilação em tirosina pelo IR (e outros receptores) e associação com proteínas contendo domínios SH2 distintos, inclusive diferenças em relação a sua localização dentro da célula, onde o IRS-1/2 estão comumente associados a estruturas intracelulares, enquanto o IRS-3/4 estão associados à membrana plasmática<sup>25</sup>. Muitos estudos sugerem que o IRS-1 medeia preferencialmente os efeitos mitogênicos da insulina e do IGF-1, enquanto o IRS-2 parece estar mais envolvido com a geração da resposta metabólica da insulina<sup>26</sup>. Outros dados indicam que *in vivo* o IRS-1 talvez seja responsável pela sinalização do receptor de IGF-1 e o IRS-2 pela sinalização do receptor de insulina<sup>12</sup>. Dados evidenciam que IRS-1/2 compartilham efeitos biológicos, uma vez que no decorrer da estimulação insulínica o IRS-1 e -2 medeiam antiapoptose e síntese de DNA<sup>24</sup>, mas exercem papéis tecido-específicos, onde o IRS-1 poderia

exercer um papel proeminente no músculo esquelético, enquanto o IRS-2 poderia ser dominante no fígado<sup>26</sup>.

Enquanto IRS-1 e -2 são expressos ubiquamente, a expressão de IRS-4 é praticamente restrita à glândula pituitária e ao cérebro<sup>24</sup>, principalmente telencéfalo e mesencéfalo. O hipotálamo regula o comportamento de fome, acasalamento, nutrição, crescimento e controla respostas desencadeadas pelo baixo nível de glicose no sangue. Essa região do cérebro contém receptores de insulina, bem como outros receptores que podem potencialmente requerer o IRS-4 para a transdução do seu sinal<sup>25</sup>. O IRS-4 é expresso em células humanas, enquanto sua expressão em tecidos de camundongos está abaixo do nível de detecção<sup>12</sup>.

Fantim et al<sup>25</sup> trabalhando com camundongos demonstrou que animais desprovidos de IRS-1 são menores do que os controles e são levemente resistentes à insulina, exibem altos níveis plasmáticos desse hormônio e fraca tolerância a testes de glicose e insulina. Entretanto, seus níveis sanguíneos de glicose são normais no estado alimentado e não alimentado. Em contraponto, camundongos carentes em IRS-2 apresentam um tamanho semelhante aos seus respectivos controles, mas desenvolvem diabetes devido a uma combinação de resistência à insulina e incapacidade de proliferação das células  $\beta$  pancreáticas. Camundongos sem IRS-3 não apresentam defeitos no crescimento e nem na homeostase de glicose. Por fim, camundongos deficientes em IRS-4 não exibem resistência à insulina e apresentam tamanho ligeiramente menor. Por esses dados, pode-se inferir que o IRS-1 exerce um papel importante no crescimento, enquanto o IRS-2 desempenha uma função admirável na proliferação das células  $\beta$  pancreáticas e ambos cumprem ação na responsividade a insulina dos tecidos mais importantes. Por outro lado, IRS-3 e -4 parecem não ter um papel muito importante em nenhum desses processos. A falta do IRS-3 pode ser suprida pela presença de IRS-1 e -2. A ausência de um fenótipo marcante devido à falta de IRS-4 não é surpresa, visto que sua expressão é baixa em camundongos<sup>12</sup>.

Sabe-se que o IRS-4 interage com proteínas contendo domínios SH2 como a PI3K, Grb-2, proteína adaptadora II (Crk-II) e a proteína adaptadora semelhante a Crk (CrkL)<sup>12</sup>, além disso, observações feitas em células 32D em relação às diferenças na transdução do sinal mostraram que o IRS-1 e -4 se ligam fortemente a Grb-2 e aumentam a ativação de proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) durante a estimulação insulínica. O IRS-4 não possui os sítios de ligação SH2 na terminação COOH, portanto esta proteína promove uma fraca ativação da PI3K devido à inabilidade do receptor de insulina em fosforilar suas regiões YXXM (Y = tirosina; X = qualquer aminoácido; M = metionina). Entretanto, os sinais mediados pelo IRS-4 são suficientes para estimular a atividade da PI3K e ativar a proteína quinase B/Akt (PKB/Akt), mas falham em promover a ativação da proteína quinase de fração ribossomal S6 (p70<sup>sk</sup>). Na presença de interleucina 3 (IL-3), o IRS-4 promove apoptose através de um mecanismo

não conhecido. Esse dado é uma demonstração clara da diferente capacidade sinalizadora do IRS-4 quando comparado a IRS-1 e -2<sup>24</sup>.

Os IRS-1 e -2 foram encontrados como componentes da via de sinalização de outros receptores como o hormônio de crescimento (GH), interleucina-9 (IL-9), interferon  $\alpha$  (INF $\alpha$ ), interferon  $\gamma$  (INF $\gamma$ ) e o fator inibidor de leucemia (LIF). Esses receptores de citocinas utilizam vários componentes da família da Janus quinase (JK) para mediar a fosforilação de IRS-1 e -2<sup>15</sup>. Os outros fatores de crescimento podem ativar os mesmos intermediários sinalizadores (geralmente em um grau maior que a insulina), mas não são capazes de mimetizar os aspectos metabólicos da ação insulínica<sup>27</sup>.

A via de sinalização regulada pelo IRS-1 que inibe a apoptose durante estimulação insulínica talvez seja independente da PI3K. Há ainda estudos que sugerem que os produtos da PI3K amplificam o sinal antiapoptótico independente da fosfotirosina através do recrutamento de elementos essenciais para a membrana plasmática<sup>24</sup>.

### Fosfatidilinositol 3 quinase (PI3K)

Fosfatidilinositol 3 quinase (PI3K) é um efetor da via de sinalização usada por vários receptores tirosina quinase, incluindo o IR e o IGF-IR<sup>28</sup> (Figura 1).

A PI3K é uma enzima heterodimérica sinalizadora composta por uma subunidade catalítica (p110) associada a uma subunidade regulatória (p85)<sup>24</sup>. A p85 é formada por um domínio SH3, domínio que contém homologia à região de quebra (BCR), flanqueada por duas seqüências ricas em prolina, dois domínios SH2 e uma região inter-SH2 que contém o sítio de ligação com a subunidade catalítica p110. A interação dos domínios SH2 da subunidade reguladora da PI3K com regiões específicas YXXM (Y = tirosina; X = qualquer aminoácido; M = metionina) fosforiladas em tirosina presentes nos próprios receptores e nas proteínas sinalizadoras intermediárias, tais como IRS-1 e IRS-2, induz a atividade enzimática da subunidade catalítica, p110<sup>28</sup>. Os produtos lipídicos da PI3K medeiam a ativação de várias serina/treonina quinases, incluindo a quinase 1 e 2 dependentes de fosfolipídio (PDK1/PDK2), PKB/Akt, proteína quinase C $\xi$  (PKC $\xi$ ), proteína quinase C $\lambda$  (PKC $\lambda$ ), p70<sup>sk</sup>, entre outras. Essas serina/treonina quinases desempenham funções na regulação de várias respostas biológicas decorrentes da ativação de PI3K, incluindo ativação do transporte de glicose, síntese de glicogênio, síntese de proteínas, lipogênese, antilipólise, mitogênese e antiapoptose<sup>24</sup>.

Sabe-se que IR e IGF-1R ativados podem se associar diretamente com a subunidade p85 da PI3K, a qual interage com a região C-terminal dos receptores, portanto, deve existir um mecanismo de ativação da PI3K independente dos IRSs. Embora ambos os receptores sejam capazes de interagir a subunidade p85, isso ocorre de uma maneira distinta, onde o IR é mais eficiente nessa interação, resultando em respostas diferentes<sup>28</sup>.

### **Proteína Homóloga ao Colágeno com Domínio SH2 (Shc)**

A proteína Shc recebeu esse nome devido à presença do domínio SH2 e sua homologia ao colágeno (Fig. 1). Existem múltiplas proteínas Shc, as quais são implicadas na sinalização mitogênica de vários receptores tirosinas quinases, incluindo PDGFR e EGFR, interleucina-2 (IL-2), interleucina-3 (IL-3), fator estimulador de colônia em macrófago e granulócito (GM-CSF) e insulina<sup>29</sup>.

### **Proteína Ras**

A fosforilação em tirosina dos IRSs ou proteínas Shc pelo receptor tirosina quinase induz sua associação com o domínio SH2 da pequena proteína adaptadora Grb-2<sup>4</sup>. O domínio SH2 da Grb-2 é flanqueado por dois domínios SH3, os quais medeiam a sua ligação com o SOS (“Son of Sevenless”). A estimulação de células com agentes como insulina e fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF), resultam na fosforilação em serina/treonina de SOS e sua dissociação do complexo Grb2-SOS (Fig. 1). O SOS é responsável pela troca de guanosina difosfato (GDP) por guanosina trifosfato (GTP) na proteína Ras (codificada pelo proto-oncogene *ras*). Uma vez ligada o estado ligado ao GTP, a Ras se associa com membros da família de proteínas quinase Raf (uma quinase de serina/treonina), ativando esta última<sup>30</sup>. A Raf ativada pode fosforilar a proteína quinase quinase ativada por mitógeno (MAPKK ou MEK), uma quinase específica de ação dupla que catalisa a fosforilação em treonina e tirosina da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK ou ERK), promovendo sua ativação. A MAPK por sua vez fosforila inúmeros fatores de transcrição nucleares e proteínas citoplasmáticas envolvidas na regulação de síntese macromolecular e mitogênese, tais como fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA2), p70<sup>S6K</sup> e a quinase S6 ribossomal p90 (p90<sup>Rsk</sup>)<sup>4</sup> (Figura 1). Dessa forma, Ras funciona como uma molécula chave na conversão de sinais antecedentes para eventos posteriores envolvendo fosforilações de serina/treonina quinases<sup>30</sup>. Há evidências que indicam que as proteínas IRSs aparentemente não estão envolvidas com a ativação da Ras, pois tal ativação ocorre em células desprovidas de IRSs ou expressando um mutante, portanto, a ativação da Ras deve ser mediada pela fosforilação exclusiva de Shc. Entretanto, a ativação de Ras é insuficiente para desencadear a mitogênese em células deficientes em IRSs, indicando que este também deve ser responsável pelo acoplamento de outra via independente de Ras, mas importante para a mitogênese dependente de estimulação insulínica<sup>15</sup>.

### **A Proteína Quinase B/Akt (PKB/Akt)**

A regulação da proteína quinase B (PKB/Akt) envolve o recrutamento de várias quinases para a membrana plasmática (Fig. 1). O domínio PH da PKB/Akt interage com os produtos da PI3K, recrutando a PKB/Akt para a membrana plasmática e expondo-a para quinases dependentes de fosfolípidios associadas à membrana. A PDK1 também se associa à

membrana plasmática através da interação com o domínio PH dos produtos da PI3K, catalizando a fosforilação da PKB/Akt<sup>30</sup>.

### **Proteína Tirosina Fosfatase 1D (PTP1D)**

Proteína tirosina fosfatase 1D (PTP1D), também conhecida como SH-PTP2, SH-PTP3, PTP2C e Syp, é uma enzima citoplasmática com dois domínios Src (domínios de tirosina fosforilas) de homologia 2 (SH2), sendo expressa numa grande variedade de tipos celulares (Figura 1). Após estimulação das células com vários fatores de crescimento distintos, PTP1D torna-se fosforilada em tirosina e associa-se com receptores ativados ou tirosina quissas citoplasmáticas via seus domínios SH2. Estudos demonstraram que a PTP1D é necessária para a transdução do sinal gerado pela ativação do receptor de PDGF e de insulina, sendo capaz de ligar-se ao IRS-1 (Figura 1). Em contraste com o que ocorre com a via do receptor de PDGF, a ativação do receptor de insulina não resulta na fosforilação em tirosina dos resíduos do PTP1D, impedindo sua ligação ao complexo Grb2-SOS, indicando que o efeito positivo dessa fosfatase na sinalização insulínica deve ser mediado por outro mecanismo. Sabe-se que seu envolvimento crítico na sinalização da insulina esta relacionada com a regulação da captação de glicose<sup>31</sup>.

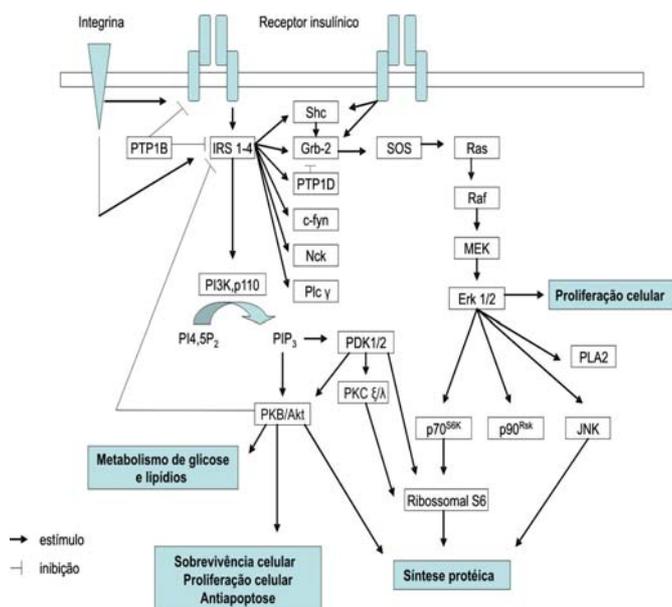
### **Proteína Tirosina Fosfatase 1B (PTP1B)**

A proteína tirosina fosfatase 1B (PTP1B) esta predominantemente localizada na superfície citossólica do retículo endoplasmático. Essa tirosina fosfatase exerce o principal papel na regulação da atividade do IR<sup>32</sup>, sendo considerada um regulador negativo da sinalização insulínica, após sua fosforilação direta por esse receptor<sup>33</sup> (Figura 1). A PTP1B não somente desfosforila o IR ativado pela ligação com a insulina, mas também regula o percussor do IR durante a sua biossíntese<sup>32</sup>. Esse fato é bem evidenciado em camundongos “knockout”, pois mostra que a falta de PTP1B esta associada a um aumento na sensibilidade insulínica, como também na resistência à obesidade. Esses estudos mostram que a inibição da PTP1B prove uma via atrativa para a utilização desse processo como uma terapia contra o diabetes tipo 2 e a obesidade<sup>34</sup>.

### **Integrinas**

Estudos prévios demonstraram a existência de uma ligação entre as vias de sinalização utilizadas pelas integrinas e aquelas empregadas pelos fatores de crescimento. Acredita-se que adesão seja necessária para que os fatores de crescimento induzam completamente seus efeitos intracelulares. Por exemplo: integrinas  $\alpha_5\beta_1$  exercem sinergia com o sinal insulínico em células ovarianas de hamster chinês. Esses efeitos podem ser mediados através do aumento da fosforilação em tirosina do receptor e de seus substratos, pois as integrinas podem potencializar a via de sinalização da insulina e do IGF-1, através da regulação da expressão de IRS-1 (Figura 1). Uma falha na adesão induz uma rápida diminuição do RNAm do IRS-1. Sabe-se que as integrinas induzem o recrutamento e

ativação de tirosina quinases como a proteína quinase ativadora de c-jun (JNK), proteína quinase de adesão local (FAK), Src e a via das MAPK. Além disso, há evidências de que as integrinas podem regular a transcrição do gene que codifica para IRS-1 (Figura 1) via ativação de JNK mediada pela FAK. Também foi demonstrado que FAK interage diretamente com o IRS-1, levando a fosforilação em tirosina deste último e sua conseqüente interação com proteínas que possuem o domínio SH2, tais como p85, Grb-2 e PTP1 D, além de ativar a PI3K<sup>26</sup>.



**Figura 1.** Insulina atua via receptores do tipo tirosina quinase presentes na membrana celular, estimulando a fosforilação dos substratos do receptor insulínico (IRSs). A fosforilação das proteínas IRS(s) em seus resíduos de tirosina inicia uma complexa cascata de transdução de sinal, envolvendo a captação de glicose, metabolismo, síntese de proteínas e sobrevivência celular.

## REFERÊNCIAS

1. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. *Molecular biology of the cell*. 3<sup>th</sup> ed. New York & London: Garland Publishing, Inc., 1994. 1294pp.
2. Jehle PM, Lutz MP, Fussgaenger RD. High affinity binding sites for proinsulin in human IM-9 lymphoblasts. *Diabetologia* 1996; 39(4): 421-32.
3. al-Habori M. Mecanism of insulin actin, role of ions and the cytoskeleton. *Int J Biochem* 1993; 25(8): 1087-99.
4. Lazar DF, Wiese RJ, Brady MJ, Mastick CC, Waters SB, Yamauchi K, et al. Mitogen-activated protein kinase inhibition does not block the stimulation of glucose utilization by insulin. *J Biol Chem* 1995; 270(35): 20801-7.
5. Hansen BF, Danielsen GM, Drejer K, Sorensen AR, Wiberg FC, Klein HH, et al. Sustained signalling from the insulin receptor after stimulation with insulin analogues exhibiting increase mitogenic potency. *Biochem J* 1996; 315 (Pt 1): 271-9.

6. Stralfors P. Insulin second messengers. *Bioessays* 1997; 19(4): 327-35.
7. White MF, Kahn CR. The insulin signaling system. *J Biol Chem* 1994; 269(1): 1-4.
8. Wiese RJ, Herrera R, Lockwood DH. Glycosylation sites encoded by exon 2 of the human insulin receptor gene are not required for the oligomerization, ligand binding, or kinase activity of the insulin receptor. *Receptor* 1995; 5 (1): 71-80. Erratum in: *Receptor* 1995 Summer; 5(2): 143.
9. Pawson T. Signal transduction. Look at a tyrosine kinase. *Nature* 1994; 372(6508): 726-7.
10. Cheatham B, Kahn CR. Insulin action and the insulin signaling network. *Endocr Rev* 1995; 16(2): 117-42.
11. Carel K, DePaolo D, Reusch JE, Leitner JW, Draznin B. Reduced phosphorylation of mitogen-activated protein kinase kinase in response to insulin in cells with truncated C-terminal domain of insulin receptor. *Endocrinology* 1996; 137(6): 2362-6.
12. Qu BH, Karas M, Koval A, LeRoith D. Insulin receptor substrate-4 enhances insulin-like growth factor-1-induced cell proliferation. *J Biol Chem* 1999; 274(44): 31179-84.
13. Zhang WR, Li PM, Oswald MA, Goldstein BJ. Modulation of insulin signal transduction by eutopic overexpression of the receptor-type protein-tyrosine phosphatase LAR. *Mol Endocrinol* 1996; 10(5): 575-84.
14. Malitschek B, Fornzler D, Schartl M. Melanoma formation in *Xiphophorus*: a model system for the role of receptor tyrosine kinase in tumorigenesis. *Bioessays* 1995; 17(12): 1017-23.
15. Waters SB, Pessin JE. Insulin receptor substrate 1 and 2 (IRS1 and IRS2): what a tangled web we weave. *Trends Cell Biol* 1996; 6(1): 1-4.
16. D'Ambrosio C, Ferber A, Resnicoff M, Baserga R. A soluble insulin-like growth factor I receptor that induces apoptosis of tumor cells *in vivo* and inhibits tumorigenesis. *Cancer Res* 1996; 56(17): 4013-20.
17. Triana BEG, Bernabeu AS, Pinheiro JCG, Milián MB. NADPH-oxidase fagocítica: componentes, ensamblaje y mecanismo de acción. *Rev Cubana Invest Biomed* 2001; 20(1): 59-63.
18. Koch CA, Anderson D, Moran MF, Ellis C, Pawson T. SH2 and SH3 domains: elements that control interactions of cytoplasmic signalling proteins. *Science* 1991; 252(5006): 668-74.
19. Miralpeix M, Sun XJ, Backer JM, Myers MG Jr, Araki E, White MF. Insulin stimulates tyrosine phosphorylation of multiple high molecular weight substrates in Fao hepatome cells. *Biochemistry* 1992; 31(37): 9031-9.
20. Sun XJ, Wang LM, Zhang Y, Yenush L, Myers MG Jr, Glasheen E, et al. Role of IRS-2 in insulin and cytokine signalling. *Nature* 1995; 377(6545): 173-7.
21. Lavan BE, Lienhard GE. The insulin-elicited 60-kDa phosphotyrosine protein in rat adipocytes is associated with phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* 1993; 268(8): 5921-8.

22. Anai M, Ono H, Funaki M, Fukushima Y, Inukai K, Ogihara T, et al. Different subcellular distribution and regulation of expression of insulin receptor substrate (IRS)-3 those of IRS-1 and IRS-2. *J Biol Chem* 1998; 273(45): 29686-92.
23. Lavan BE, Fantin VR, Chang ET, Lane WS, Keller SR, Lienhard GE. A novel 160-kDa phosphotyrosine protein in insulin-treated embryonic kidney cells is a new member of the insulin receptor substrate family. *Amer Soc Biochem Mol Biol* 1997; 272(34): 21403-7.
24. Uchida T, Myers MG Jr, White MF. IRS-4 mediates protein kinase B signaling during insulin stimulation without promoting antiapoptosis. *Mol Cell Biol* 2000; 20(1): 126-38.
25. Fantin VR, Wang Q, Lienhard GE, Keller SR. Mice lacking insulin receptor substrate 4 exhibit mild defects in growth, reproduction, and glucose homeostasis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000; 278(1): E127-33.
26. Lebrum P, Baron V, Hauck CR, Schlaepfer DD, Van Obberghen EV. Cell adhesion kinase regulate insulin receptor substrate-1 expression. *J Biol Chem* 2000; 275(49): 38371-7.
27. Draznin B. Insulin signaling network—waiting for Copernicus. *Endocrinology* 1996; 137(7): 2647-8.
28. Tartare-Deckert S, Murdaca J, Sawka-Verhelle D, Holt DH, Pessin JE, Van Obberghen E. Interaction of the molecular weight 85K regulatory subunit of the phosphatidylinositol 3-kinase with the insulin receptor and the insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor. Comparative study using the yeast two-hybrid system. *Endocrinology* 1996; 137(3): 1019-24.
29. Gustafson TA, He W, Craparo A, Schaub CD, O'Neill TJ. Phosphotyrosine-dependent interaction of SHC and insulin receptor substrate 1 with the NPEY motif of the insulin receptor via a novel non-SH2 domain. *Mol Cell Biol* 1995; 15(5): 2500-8.
30. Holt KH, Kasson BG, Pessin JE. Insulin stimulation of a MEK-dependent but ERK-independent SOS protein kinase. *Mol Cell Biol* 1996; 16(2): 577-83.
31. Kharitonkov A, Schnekenburger J, Chen Z, Knyazev P, Ali S, Zwick E, et al. Adapter function of protein-tyrosine phosphatase 1D in insulin receptor/insulin receptor substrate-1 interaction. *J Biol Chem* 1995; 270(49): 29189-93.
32. Issad T, Boute N, Boubekeur S, Lacasa D. Interaction of PTPB with the insulin receptor precursor during its biosynthesis in the endoplasmic reticulum. *Biochimie* 2005; 87(1): 111-6.
33. Pasquali C, Curchod ML, Walchli S, Espanel X, Guerrier M, Arigoni F, et al. Identification of protein tyrosine phosphatases with specificity for the ligand-activated growth hormone receptor. *Mol Endocrinol* 2003; 17(11): 2228-39.
34. Ukkola O, Santaniemi M. Protein tyrosine phosphatase 1B: a new target for the treatment of obesity and associated co-morbidities. *J Intern Med* 2002; 251(6): 467-75.

# Influência da irradiação gama na destruição de fumonisina B<sub>1</sub> em farinha de milho e de aflatoxina M<sub>1</sub> em leite fluido e em pó

## Gamma-irradiation effect on fumonisin B<sub>1</sub> inactivation in corn flour and on aflatoxin M<sub>1</sub> in fluid and powdered milk

RIALA6/1083

Guilherme PRADO<sup>1\*</sup>, Alexandre S. LEAL<sup>2</sup>, Marize S. OLIVEIRA<sup>1</sup>, Vanessa D. MORAES<sup>1</sup>, Jovita E. C. M. GAZZINELLI<sup>1</sup>, Ionara F. R. VIEIRA<sup>2</sup>, Adriana S. LIMA<sup>1</sup>, Ana Paula A. MOREIRA<sup>1</sup>, Mabel A. CALDEIRA<sup>1</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Fundação Ezequiel Dias, Laboratório de Micologia e Micotoxinas, Rua Conde Pereira Carneiro, 80. Gameleira, 30510010. Belo Horizonte/MG. (31) 33719462 [gui@funed.mg.gov.br](mailto:gui@funed.mg.gov.br)

<sup>2</sup>Comissão Nacional de Energia Nuclear CNEN/Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear CDTN – Campus/UFMG. (31) 34993308. [asleal@cdtn.br](mailto:asleal@cdtn.br).

Recebido: 18/07/2006 – Aceito para publicação: 18/10/2006

### RESUMO

Fumonisin B<sub>1</sub> é a micotoxina produzida por *Fusarium verticillioides* e *Fusarium proliferatum* e é encontrada principalmente em milho e produtos a base de milho. Desde sua descoberta a fumonisina B<sub>1</sub> tem sido associada a doenças em animais, como leucoencefalomalácia em cavalos e edema pulmonar em suínos. Em humanos, o consumo de alimentos com fumonisina B<sub>1</sub> tem sido associado com câncer esofágico. A aflatoxina M<sub>1</sub> é o principal metabólito hidroxilado encontrado no leite de animais que consumiram rações contaminadas com aflatoxina B<sub>1</sub>, bem como no leite de lactantes que consumiram alimentos com esta substância. Neste estudo foi verificado o efeito da irradiação gama (<sup>60</sup>Co), em doses que variaram de 0 a 20 kGy, quanto à capacidade de inativar fumonisina B<sub>1</sub> em farinha de milho e aflatoxina M<sub>1</sub> em leite fluido e em pó. A fumonisina B<sub>1</sub> foi extraída das amostras com metanol:água (8:2). O extrato foi purificado em coluna de imunoafinidade, seguido de separação e quantificação por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector de fluorescência, após derivatização com orto-ftaldialdeído. Para efetuar a determinação da aflatoxina M<sub>1</sub>, a amostra foi purificada em coluna de imunoafinidade e a separação e a quantificação por meio de CLAE com detector de fluorescência. Foi observada uma redução da concentração da fumonisina B<sub>1</sub> na faixa de 11,2 % a 55,5% em doses de 3 a 20 kGy de irradiação gama (<sup>60</sup>Co). A concentração de aflatoxina M<sub>1</sub> foi reduzida em 86,8 % e 37,9%, respectivamente no leite fluido e em pó, em dose de 20 kGy de radiação gama.

**Palavras-chave.** farinha de milho, leite, fumonisina B<sub>1</sub>, aflatoxina M<sub>1</sub>, irradiação gama.

### ABSTRACT

Fumonisin B<sub>1</sub> is a mycotoxin produced by *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum*, and it is found chiefly in corn and corn-based products. Since its discovery fumonisin B<sub>1</sub> has been associated with diseases in animals, such as leukoencephalomalacia in horses, and pulmonary edema in swine. On humans, the ingestion of foods with fumonisin B<sub>1</sub> is associated with esophageal cancer. Aflatoxin M<sub>1</sub> is the principal hydroxylated metabolite occurring in milk from animals which have consumed aflatoxin B<sub>1</sub>-contaminated feeds. It is also present in milk from nursing mothers who consumed foodstuffs with aflatoxin B<sub>1</sub>. In this study the effect of gamma-irradiation (<sup>60</sup>Co) was verified, in doses ranged from 0 to 20 kGy, in order to inactivate fumonisin B<sub>1</sub> in corn flour and aflatoxin M<sub>1</sub> in fluid and powdered milk. Fumonisin B<sub>1</sub> was extracted from the samples with methanol:water (3:1). The extract was purified through immunoaffinity column followed by separation and quantification by means of high-performance liquid chromatography (HPLC) with o-phthalaldehyde (OPA). For determining aflatoxin M<sub>1</sub> the purification was done through immunoaffinity column followed by separation and quantification by means of HPLC with fluorescence detector. Gamma irradiation (<sup>60</sup>Co) at doses from 3 to 20 kGy reduced the fumonisin

B<sub>1</sub> content in a range of 11.2 % to 55.5 %. Gamma irradiation (<sup>60</sup>Co) at 20 kGy dose reduced aflatoxin M<sub>1</sub> concentration in 86.8 % and 37.9 % in milk fluid and powdered milk, respectively.

**Key words.** corn flour, milk, fumonisin B<sub>1</sub>, aflatoxin B<sub>1</sub>, aflatoxin M<sub>1</sub>, gamma-irradiation.

## INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de processos de preservação de alimentos com a finalidade de aumentar a vida de prateleira e manter sua segurança é um fator estratégico e dominante na situação alimentar mundial. Para suprir a necessidade de alimentos e reduzir a pobreza e considerando a expectativa populacional de 8,3 bilhões de pessoas para o ano de 2025, o mundo irá precisar aumentar substancialmente a produtividade agrícola e aperfeiçoar as práticas de pós-colheita, armazenamento e distribuição<sup>1</sup>.

A contaminação fúngica tem sido responsável pela inevitável perda de qualidade dos alimentos, tornando-os impróprios para o consumo e resultando em grandes perdas econômicas. Os efeitos da invasão fúngica podem provocar: (1) diminuição do poder de germinação; (2) redução na quantidade de carboidratos, proteínas e gordura e aumento no teor de umidade e ácidos graxos livres; (3) alteração da coloração, sabor e aroma, modificando a qualidade organoléptica dos alimentos; (4) produção de micotoxinas<sup>2-6</sup>.

A contaminação de alimentos com micotoxinas é freqüente em regiões tropicais e subtropicais, como o Brasil, onde o clima favorece o desenvolvimento de fungos toxigênicos, principalmente em amendoim e milho<sup>7</sup>.

As micotoxinas são produtos de metabolismo secundário de fungos filamentosos sintetizados durante seu desenvolvimento natural nos alimentos. Apresentam relativa estabilidade química, permanecendo nos produtos alimentícios mesmo após a remoção dos fungos através dos processos usuais de processamento e estocagem<sup>8</sup>.

Fumonisininas são micotoxinas produzidas por *Fusarium* sp (*F. verticillioides* e *F. proliferatum*) encontradas principalmente em milho e derivados. No Brasil, a contaminação destes produtos com fumonisininas atinge percentuais superiores a 90%<sup>9-13</sup>.

Neste grupo, a micotoxina mais comumente encontrada é a fumonisina B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>), tendo sido associada a doenças em animais, como leucoencefalomalácia em cavalos e edema pulmonar em suínos. Embora o efeito em humanos não esteja claramente estabelecido, estatisticamente está associado ao câncer esofágico em algumas regiões como Transkei na África do Sul<sup>14-16</sup>.

Aflatoxina M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>) é o principal metabólito hepato carcinogênico excretado no leite de animais que consumiram rações contaminadas com aflatoxina B<sub>1</sub> estando presente em

leite pasteurizado e ultrapasteurizado, leite em pó, queijo, iogurte e leite humano<sup>17-24</sup>.

Vários métodos de preservação têm sido descritos para impedir o crescimento de fungos e produção de aflatoxinas, tais como fumigação, amônia, luz ultravioleta, tratamento pelo calor, solventes químicos, mas nenhum desses métodos oferece completo controle dos fungos toxigênicos e das micotoxinas. Além do mais, efeitos nocivos à saúde humana e ao meio ambiente, associados aos resíduos, limitam a aplicação química em grande extensão. Conseqüentemente, o tratamento por irradiação gama, utilizando fonte de <sup>60</sup>Co, também chamada de esterilização a frio, tem sido investigado como processo alternativo para a preservação de alimentos<sup>25-32</sup>.

No Brasil, a legislação que trata do emprego da irradiação em alimentos é a Resolução RDC N.º 21, de 26 de janeiro de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. As doses a serem aplicadas devem ser compatíveis com os efeitos desejados, não tendo a legislação fixado valores mínimos ou máximos<sup>33</sup>.

Poucas referências foram encontradas na literatura científica sobre influência da irradiação gama sobre a estabilidade de FB<sub>1</sub> em milho e AFM<sub>1</sub> em leite. Desta forma, o objetivo do trabalho foi avaliar a eficiência da irradiação gama (<sup>60</sup>Co) no controle de FB<sub>1</sub> em farinha de milho e de AFM<sub>1</sub> em leite fluido e em pó.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Amostras

Foi utilizada uma amostra de farinha de milho naturalmente contaminada com FB<sub>1</sub> em uma concentração média de 534,5 ng/g e leite ultrapasteurizado e em pó contaminado com AFM<sub>1</sub> em concentração média de 328,4 ng/L e 290 ng/kg, respectivamente.

### Metodologia de irradiação

O processo de irradiação foi conduzido e executado no Laboratório de Irradiação Gama do Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear - CDTN/MG. A taxa de dose foi ao redor de 6,0 kGy.h<sup>-1</sup>. A farinha de milho foi irradiada em níveis de 0, 1, 3, 5, 10 e 20 kGy. Para o leite líquido foram utilizadas as doses de 0, 3, 5, 10, 15 e 20 kGy. No

leite em pó foram aplicadas as doses de 0, 5, 10 e 20 kGy. O experimento foi efetuado à temperatura ambiente.

### Quantificação de fumonisina B<sub>1</sub>

A metodologia utilizada envolveu extração da fumonisina com metanol:água (8:2), purificação em coluna de imunoafinidade (VICAM) e quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência (Sistema Shimadzu equipado com bomba LC-10AD, injetor automático SIL-10AF e detector de fluorescência RF-551), após derivatização com ortoftaldialdeído (OPA). Utilizou-se coluna Shim-pack CLC-ODS RP-18 (250 mm x 4,6 mm, partícula de 5 µm) e pré-coluna Shim-pack G-ODS (25 mm x 4,6 mm, partícula de 5 µm). A fase móvel utilizada isocraticamente foi acetonitrila:ácido acético 1 % (50:50). O resíduo da amostra foi ressuspensionado com 800 µL de acetonitrila:água (1:1) e, segundos antes da injeção foi adicionado 200 µL de solução de OPA. O volume injetado foi de 20 µL em um fluxo de 0,8 mL/min. As injeções ocorreram dentro de 2 minutos. Para determinação da curva de calibração foi utilizada soluções de fumonisina B<sub>1</sub> nas concentrações de 100 a 1000 ng/mL. Os comprimentos de onda de excitação e emissão foram 335 nm e 440 nm, respectivamente. Nestas condições o tempo de retenção da FB<sub>1</sub> foi de 8-10 minutos. A recuperação do método foi de 88 % e os limites de detecção e quantificação foram, respectivamente, 50 ng/g e 100 ng/g<sup>34</sup>.

### Quantificação de aflatoxina M<sub>1</sub>

O método utilizado foi o descrito por Tuinstra et al.<sup>35,36</sup>. A AFM<sub>1</sub> foi extraída do leite após passagem da amostra em coluna de imunoafinidade (VICAM) e quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector de fluorescência (Sistema Shimadzu equipado com bomba LC-10AD, injetor automático SIL-10AF e detector de fluorescência RF-551). A separação por CLAE foi conduzida em coluna Shim-pack CLC-ODS RP-18 (250 mm x 4,6 mm, partícula de 5 µm) e pré-coluna Shim-pack G-ODS (25 mm x 4,6 mm, partícula de 5 µm). A toxina foi eluída isocraticamente com água: isopropanol: acetonitrila (80: 12: 8) a um fluxo de 1 mL/min. Os comprimentos de onda de excitação e emissão foram 366nm e 428nm, respectivamente. O tempo de retenção obtido foi aproximadamente de 10 minutos. A recuperação do método foi de 93 % na faixa de 15 a 85 ng/L. Os limites de detecção e quantificação foram, respectivamente, 2 ng/L e 6 ng/L.

### Análise estatística

Em todos os experimentos efetuados os resultados foram avaliados pelo Teste F para constatar a presença de efeitos significativos (p < 0,05). Nestes casos foi aplicado o Teste de Tukey para determinar as diferenças entre as médias<sup>37,38</sup>.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do efeito da irradiação gama (<sup>60</sup>Co) na destruição de fumonisina B<sub>1</sub> em amostra de farinha de milho naturalmente contaminada são mostrados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Teores de fumonisina B<sub>1</sub> em farinha de milho após irradiação gama (<sup>60</sup>Co) a 0, 1, 3, 5, 10 e 20 kGy e análise em quatro repetições.

Dose de Irradiação (kGy)	Fumonisina B <sub>1</sub> (µg.Kg <sup>-1</sup> )	Média* (µg.Kg <sup>-1</sup> ) (% de Redução)	Coefficiente de Variação (%)
0	566,67	534,50a	17,29
	462,15		
	458,30		
	650,97		
1	572,73	474,61b (11,2)	15,07
	476,87		
	405,94		
	442,88		
3	369,67	284,37c (46,8)	21,47
	284,57		
	230,18		
	253,07		
5	321,73	237,77c (55,5)	25,47
	239,68		
	206,24		
	183,42		
10	304,97	257,59c (51,8)	15,57
	211,79		
	272,33		
	241,29		
20	293,81	316,38c (40,8)	10,62
	349,33		
	281,68		
	340,69		

\*Médias com a mesma letra na vertical não diferem entre si pelo Teste de Tukey em 5 % de probabilidade.

Dose de irradiação gama de 1 kGy provocou uma redução na concentração de fumonisina B<sub>1</sub> para 474,61 ng/g (11,2 %) a partir do valor original de 534,5 ng/g. Com dose de 3 kGy a redução do nível de fumonisina B<sub>1</sub> foi de 46,8 %, com 5 kGy de 55,5 %, 10 kGy de 51,8 % e com 20 kGy a redução de fumonisina B<sub>1</sub> foi de 40,8 %. Não foi observada diferença significativa (p < 0,05) pelo Teste de Tukey entre os valores médios de fumonisina B<sub>1</sub>, quando a irradiação gama foi de 3, 5, 10 e 20 kGy. Visconti et al.<sup>39</sup> verificaram uma redução de 20 % no conteúdo da FB<sub>1</sub> em milho naturalmente contaminado, após irradiação gama em dose de 15 kGy. Ferreira<sup>40</sup> avaliando o efeito da radiação gama em amostras de milho inoculadas com *Fusarium verticillioides*, demonstrou que em dose de 10 kGy foi possível reduzir em 62,5 % a concentração de fumonisina B<sub>1</sub>.

O processamento térmico (cozimento, fritura, torração e extrusão) do milho, em temperatura na faixa de 150 a 200°C,

reduz a concentração de FB<sub>1</sub> no produto final. Cerca de 80 % da fumonisina B<sub>1</sub>, naturalmente presente em farinha de milho, é destruída após tratamento a 190 °C durante 60 minutos e a 220 °C por 25 minutos a recuperação é nula<sup>41-44</sup>. Em função dos valores obtidos de destruição da fumonisina B<sub>1</sub>, a aplicação da irradiação gama neste alimento, com o propósito específico de destruir esta micotoxina não é recomendada.

Entretanto, diferentes relatos descritos na literatura revelaram a efetividade da irradiação gama na destruição de outras micotoxinas em diferentes alimentos. Aziz et al<sup>25</sup> verificaram que radiação gama na dose de 8 kGy, em farinha de trigo e pão, foi capaz de eliminar completamente outras toxinas de *Fusarium* como desoxinivalenol e toxina T-2. Da mesma forma, Aziz e Moussa<sup>45</sup> observaram que dose de 5 kGy em frutas (morango, ameixa, uva, maçã, pêra, amora), foi capaz de reduzir completamente os níveis de ácido penicílico, patulina, ocratoxina A e ácido ciclopiazônico. Refai et al<sup>46</sup> também descreveram uma redução total da concentração de ocratoxina A em milho e soja em doses de 15 e 20 kGy. Abdel-Aal e Aziz<sup>47</sup> verificaram que dose de 4 kGy foi capaz de impedir a produção de ocratoxina A, ácido ciclopiazônico e ácido penicílico em queijo inoculado com *Penicillium viridicatum*, *Penicillium cyclopium* e *Penicillium chrysogenum*. Por conseguinte, sugere-se em trabalhos futuros verificar o efeito da irradiação gama em outras micotoxinas presentes naturalmente em milho e derivados.

Os resultados do efeito da irradiação gama (<sup>60</sup>Co) na destruição da AFM<sub>1</sub> em leite fluido e em pó são mostrados na Tabela 2.

**Tabela 2.** Teores de aflatoxina M<sub>1</sub> em leite ultrapasteurizado e em pó após irradiação gama (<sup>60</sup>Co) a 0, 3, 5, 10, 15 e 20 kGy.

Dose de irradiação (kGy)	Aflatoxina M <sub>1</sub> (ng.L <sup>-1</sup> )		Aflatoxina M <sub>1</sub> (ng.kg <sup>-1</sup> )	
	Leite Fluido <sup>1</sup>	Redução (%)	Leite em Pó <sup>2</sup>	Redução(%)
0	328,4a		290a	
3	306,7b	6,6	NE	
5	221,0c	32,7	260b	10,3
10	65,9d	79,9	250c	13,8
15	48,8e	85,1	NE	
20	43,4f	86,8	180d	37,9

1. Média de 4 repetições.

2. Média de 2 repetições.

Médias com a mesma letra na vertical não diferem entre si pelo teste de Tukey em 5% de probabilidade.

NE: Não-executado.

Observa-se uma redução gradual da concentração da AFM<sub>1</sub> com o aumento da dose de irradiação gama. Em leite fluido, a 10, 15 e 20 kGy a destruição da AFM<sub>1</sub> atingiu valores na faixa de 80 a 87 %. Uma explicação para acentuada redução dos níveis de AFM<sub>1</sub> é que o processo de irradiação nos alimentos envolve duas etapas: (1<sup>a</sup>) em uma etapa inicial ocorre formação de radicais livres, íons

e moléculas ativadas. É o chamado efeito primário da irradiação. (2<sup>a</sup>) segue-se o efeito secundário, que consiste na reação das espécies reativas formadas na primeira etapa com os outros constituintes dos alimentos. É o chamado efeito indireto da irradiação, responsável por 80% dos efeitos provocados pela irradiação<sup>48-51</sup>. A água, maior constituinte do leite, absorve a energia das radiações e sofre o processo de radiólise, formando diferentes radicais livres e íons em grandes concentrações. O leite em pó, que apresenta um teor de umidade inferior ao leite fluido, mostra uma menor, mas significativa percentagem de redução da AFM<sub>1</sub> quando comparado ao leite fluido: cerca de 38 % com a dose de 20 kGy.

Apesar do resultado promissor da irradiação gama (<sup>60</sup>Co) em destruir parcialmente a AFM<sub>1</sub>, existe a possibilidade de aumento da concentração do ácido butílico em função da quebra de constituintes do leite, com possível alteração do sabor<sup>52</sup>. Em trabalho desenvolvido por Pietranera et al<sup>53</sup> com sorvete a base de creme de leite, não foi verificada formação significativa de peróxidos, índice químico utilizado para avaliação de rancidez, até a dose de 9 kGy. Sugere-se, portanto, em trabalhos futuros, um monitoramento das características organolépticas e nutricionais do leite, como avaliação sensorial, acidez, gordura, vitaminas e aminoácidos, após o processo de irradiação.

## CONCLUSÕES

Doses de irradiação gama (<sup>60</sup>Co) até 20 kGy não foram suficientes para destruir completamente a fumonisina B<sub>1</sub> em farinha de milho naturalmente contaminada.

Em leite fluido a aflatoxina M<sub>1</sub> foi destruída em um percentual que variou de 6,6 a 86,8 %, após irradiação gama (<sup>60</sup>Co) em doses de 3 a 20 kGy. Em leite em pó, a aflatoxina M<sub>1</sub> atingiu o máximo de destruição (37,9 %) com a dose de 20 kGy.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro (CAG-218/04).

## REFERÊNCIAS

- Okezie BO. Word food security: The role of postharvest technology. *Food Tech* 1998; 52:64-9.
- Bhattacharya K, Raha S. Deteriorative changes of maize, groundnut and soybean seeds by fungi in storage. *Mycopathologia* 2002; 155:135-41.
- Bueno DJ, Silva JO, Oliver G. Fungal isolation and enumeration in foods. *Meth Molec Biol* 2004; 268: 127-32.

4. Paster N, Bullerman LB. Mould spoilage and mycotoxin formation in grains as controlled by physical means. *Int J Food Microbiol* 1988; 7:257-65.
5. Reddy MJ, Shetty HS. Role of seed lipids in *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin production. *J Sci Food Agric* 1992; 59:177-81.
6. Taniwaki MH, Iamanaka BT, Banhe AA. Comparison of culture media to recover fungi from flour and tropical pulps. *J Food Mycol* 1992; 2:291-302.
7. Rodriguez-Amaya DB, Sabino M. Mycotoxin research in Brazil: The last decade in review. *Braz J Microbiol* 2002; 33:1-14.
8. Bittencourt ABF, Oliveira CAF, Dilkin P, Corrêa B. Mycotoxin occurrence in corn meal and flour traded in São Paulo, Brazil. *Food Control* 2005; 16:117-20.
9. Machinski M, Valente Soares LM. Fumonisin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> in Brazilian corn-based food products. *Food Addit Contam* 2000; 17:875-9.
10. Vargas EA, Preis RA, Castro L, Silva CMG. Co-occurrence of aflatoxins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, zearalenone and fumonisin B<sub>1</sub> in Brazilian corn. *Food Addit Contam* 2001; 18: 981-6.
11. Camargos SM, Valente Soares LM, Sawazaki E, Bolonhezi D, Castro JL, Bortolotto N. Accumulation of fumonisins B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> in freshly harvested Brazilian commercial maize at three locations during two nonconsecutive seasons. *Mycopathologia* 2001; 155:219-28.
12. Westhuizen LV, Shephard GS, Scussel VM, Costa LLF, Vismer HF, Rheeder JP, Marasas WFO. Fumonisin contamination and *Fusarium* incidence in corn from Santa Catarina, Brazil. *J Agric Food Chem* 2003; 51:5574-8.
13. Castro MFPM, Shepard GS, Sewram V, Vicente E, Mendonça TA, Jordan AC. Fumonisin in Brazilian corn-based foods for infant consumption. *Food Addit Contam* 2004; 21:693-9.
14. Chu FS, Li GY. Simultaneous occurrence of fumonisin B<sub>1</sub> and mycotoxins in moldy corn collected from the peoples Republic of China. *Appl Environ Microbiol* 1994; 60:847-52.
15. Scaff RMC, Scussel VM. Fumonisin B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> in corn-based products commercialized in the state of Santa Catarina – Southern Brazil. *Braz Arch Biol Techn* 2004; 47:911-9.
16. Almeida AP, Sabino M, Fonseca H, Corrêa B. Milho recém-colhido no Brasil: interação da microbiota fúngica, fatores abióticos e ocorrência de fumonisinas. *Rev Inst Adolfo Lutz* 2005; 64:1-9.
17. Bakirci I. A study on the occurrence of aflatoxin M<sub>1</sub> in milk and milk products produced in Van province of Turkey. *Food Control* 2001; 12:47-51.
18. Carvajal M, Bolanös A, Rojo F, Méndez I. Aflatoxin M<sub>1</sub> in pasteurized and ultrapasteurized milk with different fat content in Mexico. *J Food Prot* 2003; 66: 1885-92.
19. Carvajal M, Rojo F, Méndez I, Bolanös A. Aflatoxin B<sub>1</sub> and its interconverting metabolite aflatoxicol in milk: the situation in Mexico. *Food Addit Contam* 2003; 20:1077-86.
20. Nakajima M, Tabata S, Akiyama H, Itoh Y, Tanaka T, Sunagawa H, Tyonan T, Yoshizawa T, Kumagai S. Occurrence of aflatoxin M<sub>1</sub> in domestic milk in Japan during the winter season. *Food Addit Contam* 2004; 21:472-8.
21. Elgerbi AM, Aidoo KE, Candlish AAG, Tester, RF. Occurrence of aflatoxin M<sub>1</sub> in randomly selected North African milk and cheese samples. *Food Addit Contam* 2004; 21:592-7.
22. Navas AS, Sabino M, Rodriguez-Amaya DB. Aflatoxin M<sub>1</sub> and ochratoxin A in a human milk bank in the city of São Paulo, Brazil. *Food Addit Contam* 2005; 22: 457-62.
23. Oliveira CA, Rosmaninho J, Rosim R. Aflatoxin M<sub>1</sub> and cyclopiazonic acid in fluid milk traded in São Paulo, Brazil. *Food Addit Contam* 2006; 23:196-201.
24. Gürbay A, Aydın S, Girgin G, Engin AB, Sahin G. Assessment of aflatoxin M<sub>1</sub> levels in milk in Ankara, Turkey. *Food Control* 2006; 17:1-4.
25. Aziz NH, Attia ESA, Farag SA. Effect of gamma-irradiation on the natural occurrence of *Fusarium* mycotoxins in wheat, flour and bread. *Nahrung* 1997; 41:34-7.
26. Aziz NH, El-Zeany AS, Moussa AA. Influence of  $\gamma$ -irradiation and maize lipids on the production of aflatoxin B<sub>1</sub> by *Aspergillus flavus*. *Nahrung* 2002; 46:327-31.
27. Chiou RYY, Lin CM, Shyu SL. Property characterization of peanut kernels subjected to gamma irradiation and its effect on the outgrowth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *J Food Sci* 1990; 55:210-3.
28. Farag RS, Rashed MM, Hussein AA, Abo-Hagar A. Effect of gamma irradiation on the infected yellow corn and peanuts by *Aspergillus flavus*. *Chem Mikrob Technol Lebensm* 1995; 17:93-8.
29. Prado G, Carvalho EP, Oliveira MS, Gazzinelli JECM, Moraes VD, Corrêa RF, Cardoso VN, Soares TV. Influência da irradiação gama na produção de aflatoxina B<sub>1</sub> e no crescimento de cepa toxigênica de *Aspergillus flavus* em amendoim (*Arachis hypogaea* L.). *Rev Inst Adolfo Lutz* 2005; 64:85-90.
30. Prado G, Carvalho EP, Oliveira MS, Gazzinelli JECM, Moraes VD, Corrêa RF, Cardoso VN, Soares TV. Influência da irradiação gama (<sup>60</sup>Co) na destruição da aflatoxina B<sub>1</sub> em amendoim (*Arachis hypogaea* L.). *Rev Inst Adolfo Lutz* 2005; 64: 186-92.
31. Hernandez NK, Vital HC, Sabaa-Srur UO. Irradiação de alimentos: vantagens e limitações. *Bol SBCTA* 2003; 37:154-9.
32. Verruma-Bernardi MR, Spoto MHF. Efeito da radiação gama sobre o perfil sensorial de suco de laranja. *Ci Tecnol Aliment* 2003; 23:28-32.
33. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 21, de 26 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento para irradiação de alimentos. Publicada no Diário Oficial da União de 29 de janeiro de 2001.

34. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos físicos e químicos para análise de alimentos. 4ª ed. São Paulo: O Instituto; 2005. Cap. XXIV, p.775-8.
35. Tuinstra LGM, Roos AH, Trip JMP. Liquid chromatographic determination of aflatoxin M<sub>1</sub> in milk powder using immunoaffinity columns for cleanup: interlaboratory study. *Food Biol Contam* 1993; 76:1248-1254.
36. Prado G, Oliveira MS, Abrantes FM, Santos LG, Soares CR, Veloso T. Ocorrência de aflatoxina M<sub>1</sub> em leite consumido na cidade de Belo Horizonte – Minas Gerais/Brasil – Agosto/98 à Abril/99. *Ci Tecnol Aliment* 1999; 19:420-423.
37. Sampaio IBM. Estatística aplicada à experimentação animal. 1ª ed. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998. 221 p.
38. Lima PC, Abreu AR. Estatística experimental: ensaios balanceados. 1ª ed. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2001. 102p.
39. Visconti A, Solfrizzo M, Doko MB, Boenke A, Pascale M. Stability of fumonisins at different storage periods and temperatures in  $\gamma$ -irradiated maize. *Food Addit Contam* 1996; 13:929-38.
40. Ferreira FL. Efeitos da radiação gama em amostras de milho contaminadas com *Fusarium verticillioides*. 2005. [Dissertação de Mestrado]. Instituto de Ciências Biomédicas. Universidade de São Paulo. São Paulo. 121p.
41. Scott PM, Lawrence GA. Stability and problems in recovery of fumonisins added to corn-based foods. *JAOAC Int*. 1994; 77:541-5.
42. Castelo MM, Sumner SS, Bullerman LB. Stability of fumonisins in thermally processed corn products. *J Food Prot* 1998; 61:1030-3.
43. Bullerman LB, Ryu D, Jackson LS. Stability of fumonisins in food processing. *Adv Exp Med Biol* 2002; 504:195-204.
44. Humpf HU, Voss KA. Effects of thermal food processing on the chemical structure and toxicity of fumonisin mycotoxins. *Mol Nutr Food Res* 2004; 48:255-269.
45. Aziz NH, Moussa LAA. Influence of gamma-irradiation on mycotoxin producing moulds and mycotoxins in fruits. *Food Control* 2002; 13: 281-8.
46. Refai MK, Aziz NH, El-Far F, Hassan AA. Detection of ochratoxin produced by *A. ochraceus* in feedstuffs and its control by  $\gamma$  radiation. *Appl Rad Isot* 1996; 47: 617-21.
47. Abdel-Aal SS, Aziz NH. Effect of gamma radiation on mycotoxin production by toxigenic moulds in local Karish cheese. *Egyptian J Microbiol* 1997; 32: 151-68.
48. Rela PR. Cresce uso de irradiação para conservação de alimentos. *Rev Eng Alimen* 2000; 29: 26-9.
49. Landgraf M. Controle do desenvolvimento microbiano nos alimentos. In: Franco, BDGM; Landgraf, M. editores. *Microbiologia dos alimentos*. São Paulo: Ed. Atheneu; 2003. Cap. 7. p. 109-48.
50. Worcman-Barninka D, Landgraf M. Irradiação de carnes. *Bol SBCTA* 2003; 37:22-7.
51. Farkas J. Irradiation for better foods. *Trends Food Sci Tech* 2006; 17: 148-52.
52. Marchioni E. Irradiação de alimentos: a tecnologia a favor da saúde. *Brasil Nucl* 2006; 11: 4-7.
53. Pietranera MAS, Narvaiz P, Horak C, Kairiyma E. Irradiated icecreams for immunosuppressed patients. *Rad Phys Chem* 2003; 66:357-65.

# Ochratoxin A in raisins samples marketed in São Paulo, Brazil

## Ocratoxina A em amostras de uva passa comercializadas em São Paulo, Brasil

RIALA6/1084

Adriana Palma de ALMEIDA<sup>1\*</sup>, Janete ALABURDA<sup>1</sup>, Valter RUVIERI<sup>1</sup>, Myrna SABINO<sup>1</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Instituto Adolfo Lutz, Divisão de Bromatologia e Química, Seção de Química Biológica, Av. Dr. Arnaldo, 355 – CEP 01246-902, São Paulo/ SP/ Brasil  
Telefone 55 11 30682921, e-mail: apalma@ial.sp.gov.br

### ABSTRACT

The present study aimed to evaluate a methodology for analyzing ochratoxin A (OTA) in raisins samples marketed in São Paulo, Brazil. OTA was extracted with methanol:water (80:20, v/v) and diluted with phosphate buffer solution, and purified through an immunoaffinity column. OTA was separated and quantified using HPLC with fluorescence detection. The established detection and quantification limits were 0.24 and 0.80 ng/g, respectively. The recoveries values were 81.6, 80.4 and 81.9%, and the relative standard deviations (RSD) were 6.0, 4.3, and 6.1 % at 2.0, 5.0 and 10.0 ng/g levels, respectively. Of twenty black raisin samples analyzed 10 (50 %) contained OTA at levels ranging from 1.3 to 39.1 ng/g. All of twenty-two white raisin samples showed no contamination with OTA.

**Key words.** ochratoxin A, OTA, raisins, HPLC, immunoaffinity column.

### RESUMO

O presente estudo teve como objetivo avaliar uma metodologia para análise de ocratoxina A (OTA) em amostras de uva passa comercializadas em São Paulo, Brasil. A OTA foi extraída com metanol:água (80:20, v/v) e diluída com solução tampão fosfato, utilizando-se coluna de imunoafinidade para purificação da amostra. A OTA foi separada e quantificada por meio de CLAE com detector de fluorescência. Os limites de detecção e de quantificação estabelecidos foram respectivamente de 0,24 e 0,80 ng/g. Os valores de recuperação foram 81,6; 80,4 e 81,9% e os coeficientes de variação foram 6,0; 4,3 e 6,1 % respectivamente para os níveis de 2,0; 5,0 e 10,0 ng/g. De um total de vinte amostras de uvas passas pretas, 10 (50 %) continham OTA na faixa de concentrações de 1,3 a 39,1 ng/g. Todas as vinte e duas amostras de uvas passas brancas não apresentaram contaminação por OTA.

**Palavras-chave.** ocratoxina A, OTA, uva passa, CLAE, coluna de imunoafinidade.

## INTRODUCTION

Ochratoxin A (OTA) is a mycotoxin produced mainly by *Penicillium verrucosum* and some species of *Aspergillus* and it has been shown to be nephrotoxic, hepatotoxic, teratogenic and immunotoxic to animals<sup>1-3</sup>. The carcinogenicity in rats and mice is well established. OTA has been associated with a high incidence of a kidney disease known as Balkan Endemic Nephropathy and related to the development of urinary tract tumours in humans<sup>4</sup>. The International Agency for Research on Cancer has classified OTA as a possible carcinogen to humans (Group 2B)<sup>5</sup>.

OTA is a common contaminant of many foodstuffs<sup>3,6,7</sup> and consequently, is present in a large proportion of tested populations of humans and animals. Although reported levels are usually low in each commodity, it can be taken from a variety of food sources and beverages and the intake of different contaminated foods and drinks might provide a total amount of OTA near the provisional tolerable levels. Recently, the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) has established a provisional tolerable weekly intake of 100 ng/kg body mass<sup>8</sup>.

In further years, the use of more accurate and sensitive analytical methods for this toxin, with lower limits of detection (LOD), led to its detection in different food commodities. The reported results of occurrence studies have become more realistic and have been supported by a better evaluation of the human exposure and health risks. Nowadays, OTA has raised public health concerns because high toxic potency and the human population continuous exposure to it.

Several countries have established maximum levels for OTA in cereals and other products, however in Brazil, no regulatory limits for OTA have been established. There is limited data about this mycotoxin in food, cereals and beverages produced or commercialized in this country.

The occurrence of OTA in dried fruits, inclusive raisins, has been reported in several studies<sup>9-10</sup>, showing a considerable contamination level with high toxin concentration and incidence. In the United Kingdom<sup>11</sup>, the Ministry of Agricultural, Fisheries and Food (MAFF) has detected OTA in more than 80% of dried fruits analysed with the maximum concentration at 18 µg/kg. OTA has been detected in 80% of 61 samples of dried vine fruits in Australia<sup>12</sup>. Forty percent of these samples had OTA concentrations more than 1 µg/kg and in 10% more than 5 µg/kg. In Brazil<sup>13</sup>, the OTA contamination was observed in dried vine fruits with 33% of the samples analysed containing more than 5 µg/kg.

This study proposes an analytical method using high performance liquid chromatography with fluorescence detection (LC-FLD), which is sensitive to low concentrations of OTA in raisins and reports a survey to determine the levels of OTA in these products commercialized in the city of São Paulo, Brazil.

## MATERIAL AND METHODS

### Raisin samples

Forty two raisin samples (22 white and 20 black without seeds from different brands and lots) were purchased from supermarkets in the city of São Paulo, Brazil from December 2005 to February 2006. A sample size of 250 g was ground, mixed and sub-sampled prior to analysis.

### Standard and reagents

OTA standard was purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). All chemicals were of analytical grade, excepting methanol and acetonitrile were HPLC grade. They were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). All solutions were prepared with deionized water. OTA stock solution was prepared in toluene-acetic acid (99:1). The concentration was determined according to AOAC<sup>14</sup>, checked with UV spectrophotometry in 333 nm, using  $\epsilon = 5440 \text{ cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ . Working standards were prepared by evaporation of known volumes of the stock solution under  $\text{N}_2$  stream, followed by dissolution in LC mobile phase. They were used to calibrate the LC detector response and for the recovery tests. The solutions were stored from  $-15^\circ\text{C}$  to  $-20^\circ\text{C}$  and protected from light. Phosphate-buffered saline (PBS) ( $\text{NaCl}$  0.14 M,  $\text{KCl}$  0.027 M,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.077 M,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.0015 M) at pH 7.4 and sodium bicarbonate aqueous solution 1% (w/v) were prepared in the laboratory.

### Sample preparation extraction and immunoaffinity clean-up

A OTA free-sample was spiked with known amount of OTA (2.0 ng/g) and the extraction procedure was tested using three extraction solvents, (i) acetonitrile:water (60:40, v/v), (ii) sodium bicarbonate aqueous solution 1%, and (iii) methanol:water (80:20, v/v) as follows: 25 g samples were extracted with 100 mL of extraction solvent by shaking vigorously for 3 minutes in a blender or for 1 hour in a rotational shaker. It was filtered through a paper filter. Then, 4 ml of the filtered solution diluted with 12 mL of PBS were passed through an immunoaffinity column (OchraStar<sup>TM</sup>, Romer Labs Inc., EUA and Ochraprep<sup>R</sup>, R-Biopharm Rhone Ltd, Scotland). The column was washed with 2 portions of 10 ml of PBS and air-dried. Ochratoxin A was eluted under gravity with 2 ml of methanol:acetic acid mixture (49:1). The eluate was reduced to dryness under  $\text{N}_2$  and the residue was solved in 300 µl mobile phase. The solution was filtered through 0.45 µm before LC analysis.

### LC-FLD determination

The detection of OTA was carried out using a GBC system (GBC, Dandenong, Victoria, Australia) equipped with a HPLC pump (LC 1110) and a fluorescence detector (model LC 1255). Liquid chromatography separation was performed on a LiChrosorb C18 (Merck, Darmstadt, Germany) 5 µm particle size 25 cm x 10 mm column. The mobile phase was

acetic acid aqueous solution 3.33%:acetonitrile:methanol (30:35:35, v/v) at a flow-rate of 0.8 ml/min. The excitation and emission wavelengths of the fluorescence detector were set at 332 nm and 476 nm, respectively. Sample volumes of 20  $\mu$ l were injected in triplicate. The linearity was determined in the range of 2 to 256 ng/ml of OTA using 8 calibrators. The time retention of OTA was  $6.5 \pm 0.2$  minutes and the confirmation of the OTA identity peak was performed by methyl ester formation according to AOAC<sup>14</sup>.

### Recovery experiments

Recovery experiments were performed on OTA-free raisin samples (OTA concentration < LOD) spiked with OTA levels of 2.0, 5.0, and 10.0 ng/g. Spiking was carried out in triplicate and a double analysis of the blank was also carried out. After leaving the spiked samples over night for the solvent to evaporate, extraction solvent was added and the OTA concentration was determined. In order to evaluate the experimental conditions of the recovery test, the clean-up has been done using two different immunoaffinity columns (OchraStar<sup>TM</sup>, Romer Labs Inc., EUA and Ochraprep<sup>R</sup>, R-Biopharm Rhone Ltd, Scotland) with spiked sample at 2.0 ng/g level.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Analytical

Quantification of OTA in raisin samples by LC-FLD was performed using an external calibration curve obtained by diluting appropriate aliquots of OTA stock solution in the mobile phase. The experimental points fit well to a straight line in the range 2 - 256 ng/ml ( $r^2 = 0.99998$ ). The detection (LOD) and quantification (LOQ) limits established were 0.24 and 0.80 ng/g, respectively.

Three different extraction solutions suggested by the manufactures of the immunoaffinity columns (IAC) and two shaking devices were tested. These tests were performed using spiked samples at 2.0 ng/g OTA level. The best results for recovery have been obtained when the mixture of methanol:water was utilized, since the recoveries for the two first procedures (i) acetonitrile:water (60:40, v/v) and (ii) sodium bicarbonate aqueous solution were 119 % and 55 % respectively. The recovery was similar for both blender and rotative shaker. The recoveries using the methanol mixture were 81.6, 80.4, and 81.9 % and the relative standard deviations (RSD) were 6.0, 4.3, and 6.1 % at levels of 2.0, 5.0 and 10.0 ng/g, respectively ( Table 1). These results were in agreement to the values recommended by The European Communities<sup>15</sup>.

Typical procedures include extraction methanol- 1% sodium carbonate (70:30), followed by clean-up on IAC<sup>16</sup> and after column washing, OTA could finally be eluted with methanol.

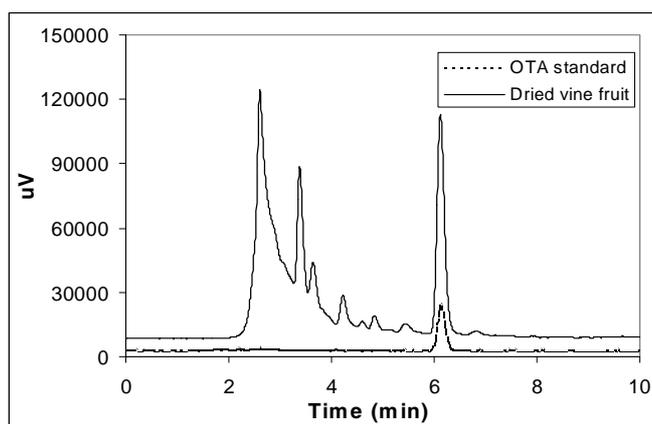
Ianamata et al<sup>12</sup> extracted OTA from dried vine fruits with methanol- 1% sodium carbonate (70:30). The recovery was 81,0 % and the relative standard deviation (RSD) was 31,24%. However, when Magnoli et al<sup>17</sup> used the same extraction solution, the mean recoveries were  $95 \pm 2\%$  and  $90 \pm 3\%$  for black and white dried vine fruits, respectively. For both commodities, the mentioned authors utilized PBS containing 1% Tween 20 to wash the column and only methanol to elute OTA from the IAC. In the present study, the OTA extraction was done with a simple solution containing methanol-water (80:20) and only PBS solution was utilized to wash the IAC. The mean recoveries obtained in the present work were similar to those reported by Ianamata et al<sup>12</sup>, however the relative standard deviation values were better than the results obtained by those authors.

**Table 1.** The recoveries of OTA in samples of raisins fortified.

OTA added concentration (ng/g)	OTA obtained concentration (ng/g)	Mean (ng/g)	Recovery (%)	Relative standard deviations (RSD) (%)
2	1.74		86.8	6.0
	1.62	1.63	80.8	
	1.54		77.2	
5	4.05		81.0	4.3
	3.83	4.02	76.6	
	4.17		83.4	
10	8.58		85.8	6.1
	8.35	8.19	83.5	
	7.63		76.3	

Two immunoaffinity columns were tested in this work: OchraStar<sup>TM</sup> (Romer Labs Inc) and Ochraprep<sup>R</sup> (R-Biopharm Rhone Ltd). The methanol:water (80:20) extraction solution suggested by Romer proved adequate for both columns. The columns efficiency was evaluated through OTA recoveries at 2.0 and 10.0 ng/g levels. The results obtained were 103.5 % and 85.7 % for OchraStar<sup>TM</sup> column and 81.6 % and 81.7 % for Ochraprep<sup>R</sup> column for 2.0 and 10.0 ng/g OTA levels, respectively. Both values did not show significant statistical difference ( $p > 0.05$ ), therefore both columns tested were adequate to clean-up step.

The experimental method proposed in the present work proved to be adequate to quantification of OTA in raisins. The extraction step was efficient and the IAC clean-up was suitable and no co-extractives were observed at OTA retention time during chromatographic analysis (Figure 1). At present, the clean-up with IAC is considered essential in obtaining optimal recovery of ochratoxin A in addition to the advantages of decreasing experimental time when comparing with other traditional techniques such as liquid-liquid partition.



**Figure 1.** HPLC chromatograms – (a) a standard solution containing 10 ng/ml of OTA. (b) a raisin sample naturally contaminated with 18.7 ng/g.

### Incidence

Raisins in package and bulk are commercialized in Brazilian market, therefore the samples investigated included both types. OTA peak identity was confirmed by methyl ester derivative, which elutes at different time from OTA<sup>14</sup>.

All white raisin samples showed no contamination with OTA, independent of the type of packaging. Of a total of twenty samples of black raisins 10 (50 %) contained OTA at levels ranging from 0.2 (LOD) to 39.1 ng/g. Considering the type of package, OTA was detected in 43 % of packaged samples and 54 % of bulk samples, a difference not statistically significant ( $p > 0.05$ ). The results of the OTA analysis of 42 different brands of raisins are presented in Table 2.

**Table 2.** Incidence of ochratoxin A in different brands of raisins.

Sample	Kind of package	Positive/ Total	Percentage of positive (%)	Range (ng/g)
Black	Original package	3/7	43	LOD* – 39.1
	Bulk	7/13	54	LOD – 4.3
White	Original package	0/7	0	< LOD
	Bulk	0/15	0	< LOD
Total	Original package / Bulk	10/42	24	LOD – 39.1

\*LOD (Limit of detection) = 0.24 ng/g.

The OTA levels observed in this work were similar to those obtained by Ianamata et al<sup>13</sup> in dried vine fruits commercialized in Brazil.

Ochratoxin A has been reported as naturally occurring in dried vine fruits in many countries. Magnoli et al<sup>17</sup> detected occurrence of 67.7 and 84.2 % with mean levels of 6.3 and 4.4 ng/g in black and whitedried vine fruits, respectively.

MacDonald et al<sup>18</sup> showed a high incidence of this toxin (88%) in sultanas, raisins and currants commercialized in the UK with a maximum level of 53.6 µg/g, however Stefanaki et al<sup>10</sup> observed low levels of OTA in Greek domestic dried fruits.

The European Union (EU) has established a maximum OTA limit of 10 ng/g for dried vine fruits (currants, sultanas and raisins)<sup>19</sup>. In the present work two samples of black raisins showed contamination above this limit (18.7 and 39.1 ng/g) and the OTA concentrations of six samples ranged from 1.32 to 8.59 ng/g. In Brazil raisins are consumed during all the year and specially at the end of the year during Christmas. The OTA determination in raisin is very important in order to protect consumers' health from the risk of exposure to this toxin. In addition, in Brazil there is not limit for OTA in this product. Considering the OTA high toxic potency and the continuous exposure of human population, the present work may give support to establish a OTA limits for raisins and others foodstuffs. Therefore, other surveys on the occurrence of OTA in dried black raisins are recommended in order to better measure the contribution of this foodstuff to OTA human exposure.

### CONCLUSIONS

The analytical method proposed in this work is easy to apply and allows the analysis of a large number of samples per day. All this due to the fact that the immunoaffinity column clean-up provides several advantages in comparison to traditional methods of purification, by reducing the use of hazardous solvents, by reducing analysis time, and by showing greater specificity.

Although a limited number of samples has been analysed, the high incidence of contamination in black raisin samples from which, a few presented high concentrations indicates a real risk of human exposure to OTA through the continuous consumption of these fruits.

### REFERENCES

1. WHO. World Health Organization, Ochratoxin A – Toxicological Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants, WHO Food Additives Series 35 1996, Geneva, Switzerland, 363-376.
2. Schlatter CH, Studer-Rohr J, Rasonyi TH. Carcinogenicity and kinetic aspects of ochratoxin A. *Food Addit Contam* 1996; 13: 43-4.
3. Pittet A. Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds: an updated review. *Rev Med Veter* 1998; 149: 479-92.
4. Petkova-Bocharova T, Castegnaro M In: *Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary Tract Tumours*, Castegnaro M, Plestina R, Dirheimer G, Chernozemsky

- IN, Bartsch H editors. IARC Press: Lyon, France, 1991; p.159-64.
5. International Agency for Research on Cancer [IARC]. Ochratoxin A. In: IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Human; Some Naturally Occurring Substances; Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins. IARC: Lyon, 1993, p.489-521.
  6. Sage L, Krivobok S, Delbos E, Seigle-Murandi F, Creppy EE. Fungal flora and ochratoxin A production in grapes and Musts from France. *J Agric Food Chem* 2002; 50: 1306-11.
  7. Serra R, Abrunhosa L, Kozakiewicz Z, Venâncio A. Black *Aspergillus* species as ochratoxin A producers in Portuguese wine grapes. *Int J Food Microbiol* 2003; 88: 63-8.
  8. FAO/WHO, Safety evaluation of certain mycotoxins in food. WHO Food Additives Series, No. 47; FAO Food and Nutrition Paper 74, 2001.
  9. Truckses MW, Maragos CM. Joint Mycotoxin Committee. Technical committee reports. *JAOAC Int* 2001; 84:303-8.
  10. Stefanaki I, Foufa E, Tsatsou-Dritsa A, Dais P. Ochratoxin A concentration in Greek domestic wines and dried vine fruits. *Food Addit Contam* 2003; 20: 74-83.
  11. MAFF (Ministry of Agriculture, Fisheries and Food). Survey of retail products for ochratoxin A. *Food Safety Information Bulletin* 1998, n.185.
  12. Ianamata BT. Fungos toxigênicos e micotoxinas em frutas secas e produção de ocratoxina A em uvas passas em condições de abuso [Dissertação de Mestrado]. Campinas, São Paulo: Universidade Estadual de Campinas, 2004. 64pp.
  13. Ianamata BT, Taniwaki MH, Menezes HC, Vicente E, Fungaro MH. Incidence of toxigenic fungi and ochratoxin A in dried fruits sold in Brasil. *Food Addit Contam* 2005; 22: 1258-63.
  14. AOAC International. Official Methods of Analysis, 16<sup>th</sup> ed., Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists, 1997, ch. 49.
  15. Commission of the European Communities. Commission Directive (EC N<sup>o</sup> 26/2002 of 13 March 2002). *Off J European Communities* 2002, 75: 38.
  16. Monaci L, Palmisano F. Determination of ochratoxin A in foods: state-of-the-art and analytical challenges. *Anal Bioanal Chem* 2004; 378: 96-103.
  17. Magnoli C, Astoreca A, Ponsone L, Combina M, Palácio G, Rosa CAR, Dalcerro AM. Survey of mycoflora and ochratoxin A in dried vine fruits from Argentina markets. *Lett Applied Microbiol* 2004; 39: 326-31.
  18. MacDonald S, Wilson P, Barnes K, Damant A, Massey R, Mortby E, Shepherd MJ. Ochratoxin A in dried vine fruit: method development and survey. *Food Addit Contam* 1999; 16: 253-60.
  19. Commission of the European Communities. Commission regulation (EC n<sup>o</sup> 472/2002 of 12 March 2002 amending regulation (EC) n<sup>o</sup> 466/2002). *Off J European Communities* 2002, 75: 18-20.

# Detecção de glúten em alimentos por meio de ELISA

## Detection of gluten in foods by means of ELISA

RIALA6/1085

Rejane W. de ABREU<sup>1\*</sup>; Sônia F. C. BARBOSA<sup>2</sup>; Jussara C. de M. DELLA TORRE<sup>1</sup>; Jaim LICHTIG<sup>1</sup>; Odair ZENEON<sup>1</sup>

\* Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Instituto Adolfo Lutz, Divisão de Bromatologia e Química, Seção de Doces e Amiláceos, Av. Dr. Arnaldo, 355, CEP 01246-902, São Paulo/SP, Brasil e-mail: [rwabreu@ial.sp.gov.br](mailto:rwabreu@ial.sp.gov.br)

<sup>2</sup>Instituto Adolfo Lutz, Divisão de Biologia Médica, Seção de Imunologia, São Paulo/SP.

Recebido: 12/07/2006 – Aceito para publicação: 27/10/2006

### RESUMO

A doença celíaca é caracterizada pela intolerância ou hipersensibilidade à ingestão de prolaminas existentes no trigo, centeio, cevada e aveia. As proteínas do glúten do trigo são constituídas de aproximadamente 50% de prolaminas, denominadas gliadinas. O tratamento adotado para a doença celíaca é a dieta livre de glúten. A legislação brasileira determina que os produtos alimentícios industrializados devem apresentar a advertência da presença ou ausência de glúten na rotulagem. Duas amostras de referência estabelecidas em um estudo interlaboratorial e treze produtos alimentícios industrializados foram analisados para determinar a presença de glúten por meio de ensaio imunoenzimático comercial, ELISA técnica sanduíche, utilizando-se anticorpo monoclonal anti  $\omega$  gliadina. O limite de detecção foi de 10 ppm (mg/kg). As amostras de referência revelaram resultados satisfatórios com boa exatidão. O glúten foi detectado nos produtos alimentícios que continham o referido componente declarado na rotulagem. O glúten não foi detectado nas amostras declaradas isentas de glúten, com exceção de uma amostra. O ensaio imunoenzimático utilizado discriminou as prolaminas não tóxicas apropriadas para os pacientes com doença celíaca, como os da farinha de arroz, milho, soja, mandioca, batata e batata doce, cujos ingredientes constavam nos dizeres de rotulagem. Os resultados apresentados evidenciam a viabilidade de uso de ELISA para a detecção de baixos teores de glúten em alimentos.

**Palavras-chave.** gliadina, glúten, prolaminas, doença celíaca, ELISA.

### ABSTRACT

Celiac disease is characterized by intolerance or hypersensitivity to ingested prolamins, which are composites of wheat, rye, barley and oats. Gluten proteins of wheat are constituted of approximately 50% of prolamins named gliadins. The treatment for celiac disease is a gluten - free diet. The Brazilian legislation determines that the industrialized food products must bring warning about the presence or absence of gluten in the respective labels. Two reference samples from interlaboratory study, and thirteen food products were analyzed for determining the gluten by means of commercially available immunoenzyme assay - ELISA sandwich format using monoclonal antibody anti- $\omega$  gliadin. The detection limit was of 10 ppm (mg/kg). Reference samples showed satisfactory results and good accuracy. Gluten was detected in analyzed food products in those the cited component was indicated in the respective labels. No gluten amount was detected in samples with indication of gluten absence, except in a sample. The used immunoenzyme assay discriminated non-toxic prolamins for patients with celiac disease, as in rice flour, corn, soy, manioc, potato, and sweet potato proteins, whose ingredients were indicated in the respective labels. The presented results evidence the performance and the practicability of ELISA for determining low levels of gluten in foods.

**Key words.** gliadin, gluten, prolamins, celiac disease, ELISA.

## INTRODUÇÃO

O glúten é responsável por uma enteropatia denominada doença celíaca, caracterizada pela síndrome de má absorção de nutrientes e por lesões na membrana da mucosa do duodeno. A doença celíaca reflete uma permanente intolerância ao glúten, apresentando os seguintes sintomas: diarreia crônica, distensão, desnutrição, falta de apetite e vômitos<sup>1,2</sup>.

A doença afeta ambos os sexos e pode ocorrer em qualquer idade; poderá surgir na infância, assim que são introduzidos na alimentação os primeiros grãos de cereais ou, posteriormente, desencadeada por fatores externos. Uma dieta livre de glúten é o único tratamento existente para os celíacos<sup>3</sup>.

O glúten é uma mistura de proteínas individuais classificadas em dois grupos, as prolaminas e as glutelinas. As prolaminas tóxicas para celíacos são as gliadinas do trigo, as secalinas do centeio, as hordeínas da cevada e as aveninas da aveia.

No trigo, o glúten contribui com aproximadamente 85% do teor das proteínas, restando 15% para as albuminas e globulinas. O teor de prolamina no glúten é geralmente considerado 50%<sup>4</sup>.

As gliadinas são proteínas monoméricas classificadas como  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\omega$  de acordo com a sua mobilidade eletroforética e seqüência de aminoácidos<sup>4</sup>. Experimentos *in vitro*, demonstraram que a seqüência do pentapetídeo glutamina-glutamina-prolina-fenilalanina-prolina (GGPPF) é responsável pela toxicidade na doença celíaca<sup>5</sup>. Existem, até o presente momento, divergências quanto à toxicidade das prolaminas da aveia para os celíacos<sup>6,7,8</sup>.

Diante da gravidade da doença celíaca, no Brasil, a Lei Federal nº 8543/1992<sup>9</sup> determinou a impressão de advertência em rótulos e embalagens de alimentos industrializados que contenham glúten. Em 2002, pela Resolução RDC nº 40<sup>10</sup> estendeu-se à obrigatoriedade da advertência “CONTÉM GLÚTEN” em caracteres com destaque, nítidos e de fácil leitura, também para as bebidas embaladas, excluindo as alcoólicas. Por último, a Lei nº 10.674/2003<sup>11</sup> obriga as inscrições “CONTÉM GLÚTEN” ou “NÃO CONTÉM GLÚTEN” nos rótulos de alimentos comercializados, como medida preventiva e de controle da doença.

A comissão do Codex Alimentarius da FAO (Food And Agricultural Organization of the United Nations) e da WHO (World Health Organization) tem estabelecido que os produtos contendo mais de 0,3% de proteínas do trigo, centeio, cevada e ou da aveia devem ser excluídos da dieta do celíaco. O amido do trigo com 0,3% de proteína apresenta aproximadamente 200 ppm (mg/kg) de glúten, sendo considerado “livre de glúten”. É recomendado que a detecção de glúten em alimentos e em seus ingredientes seja baseada em métodos imunológicos que ofereçam sensibilidade entre 20 e 100 ppm (mg/kg) de glúten. Entretanto, o limite de 20 ppm ainda está em discussão<sup>12,13</sup>. Para garantir um alimento livre de glúten, o seu conteúdo deve ser controlado nos ingredientes e no produto final.

As gliadinas podem ser detectadas por análise de DNA<sup>14</sup>, espectrometria de massa<sup>15</sup>, western blotting e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)<sup>16</sup>. A técnica ELISA é a mais utilizada devida à especificidade e sensibilidade.

O teste de ELISA tipo sanduíche desenvolvido por Skerritt e Hill<sup>17</sup> foi validado em estudo interlaboratorial<sup>18</sup>, adotado como método oficial da AOAC. O teste ELISA utiliza o mesmo anticorpo monoclonal tanto para captura como para anticorpo marcado. O determinante antigênico é estável ao calor e expresso, essencialmente, pela  $\omega$  gliadina e por uma pequena quantidade de  $\gamma$  gliadina. O teste reconhece as prolaminas do centeio e da cevada detectando até 0,001% de glúten (10 ppm). O anticorpo não se liga às prolaminas da aveia, arroz, soja e milho. Este método encontra-se disponível no comércio na forma de kit.

Métodos analíticos sensíveis e específicos para detectar glúten que garantam a qualidade dos alimentos para consumo de celíacos necessitam ser implantados na rotina analítica dos Laboratórios de Saúde Pública que atuam juntamente com a Vigilância Sanitária. No presente trabalho, foi utilizado o Gluten Assay Kit, ensaio imunoenzimático, para a detecção de glúten nas amostras de referência e nos produtos industrializados disponíveis no comércio.

## MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de referência A (2705) e B (2705) do controle interlaboratorial FAPAS/MAFF/UK<sup>4</sup>: a amostra A era constituída de 2,2 kg de massa para bolo, livre de glúten, e amostra B da mistura de 20 g de massa de bolo comum com 2 kg de massa de bolo, livre de glúten. Na mistura para bolo livre de glúten, constavam os seguintes ingredientes: açúcar, farinha de arroz, amido de batata, agentes de crescimento (bicarbonato de sódio, fosfato dissódico), estabilizante (hidróxi propil metil celulose, carboximetilcelulose sódica, goma guar, goma xantana), sal, emulsificante ésteres de poliglicerol de ácidos graxos, estearoil-2-lactil-lactato de sódio) e amido de milho modificado<sup>6</sup>. Na mistura de bolo normal continham os ingredientes: farinha de trigo, açúcar, agentes de crescimento (hidrogênio carbonato de sódio, fosfato de alumínio e sódio), dextrose, leite em pó desnatado, maltodextrina, emulsificante (E471, E472b, E477), sal, estabilizantes (E466 e E450a), flavorizantes e corante (beta caroteno)<sup>4</sup>.

### Produtos alimentícios industrializados

Treze amostras de diferentes produtos alimentícios adquiridas no comércio foram avaliadas levando em consideração a advertência da rotulagem, “contém ou não contém glúten”. Os produtos rotulados “não contém glúten” foram creme de arroz, amido de milho, biscoito salgado, biscoito tipo chips (raízes de mandioca, batata doce), lasanha, farinha de soja e macarrão. Os produtos declarados “contém glúten” compreendiam: biscoito artesanal tipo sequilho, farinha de aveia, biscoito maisena e biscoito integral (de aveia e mel), farinha de centeio e cevada torrada moída.

## Reagentes

O gluten Assay Kit (Tepnel BioSystems,UK) é composto de: a) antígeno de gliadina liofilizada padrão; b) três amostras de controle com teores de glúten: baixo (<0,016%), médio (0,02-0,04%) e alto (0,1-0,3%); c) peroxidase ligada ao anticorpo monoclonal anti-omega gliadina diluído em tampão salino-fosfato com BSA (Soro albumina bovino) e timerosal; d) substrato TMB (tetrametilbenzidina), f) solução de lavagem concentrada (tampão Tris salino com timerosal); g) diluente das amostras concentrado (tampão salino-fosfato com gelatina e timerosal); h) solução finalizadora da reação 25% v/v de ácido fosfórico e i) placa de microtitulação com 12 tiras (96 alvéolos) e previamente sensibilizada com anticorpo monoclonal de ômega gliadina.

## Equipamentos

Homogeneizador de amostra (Diox 900 - Heidolph), centrífuga (Excelsa Baby II - Modelo 206-R – FANEM), lavadora de placas ELISA (Wellwash4 - Labsystems) e leitora de placas ELISA (Multiskan Ascent - Labsystems) com filtro.

## Preparo das amostras

Os ensaios foram realizados de acordo com as instruções do fabricante contidas no kit. Resumidamente, as amostras foram extraídas com etanol a 40%, homogeneizadas (Diox 900) e centrifugadas (2500 rpm) por 10 min. Os extratos das amostras foram diluídos (v/v) em solução tampão. Os produtos declarados “não contém glúten” foram diluídos a 1/50 enquanto os rotulados “contém glúten”, assim como as amostras de referência e os controles fornecidos pelo kit com alta, média e baixa concentração de glúten, foram diluídos 1/50 a 1/20.000.

## Procedimento

Alíquotas de 100µL das diluições do padrão de gliadina, dos extratos preparados e diluídos das amostras de controle de glúten, dos produtos alimentícios industrializados e das amostras de referência (A e B) foram adicionadas, em duplicata, nos alvéolos da placa de microtitulação. Após incubação por 60 minutos à temperatura ambiente, a placa foi lavada três vezes com solução tampão. Após adição de 100µL de conjugado, procedeu-se a incubação por 60 minutos, à temperatura ambiente e um novo ciclo de lavagem. Foram adicionados 100µL de substrato TMB a cada alvéolo e após 30 minutos, à temperatura ambiente, a reação foi paralisada com 50µL de solução finalizadora. A leitura da absorbância a 450nm foi realizada em leitora ELISA. As concentrações de glúten das amostras foram determinadas pela interpolação da média das absorbâncias frente a uma curva padrão pré-estabelecida com diluições do padrão de gliadina.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A curva constituída com padrões de gliadina nas concentrações de 10, 20, 50, 100 e 200 ng/mL revelou (Figura

1) resposta linear ( $r^2 = 0,980$ ) para a faixa de concentração utilizada, obedecendo a equação  $Y = 0,0051 \log x + 0,1475$ . O limite de detecção de 5 ppm de gliadina (10 ppm de glúten), estabelecido no kit, foi experimentalmente confirmado.

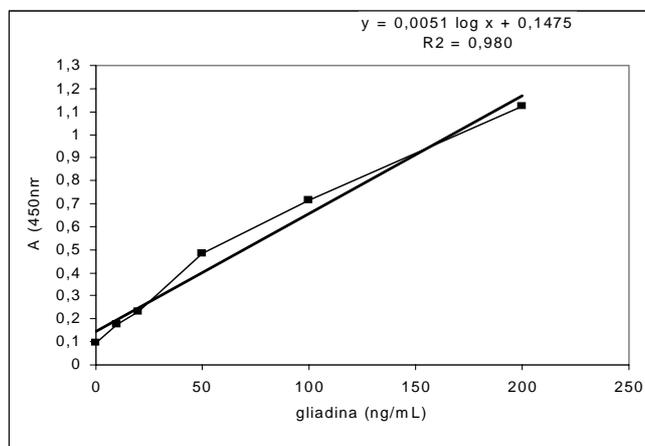


Figura 1. Curva padrão de gliadina.

Os teores dos padrões de glúten, fornecidos pelo kit, de alta, média e baixa concentração, foram, respectivamente, 1498, 216 e menor que 10 ppm (mg/kg). Na Tabela 1, estão apresentados os resultados do ensaio de exatidão realizado com as amostras de referência do estudo interlaboratorial de proficiência FAPAS/MAFF/UK. O valor-z (“z-score”) da determinação do glúten, estabelecido pela relação  $z=(x-X)/\sigma$ , onde  $x$ =concentração do analito determinada,  $X$ =concentração verdadeira do analito,  $\sigma$ =desvio-padrão para o valor  $x$ , foi considerado satisfatório para  $|z| \leq 2$ , questionável quando  $2 < |z| \leq 3$  e insatisfatório se  $|z| > 3$ . Os valores encontrados neste trabalho para as amostras A e B foram considerados satisfatórios, por apresentarem valores de  $|z| \leq 2$ .

Tabela 1. Resultados do teor de glúten nas amostras de referência A e B valores-z obtidos no teste de proficiência FAPAS.

Amostras	Glúten (mg/Kg)		Valor -z
	Resultado do laboratório gluten Assay Kit	Resultado do FAPAS	
A	43	47,9	-0,6
B	440	665	-2,0

Na Tabela 2 estão apresentados os resultados da determinação do teor de glúten nos alimentos industrializados utilizando o Gluten Assay Kit. Não foi detectada a presença de glúten nos produtos designados sem glúten, exceto para o macarrão. Todas as amostras que apresentavam a advertência “contém glúten” foram positivas. Observa-se que na lista de ingredientes no rótulo do biscoito artesanal tipo sequilho não constava alguma fonte originária de glúten, contudo o resultado

analítico foi positivo, confirmando a sua presença na referida amostra. O ensaio revelou baixo teor para as prolaminas da cevada torrada e moída, fato este relatado por outros autores<sup>19</sup>. Quanto à análise da aveia, foi obtido o teor de glúten de 40 mg/kg, o que não era esperado, pois dados da literatura indicam que os anticorpos monoclonais para o gliadina não reconheceriam as prolaminas da aveia<sup>2</sup>. Estudos de investigação com PCR, tornam-se necessários para confirmação da presença de glúten na aveia<sup>20</sup>. O ensaio realizado discriminou as prolaminas não tóxicas para os celíacos como as dos alimentos constituídos de arroz, milho, soja, mandioca, batata e batata doce, cujos ingredientes constavam nos dizeres de rotulagem. O teor de glúten de 190 mg/kg obtido na análise do macarrão é considerado livre de glúten pela comissão do Codex Alimentarius da FAO/WHO (Food And Agricultural Organization of the United Nations/World Health Organization). Os resultados de glúten obtidos nos produtos alimentícios analisados evidenciam a viabilização para o uso do método de imunoensaio e a necessidade do controle dos alimentos, uma vez que os ingredientes podem, no processo de industrialização, sofrer contaminação, ou por outro lado, o glúten pode ser omitido da lista de ingredientes da rotulagem do alimento.

**Tabela 2.** Teor de glúten em produtos alimentícios comerciais.

Amostras	Marca	Ingredientes	Advertencia no rótulo	Glúten (mg/Kg)
Creme de arroz	A	Arroz		ND
Amido de milho	B	Amido de milho		ND
Biscoito salgado	C	Farinha de arroz, mandioca, manteiga, sal e gergelim.		ND
Biscoito tipo chips	D	Mandioca, batata doce, gordura vegetal e sal marinho.		ND
Lasanha	E	Amido de milho, amido de arroz, amido de batata, farinha de soja, farinha de arroz, emulsificante (E471). Farinha de soja	“NÃO CONTÉM GLÚTEN”	ND
Farinha de soja	F	Farinha de soja		ND
Macarrão	G	Farinha de arroz, farinha de milho, fécula de mandioca, carotenóides vegetais.		190
Biscoito artesanal tipo sequilho	H	Amido de milho, margarina, ovos, polpa de goiaba, edulcorante sucralose, conservante propionato de cálcio.		4.750
Farinha de centeio integral	I	Farinha de centeio		44.871
Cevada torrada e moída	J	Cevada		40
Farinha de aveia	K	Aveia	“CONTÉM GLÚTEN”	40
Biscoito maisena	L	Farinha de trigo, açúcar cristal, amido de milho, gordura vegetal hidrogenada, sal e leveduras, aroma artificial de baunilha.		14.900
Biscoito integral aveia e mel	M	Farinha de trigo integral e especial, óleo de milho, açúcar mascavo, flocos de aveia, mel, sal, aromas e estabilizante lecitina de soja.		26.760

ND= não detectado (menor que o limite de quantificação de glúten de 10mg/Kg ou 0,001g/100g).

## CONCLUSÃO

O Gluten Assay Kit revelou simplicidade na operação, rapidez, adequação para o número de amostras ensaiadas e exatidão satisfatória na quantificação de glúten em amostras de controle interlaboratorial FAPAS (Food Analysis Performance Assessment Scheme / UK). Os resultados foram satisfatórios na detecção de glúten nas amostras comerciais avaliadas, não revelando reações cruzadas com os produtos de milho, arroz, soja, mandioca, batata e batata doce, cujos ingredientes constavam na lista de ingredientes da rotulagem.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a FAPESP pelo apoio financeiro do Projeto nº 01/03499-9.

## REFERÊNCIAS

- Howdle PD, Blair GE. Molecular biology and coeliac disease. *Gut* 1992; 33: 573-75.
- Stern M, Ciclitia PJ, van Eckert R, Feighery C, Jansen FW, Mendez E, Mothes T, Troncone R, Wieser H. Analysis and clinical effects of gluten in coeliac disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001; 13: 741-7.
- Troncone R, Auricchio S. Gluten-sensitive enteropathy (celiac disease). *Food Rev Int* 1991; 7: 205-31.
- Food Analysis Performance Assessment Scheme. Department for Environment, Food & Rural Affairs (DEFRA). Allergens Report 2705. Series 27. Round 05. February 2003. 29p. web: <http://www.fapas.com> e-mail: [fapas@csl.gov.uk](mailto:fapas@csl.gov.uk)
- Marsh MN. Gluten, major histocompatibility complex, and the small intestine. A molecular and immunobiologic approach to the spectrum of gluten sensitivity (celiac sprue). *Gastroenterol* 1992; 102: 330-54.
- Janatuinen EK, Kempainen TA, Julkunen RJK, Kosma V-M, Maki M, Heikkinen M, Uusitupa MIJ. No harm from five year ingestion of oats in coeliac disease. *Gut* 2002; 50: 332-35.
- Lundin KEA, Nilssen EM, Scott HG, Loberg EM, Gjoen A, Bratlie J, Skar V, Mendez E, Lovik A, Kett K. Oats induced villous atrophy in coeliac disease. *Gut* 2003; 52: 1649-52.
- Storsrud S, Olsson M, Arvidsson Lenner R, Nilsson L, Nilsson O, Kilander A. Adult coeliac patients do tolerate large amounts of oats. *Eur J Clin Nutr* 2003; 57: 163-9.
- Brasil. Lei n. 8543 de 23 de dezembro de 1992. Determina a impressão de advertência em rótulos e embalagens de alimentos industrializados que contenham glúten, a fim de evitar doença celíaca ou síndrome celíaca. *Diário Oficial da União, Brasília* (1992 dez 24); Sec.1. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/>.

10. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Aprova o Regulamento Técnico para Rotulagem de alimentos e bebidas embalados que contenham glúten. Resolução RDC n. 40, 8 fevereiro 2002. Diário Oficial da União, Brasília (2002 fev 13). Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2002/40\\_02rdc.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2002/40_02rdc.htm).
11. Brasil. Lei n. 10.674 de 16 de maio de 2003. Obriga a que todos os produtos alimentícios comercializados informem sobre a presença de glúten, como medida preventiva e de controle da doença celíaca. Diário Oficial da União, Brasília (2003 maio 19); Sec.1. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>.
12. Hekkens W Th J M. Prolamin working group. Report about actions in relations to the FAO/WHO. In Working group prolamin analysis and toxicity, 8, Belgium 3 - 5 november 1993. Meeting. Tubigen, 1994 p 35-40.
13. Codex Alimentarius Commission, Proposed Draft Revised Standard for Gluten-free foods, Joint FAO/WHO Food Standards Program, 22nd Session, June 1997, ALINORM97/26 Appendix V.
14. Allmann M, Candrian U, Hofelein C, Luthy J. Polymerase chain reaction (PCR): a possible alternative to immunochemical methods assuring safety and quality of food: Detection of wheat-contamination in non-wheat food products. *Z Lebensm Unters Forsch* 1993; 196: 248-51.
15. Mendez E, Valdes I, Camafeita E. Analysis of glúten in foods by MALDITOF mass spectrometry. In: Chapman JR (editor): *Methods in Molecular Biology*. Totowa, NY: Human Press; 2000. pp. 355-67.
16. Scanlon MG, Sapirstein HD, Bushu KW. Evaluation of the precisin of HPLC for wheat- cultivar identification. *Cereal Sci* 1989; 66: 112-6.
17. Skerrit JH; Hill AS. Monoclonal antibody sandwich enzyme immunoassay for determination of gluten in foods. *J Agric Food Chem* 1990; 38: 1771-78.
18. Skerrit JH, Hill AS. Enzyme immunoassay for determination of gluten in foods: Collaborative Study, *JAOAC*. 1991; 74: 257-64.
19. Valdez I, Garcia E, Llorent M, Mendez E. Innovative approach to low-level gluten determination in foods using a novel sandwich enzyme-linked immunosorbent assay protocol. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003; 15: 465-74.
20. Mujico JR, Hernado A, Lombardia M, Benavides A, Silio V, Maki M, Kaukinen K, Collin P, Thorel L, Ryopy PH, Mendez E. Quantification of wheat, barley and rye contamination in oat samples by real-time PCR. In: *Stern Med Proceedings of the 19<sup>th</sup> Meeting of the Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity 30 September-3 October, 2004 Prague, Czech Republic 2005 Velag Wissenschaftliche Scripten* 87-93.

# Avaliação dos teores de ferro em farinhas de trigo fortificadas, São Paulo, Brasil

## Evaluation of iron content in fortified wheat flour, São Paulo, Brazil

RIALA6/1086

Carmen Sílvia KIRA\*<sup>1</sup>, Márcia Liane BUZZO<sup>1</sup>, Maria de Fátima Henriques CARVALHO<sup>1</sup>, Maria Cristina DURAN<sup>1</sup>, Alice Momoyo SAKUMA<sup>1</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Instituto Adolfo Lutz, Divisão de Bromatologia e Química, Seção de Equipamentos Especializados, Av. Dr Arnaldo 355, CEP 01246-902, São Paulo – SP, e-mail: carmkira@ial.sp.gov.br

Recebido: 18/08/2006 – Aceito para publicação: 11/10/2006

### RESUMO

A anemia por carência de ferro é o distúrbio nutricional mais comum em todo o mundo. Este problema atinge principalmente crianças e mulheres em idade reprodutiva, em função desses grupos serem mais vulneráveis à carência de ferro. Em virtude da natureza global do problema e sua importância à saúde pública, muitos programas têm sido desenvolvidos para reduzir a prevalência de distúrbios causados por deficiência de ferro. Assim, desde 2002, a fortificação de farinhas com ferro tornou-se obrigatória no Brasil. A carência de ferro pode causar diminuição da imunidade e efeitos adversos no desenvolvimento mental e motor. Por outro lado, o excesso de ferro pode promover o risco de câncer e o aumento de problemas cardiovasculares. Neste contexto, é importante que os produtos fortificados sejam controlados para que os teores de ferro estejam dentro dos parâmetros estabelecidos. Foram analisadas 85 amostras de farinha de trigo fortificadas com ferro, de diferentes marcas, para uso industrial e doméstico. Do total de amostras, 65,9% apresentaram teores de ferro fora do intervalo de tolerância, em relação ao valor declarado na rotulagem, o que comprova a necessidade de efetuar o controle no procedimento de adição de ferro em farinhas de trigo, por parte dos moinhos.

**Palavras-chave.** farinha de trigo, ferro, espectrometria de absorção atômica, fortificação, anemia.

### ABSTRACT

Iron deficiency anemia is currently the most common nutritional deficiency disorder worldwide affecting young children and women during their fertile years, since they are the most vulnerable groups for iron deficiency. Due to the global nature of the problem and its public health significance many programs have been developed for reducing the prevalence of iron deficiency. In this context, since 2002 the iron addition into flour has become mandatory in Brazil. Lack of iron may induce cellular immunodeficiency and may cause adverse mental and motor development. Otherwise, excess of iron stores may promote cancer and increase the risk of cardiovascular disorder. Thus, it is important to control fortified products in order to evaluate if the iron concentrations meet the law requirements. From the 85 wheat flour samples analyzed, 65.9% were out of the acceptance range according to the iron concentration indicated in the respective labels. These results indicated the need in assessing the procedure of iron fortification in wheat flour, carried out by the mills.

**Key words.** wheat flour, iron, absorption atomic spectrometry, fortification, anemia

## INTRODUÇÃO

O ferro é um elemento essencial da hemoglobina, o carregador de oxigênio dos glóbulos vermelhos do sangue (hemácias)<sup>1</sup>. Também é encontrado na mioglobina, que leva oxigênio para os músculos, e faz parte de muitas enzimas e compostos do sistema imunológico. Ao ajudar o sangue e os músculos a receber oxigênio, o ferro fornece energia para cada célula do corpo<sup>2</sup>.

A absorção maior de ferro pelo corpo humano ocorre nos períodos de crescimento acelerado, como gestação ou infância e a sua perda está relacionada quando ocorrem sangramentos. Assim, mulheres em idade fértil que menstruam têm frequentemente baixos níveis de ferro<sup>3</sup>. Pessoas que fazem dietas, vegetarianos e atletas também podem apresentar deficiência deste mineral<sup>4,5</sup>.

Por outro lado, o excesso de ingestão de ferro pode causar efeitos adversos sobre a absorção de outros nutrientes inorgânicos, como o cobre e o zinco; promover o risco de câncer e o aparecimento de doenças coronárias<sup>3,5</sup>.

No Brasil, o Ministério da Saúde em 2002 por meio da Comissão Interinstitucional de Condução e Implementação das Ações de Fortificação, considerou as recomendações da Organização Mundial da Saúde (OMS) e Organização Panamericana de Saúde (OPAS) para fortificação de produtos alimentícios com ferro e ácido fólico e, considerou ainda, os benefícios cientificamente comprovados que podem ser obtidos pela prática da fortificação de farinhas. O Regulamento Técnico<sup>6</sup> aprovado pelo Ministério tornou obrigatória a adição de ferro e de ácido fólico em produtos largamente consumidos pela população brasileira, tais como, farinhas de trigo e farinhas de milho, com a finalidade de reduzir a anemia ferropriva, que representa um problema nutricional importante no país.

Segundo a Organização Panamericana de Saúde<sup>7</sup> estima-se que 94 milhões de pessoas no continente americano sofram de anemia por carência de ferro. No Brasil, ela é a principal causa da mortalidade materna e do baixo peso entre recém-nascidos. A anemia ferropriva, doença grave causada pela deficiência de ferro no organismo, traz como sintomas o cansaço generalizado, apatia, palidez e a falta de ânimo para as atividades diárias. Além disso, prejudica o desenvolvimento motor, cognitivo, a linguagem e é responsável pelo atraso no desenvolvimento mental de crianças; debilita o sistema imunológico, favorece infecções, doenças e em gestantes está associada a condições como o parto pré-maturo<sup>3,8-10</sup>. Atinge aproximadamente 50% das crianças com até 5 anos de idade, 20% dos adolescentes e até 30% das gestantes<sup>11</sup>.

Diante dessa situação, o Ministério da Saúde está reforçando as ações voltadas para o combate a esse mal, de acordo com as diretrizes da política nacional de alimentação e nutrição: fornecendo orientações aos consumidores para a diversificação da dieta, distribuindo suplementos à base de ferro na rede de saúde para grupos populacionais específicos e determinando a fortificação da produção brasileira de farinhas de trigo e milho<sup>12</sup>.

De acordo com a Resolução nº 344, aprovada em 13 de dezembro de 2002<sup>6</sup>, cada 100 g de farinha de trigo e de farinha de milho devem conter 4,2 mg de ferro (30% IDR) e 150 mcg de ácido fólico (70% IDR). A fortificação da farinha com ferro e ácido fólico já é praticada em outros países e é considerada uma excelente alternativa para o combate à anemia ferropriva na população, pois tem baixo custo e é um alimento de consumo diário dos brasileiros<sup>13</sup>. O processo de fortificação das farinhas deve ser cuidadoso em função da pequena quantidade de ferro adicionado em um grande volume de farinha, cuja proporção é de 0,22 Kg/1000 Kg<sup>14</sup>.

O ferro elementar 325 mesh é a forma mais utilizada para a fortificação da farinha em função do baixo custo e também por não interferir na vida de prateleira do produto. A fortificação é realizada agregando-se geralmente um mix de ferro elementar e ácido fólico à farinha de trigo, utilizando um alimentador / dosador. Após a adição do mix, a farinha é homogeneizada para que haja uma distribuição uniforme do ferro<sup>14</sup>.

O objetivo deste estudo consistiu em avaliar os níveis de ferro em farinhas de trigo comercializadas no Estado de São Paulo e assim verificar se a legislação está sendo atendida, bem como subsidiar a avaliação do desempenho e o impacto do Programa de Suplementação de ferro.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Materiais

Foram utilizados materiais descontaminados quimicamente. As vidrarias e outros materiais foram lavados com água e detergente neutro. A seguir, foram mergulhadas em banho de ácido nítrico a 50%, durante 24 horas. Os materiais foram então, enxaguados com água destilada-desionizada (com resistividade igual a 18,2 MΩcm) e secos em estufa.

### Equipamentos

- espectrômetro de absorção atômica com chama, modelo Analyst 100, marca Perkin Elmer;
- balança analítica, modelo SA 210, marca Scientech;
- chapa elétrica, marca Fanen;
- sistema de ultra-purificação de água, modelo Milli-Q Plus, Millipore;

### Amostras

Foram analisadas diferentes marcas de farinhas fortificadas, sendo 37 amostras de uso doméstico e 48 amostras de uso industrial (farinhas pré-embaladas, as de panificação e as farinhas adicionadas nas pré-misturas ou, como ingredientes de produtos alimentícios industriais) coletadas no período de abril a junho de 2006, pelas equipes de Vigilância Sanitária, nos pontos de comércio ou padarias, do Estado de São Paulo, atendendo ao Programa Paulista 2006.

## Método

A amostra foi previamente digerida por via úmida com ácido clorídrico<sup>15</sup>, descrita a seguir: pesou-se, em triplicata, cerca de 0,5 g de amostra em um erlenmeyer de 125mL, adicionando-se um pouco de água para umidificar a amostra e acrescentou-se 2,5mL de ácido clorídrico concentrado. A seguir, a digestão foi realizada sobre chapa elétrica ajustada para 100 a 150° C por duas horas sob refluxo. Ao final da digestão, a solução foi filtrada em papel de filtro para balão volumétrico de 25mL e o volume completado com água destilada e desionizada. Para a determinação dos íons ferro utilizou-se a técnica analítica de espectrometria de absorção atômica com chama. O comprimento de onda utilizado foi 248,3nm e fenda 0,2nm.

## Validação do método

A faixa de trabalho da curva de calibração foi de 0,10mg/L a 2,0mg/L. Para a determinação do limite de quantificação foram realizadas dez preparações independentes de uma amostra de farinha sem fortificação contendo aproximadamente 1,0mg/100g de ferro, sendo que o resultado obtido para o LQ na amostra preparada foi de 0,086mg/L e o LQ do método de 0,43mg/100g. A precisão (calculado como coeficiente de variação) foi de 3,4% medida em amostras de farinha de trigo contendo aproximadamente 1,0mg/100g de ferro; para avaliar a exatidão do método analisou-se 13 replicatas do material de referência certificado NIST 1567a (wheat flour). Os valores certificado e obtido foram respectivamente, 14,1 ± 0,5 mg/kg e 14,4 ± 0,4 mg/kg.

## Tratamento estatístico

O tratamento estatístico dos dados obtidos foi realizado utilizando-se o programa estatístico GraphPad InStat<sup>16</sup>.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Resolução 344<sup>6</sup>, que aprovou o Regulamento Técnico para a fortificação das farinhas de trigo e milho com ferro e ácido fólico, fixou o limite mínimo de 4,2mg/100g de ferro em farinhas, não estabelecendo um limite máximo para a fortificação. Considerando-se essa mesma resolução e a resolução sobre rotulagem nutricional de alimentos embalados<sup>17</sup> que estabelece uma tolerância de ± 20% com relação aos valores (de nutrientes) declarados no rótulo, verificou-se que dentre as 85 amostras analisadas apenas 34,1% encontravam-se dentro do intervalo de tolerância de 3,4 e 5,0mg/100g de ferro, sendo que 51,8% das amostras apresentaram resultados acima do limite superior e 14,1% foram consideradas insatisfatórias, por conter teor de ferro abaixo do limite mínimo estabelecido. Os resultados obtidos indicam uma alta variabilidade no processo de adição de ferro nas farinhas.

Os moinhos realizam a fortificação adicionando-se um mix de ferro à farinha de trigo, utilizando-se um alimentador/

dosador. Este equipamento possibilita a adição de ferro, cujo fluxo deve ser controlado para que a adição ocorra de forma contínua e constante<sup>14</sup>. Portanto, a etapa crítica para a produção de farinhas fortificadas seria provavelmente o ajuste dos fluxos da farinha e da adição da mistura contendo ferro e ácido fólico<sup>14</sup>. Para garantir que o limite mínimo estabelecido pela legislação seja atendido, os moinhos adicionam um excesso de 10% do mix para compensar as variações da presença natural de ferro e as perdas de processamento<sup>14</sup>. Então, a alta porcentagem obtida de amostras com teor de ferro acima de 5,0 mg/100g indica a falta de controle no processo de enriquecimento. Para eliminar a presença de fragmentos metálicos provenientes da moagem são colocados separadores magnéticos no processo. Dependendo do moinho o separador magnético é colocado após a adição do mix, podendo acarretar a retirada das partículas de ferro adicionadas, o que poderia explicar os baixos teores de ferro encontrados em 14,1% das amostras de farinha analisadas.

Segundo dados do INMETRO<sup>18</sup>, o consumo anual per capita no Brasil é de 53 Kg de farinha de trigo o que daria uma ingestão diária de 145 g de farinha. Considerando a Resolução 269 do Ministério da Saúde<sup>19</sup> que estabelece uma Ingestão Diária Recomendada (IDR) de 14 mg de ferro, alimentos contendo teor de ferro acima de 9,6 mg/100 g, poderia alcançar a IDR. Das amostras analisadas 5,9% enquadram-se nesse caso.

Neste estudo foram avaliados dois tipos de farinha de trigo, o de uso doméstico e o de uso industrial. A análise estatística descritiva dos dados obtidos encontram-se na Tabela 1.

**Tabela 1.** Análise descritiva da determinação de ferro nas amostras de farinha de trigo.

Tipo de farinha (uso)	n	Conc. Fe média (mg/100g)	sd	Conc. Fe mínima (mg/100g)	Conc. Fe máxima (mg/100g)	% de amostras insatisfatórias*
Doméstico	37	5,8	2,6	1,1	14,3	18,9
Industrial	48	5,6	4,6	1,1	30,5	10,4

\*Amostras com concentrações de ferro menores que 3,4 mg/100g, que corresponde à tolerância mínima (20%) com relação à declaração na rotulagem<sup>17</sup>; n: número de amostras analisadas; sd: desvio-padrão; Conc.: concentração

Podemos observar que os valores mínimos de ferro obtidos para os dois tipos de farinha de trigo analisados foram os mesmos; com relação aos valores máximos obtidos, para a farinha de uso doméstico, a concentração de ferro obtida foi de 14,3 mg/100g enquanto que para a farinha de uso industrial o valor máximo foi de 30,5 mg/100g, o que corresponde à cerca de 726% acima da adição obrigatória. Em vista destes resultados e considerando, a Portaria n° 31<sup>20</sup>, que estabelece que o nutriente adicionado deve estar presente em concentrações que não impliquem em ingestão insignificante ou excessiva do nutriente adicionado, e ainda, que não alcance os níveis terapêuticos (no caso de adultos a dose terapêutica varia de 100 a 200 mg de ferro por dia, para o tratamento da anemia ferropriva)<sup>21</sup>, recomenda-se às autoridades competentes que se estabeleça um limite máximo de ferro na farinha de trigo, uma vez que a

ingestão de grandes quantidades de ferro podem aumentar os riscos à saúde de indivíduos que apresentam doenças devidas à absorção de ferro ou aqueles que tenham problemas gastrintestinais. Tendo em vista esta consideração, somente o consumo excessivo de uma das amostras analisadas poderia alcançar o nível terapêutico, por ter apresentado teor de ferro de 30,5mg/100g.

Excluindo esta amostra da análise estatística, não foi encontrada diferença significativa entre as médias das concentrações de ferro das farinhas domésticas e industriais ( $p>0,05$ ), porém a porcentagem de farinhas de uso doméstico, com teor de ferro abaixo do limite estabelecido foi maior que a das farinhas industriais, apresentando os valores de 18,9% e 10,4%, respectivamente.

### CONCLUSÕES

Observou-se que alguns fabricantes não controlam adequadamente o procedimento para o enriquecimento de ferro em farinhas de trigo, pois 65,9% das amostras apresentaram teores de ferro fora do intervalo de tolerância, em relação ao valor declarado na rotulagem, sendo 14,1% abaixo de 3,4 mg/100g e 51,8% acima de 5,0 mg/100g de ferro. Os moinhos necessitam implementar um sistema controlado que permita homogeneidade na adição de ferro à farinha, pois os dados obtidos demonstraram alta variabilidade no teor de ferro no produto final. As informações geradas neste estudo poderão subsidiar a avaliação do desempenho e o impacto do Programa de Suplementação de Ferro. De acordo com os resultados obtidos, as farinhas de uso industrial apresentaram menor porcentagem de amostras insatisfatórias com relação à fortificação com ferro, se comparadas às farinhas de uso doméstico. Com base nos resultados obtidos, sugere-se às autoridades competentes que se estabeleça um limite máximo de ferro na farinha de trigo.

### AGRADECIMENTOS

Ao Dr. William César Latorre do Centro de Vigilância Sanitária/SP e Equipes de Vigilância Sanitária pela amostragem.

### REFERÊNCIAS

1. Hemminki E, Nemet K, Horvath M, Malin M, Schuler D, Hollan S. Impact of iron fortification of milk formulas on infants growth and health. *Nutrition Res* 1995; 15(4): 491-503.
2. Goodenough S. Iron deficiency – a concern for infants of the 1990s. *Nutrition & Food Sci* 1994; 6: 24-5.
3. Fairweather-Tait SJ, Johnson IT, Wharf SG, Lund EK. Iron-getting the balance right. *Nutrition & Food Sci* 1997; 6: 212-4.
4. Cardoso MA, Penteado M de VC. Intervenções nutricionais na anemia ferropriva. *Cad Saúde Pública* 1994; 10(2): 231-40.
5. Martínez-Navarrete N, Camacho MM, Martínez-Lahuerta J, Martínez-Monzó J, Fito P. Iron deficiency and iron fortified foods – a review. *Food Res Intern* 2002; 35: 225-31.
6. Brasil. Resolução RDC nº 344, de 13 dez. 2002 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Aprova o regulamento técnico para a fortificação das farinhas de trigo e das farinhas de milho com ferro e ácido fólico. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 18 de dez 2002.*
7. Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS/OMS) – Brasil. Informativo de 13 de novembro de 2000. Desnutrição nas Américas. Disponível em: <http://www.opas.org.br/sistema/fotos/nutricao.htm>. Acessado em: 01 abr 2005.
8. Leal LP, Osório MM. Validação e reprodutibilidade de sinais clínicos no diagnóstico de anemia em crianças. *Cad Saúde Pública* 2005; 21(2): 565-72.
9. Brady, MC. Addition of nutrients: the importance to public health. *Br Food J* 1996; 98(9): 3-11.
10. Torrejón CS, Castillo-Durán C, Hertrampf ED, Ruz M. Zinc and iron nutrition in Chilean children fed fortified milk provided by the complementary national food program. *Nutrition* 2004; 20: 177-80.
11. Brasil. Resolução RDC nº 15 de 21 fev. 2000, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Dispõe sobre a fortificação de ferro em farinhas de trigo e milho. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 25 fev 2000.*
12. Anemia Ferropriva. Disponível em : [[http://portalweb01.saude.gov.br/alimentacao/deficiencia\\_ferro.cfm](http://portalweb01.saude.gov.br/alimentacao/deficiencia_ferro.cfm)]. Acessado em: 01 abr 2005.
13. Nayak B, Nair, KM. In vitro bioavailability of iron from wheat flour fortified with ascorbic acid, EDTA and sodium hexametaphosphate, with or without iron. *Food Chem* 2003; 80: 545-50.
14. Germani, R. et al. Embrapa. Agroindústria de alimentos. Manual de fortificação de farinhas de trigo. 2001. Embrapa Agroindústria de Alimentos. Rio de Janeiro, RJ; 56p.
15. Kira CS, Maio FD, Maihara VA. Comparison of partial digestion procedures for determination of Ca, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P and Zn in milk by inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *JAOAC Int* 2004; 87(1): 151-6.
16. GraphPad InStat version 3.00 for Windows 95, GraphPad Software, San Diego, California, USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com).

17. Brasil. Resolução RDC nº 360, de 23 dez. 2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Aprova o regulamento técnico sobre rotulagem nutricional de alimentos embalados. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 26 de dez 2003.
18. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial [INMETRO]. Farinha de trigo especial. Disponível em: <http://inmetro.gov.br/consumidor/ produtos/farinha.asp>. Acessado em 05 jul 2006.
19. Brasil. Resolução RDC nº 269, de 22 set. 2005 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Aprova o Regulamento Técnico sobre Ingestão diária Recomendada (IDR) de Proteína, Vitaminas e Minerais. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 23 de set 2005.
20. Brasil. Portaria nº 31, de 13 jan. 1998 da Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Aprova o Regulamento Técnico referente a Alimentos Adicionados de Nutrientes Essenciais. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, Seção I, 60-E, 30 de mar 1998.
21. Martindale: The complete drug reference. 34<sup>th</sup> ed. Suffolk, GB. 2005.

# Composição centesimal e mineral de diferentes formulações de multimisturas provenientes da região central do Rio Grande do Sul

## Centesimal and mineral composition of multimixtures derived from central region of Rio Grande do Sul - Brazil

RIALA6/1087

Tiago André KAMINSKI<sup>1\*</sup>, Leila Picolli da SILVA<sup>2</sup>, Milena BAGETTI<sup>1</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>1</sup> Universidade Federal de Santa Maria, Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos

Av. Rio Branco, 547 apto 05, CEP 97010-423, Centro, Santa Maria - RS, e-mail: tiagoandrekaminski@hotmail.com

<sup>2</sup> Universidade Federal de Santa Maria, Departamento de Zootecnia

Recebido: 21/08/2006 – Aceito para publicação: 28/12/2006

### RESUMO

O presente estudo avaliou 20 amostras de multimisturas quanto à composição centesimal e mineral. Considerando-se a resolução nº 53 da ANVISA, em vigor na época da coleta e análise das amostras, 55% das amostras apresentaram teor de umidade e substâncias voláteis superior ao máximo de 6,0g% e apenas 15% atingiram o teor mínimo de 5,5g% de cinzas. Atualmente, vigora a Resolução nº 263 da ANVISA, na qual o único parâmetro estipulado é o limite de 15% para umidade e substâncias voláteis; portanto, as amostras estão de acordo com a nova legislação. As médias dos grupos estatísticos, em g% de massa seca, variaram de 11,42 a 16,10 para proteína; de 3,53 a 8,54 para extrato etéreo; de 36,41 a 56,65 para carboidratos e de 14,66 a 29,76 para fibra alimentar. Foram encontrados altos teores de minerais nas amostras, atingindo 30% das Ingestões Diárias Recomendadas (IDRs) para crianças de até 10 anos, conforme a Portaria nº 33 da ANVISA. No entanto, como o acréscimo de multimistura é de cerca de 5% da dieta, apenas o mineral manganês fica caracterizado como fonte por ter atingido 15% da IDR em 65% das amostras e, ainda como alto teor em 10% das amostras por ter apresentado 30% da IDR.

**Palavras-chave.** multimisturas, suplemento alimentar, desnutrição, nutrientes, minerais.

### ABSTRACT

The present study evaluated 20 samples of multimixtures for determining the centesimal and mineral composition. Taking into account the ANVISA Resolution N°. 53 that was in force at the time these samples were collected, 55% of samples presented volatile matter content higher than the maximum of 6.0 g%, and only 15% of samples reached the minimum level of 5.5 g% of ashes. All of the analyzed sample showed the maximum level of 15% moisture and volatile matter. These findings are in accordance to the Resolution N° 263, in force at present time, in which the unique established parameter has been the limit level of 15% for moisture and volatile substances. The statistic group averages in g% of dry matter varied from 11.42 to 16.10 for protein; from 3.53 to 8.54 for lipids; from 36.41 to 56.65 for carbohydrates, and from 14.66 to 29.76 for dietary fiber. All of analyzed multimixtures might be considered as containing a significant concentration of analyzed minerals, since they reached 30% of recommended daily ingestion (RDI) for children up to 10 years of age as prescribed by ANVISA Decree N° 33. However, as multimixture format is equivalent to about 5% of the food intake, the manganese only would be provided at significant concentrations. Nearly 65% of samples were characterized as a source of manganese, as they reached 65% of RDI, while 10% of samples were characterized as having high manganese concentration, because they reached 30% of RDI.

**Key words.** multimixtures, supplementary food, malnutrition, nutrients, minerals.

## INTRODUÇÃO

Uma alimentação adequada deve fornecer os nutrientes essenciais para manutenção, crescimento, reprodução e reparação dos tecidos, segundo as necessidades individuais específicas. O não atendimento a estas exigências conduz o indivíduo à desnutrição, a qual pode acarretar vários danos à saúde e ao desenvolvimento. Sob esta condição encontram-se milhões de pessoas pertencentes a países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, tais como o Brasil<sup>1</sup>.

Em nosso país, a ocorrência de desnutrição é mais acentuada na população infantil, em especial na faixa etária entre zero e cinco anos de idade<sup>2</sup>. Segundo dados do IBGE de 2004, que considerou crianças menores de 2 anos por estas representarem o grupo mais vulnerável à desnutrição, 3,6% das crianças no primeiro ano de vida e 7,7% no segundo ano apresentavam-se em um quadro de desnutrição. Uma das principais formas de carência nutricional é o desbalanço energético-protéico, que pode levar a sérios danos no desenvolvimento físico e mental, sendo também, a principal responsável pela alta taxa de mortalidade de crianças menores de cinco anos no Brasil<sup>3</sup>.

O problema da fome e da desnutrição parte de uma situação óbvia: o acesso à alimentação. Se isto não é possível, sejam quais forem os motivos, surge a necessidade de serem encontradas alternativas que permitam o acesso à alimentação, e consequentemente, aos nutrientes necessários à sobrevivência<sup>4</sup>. Com este objetivo, surgiu a Alimentação Alternativa (AA), nome usado para designar a proposta de promover o uso de alimentos e subprodutos agroindustriais não convencionais, ricos em vitaminas e minerais, acessíveis a toda população<sup>5</sup>, na qual se insere a “multimistura”, que pode ser definida como um produto obtido, basicamente, da mistura de farelos de trigo e arroz, pó de folhas verdes, pó de sementes e pó de casca de ovos; sendo seu uso difundido por entidades governamentais e não governamentais, tais como a Pastoral da Criança (CNBB) e Fundação Nacional de Saúde, a fim de diminuir o quadro da desnutrição Nacional<sup>2</sup>.

De acordo com Brandão (1996)<sup>4</sup>, o uso da multimistura em doses mínimas, mas constantemente acrescidas à alimentação, fornece nutrientes considerados indispensáveis para promover um ótimo crescimento da criança e do feto, aumentando a resistência a infecções, prevenindo e curando a anemia nutricional, diminuindo diarreias, reduzindo doenças respiratórias, elevando a produção de leite materno e mantendo a saúde. Porém, a maioria dos trabalhos científicos desenvolvidos com a finalidade de avaliar a eficácia deste suplemento alimentar, tem demonstrado fragilidade nos argumentos utilizados em favor dos seus supostos benefícios<sup>1,3,6,7</sup>.

Neste contexto, e considerando que a informação sobre a composição dos alimentos é um indicativo do respectivo valor nutritivo, o presente trabalho foi conduzido com o objetivo de determinar a composição centesimal e mineral de diferentes

amostras de multimisturas produzidas na Região Central do Rio Grande do Sul, estabelecendo relações entre as diferentes formulações com suas respectivas variações constitucionais e nutricionais.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Amostras

Foram analisadas vinte amostras de multimisturas, coletadas de diferentes comunidades integrantes da Diocese de Santa Maria e de feiras livres da Região Central do Rio Grande do Sul. Os ingredientes utilizados na formulação de cada amostra estão descritos na Tabela 1.

As diferentes comunidades que forneceram as amostras para análise, reiteram que, para o preparo das multimisturas foram observadas as seguintes recomendações básicas da Pastoral da Criança<sup>8</sup>.

- Lavagem e secagem à sombra das folhas verdes selecionadas, seguida de moagem em liquidificador.
- As sementes foram lavadas em água corrente, secas ao sol, moídas em liquidificador e torradas.
- As cascas de ovos foram lavadas em água corrente, submersas em uma solução de hipoclorito de sódio a 1% para desinfecção, retirada a película interna, secas em ambiente arejado e moídas também em liquidificador.
- Os farelos e as farinhas foram torrados separadamente até leve tostamento.
- Ingredientes tais como leite em pó, aveia em flocos e açúcar mascavo, entre outros, quando presentes na formulação, foram adicionados no final da preparação.
- Todos os ingredientes, secos, pulverizados e torrados, obtidos nos processos acima citados, foram misturados obtendo-se uma mistura final.

### Composição centesimal

As análises da composição centesimal foram realizadas de acordo com métodos analíticos propostos pela AOAC – 2000 (Association of Official Analytical Chemists)<sup>9</sup>, sendo que os valores de carboidratos foram estimados por diferença entre 100 menos somatórios dos demais parâmetros analisados.

Na determinação das substâncias voláteis, as amostras foram submetidas à secagem em estufa a 105°C até atingirem peso constante, enquanto que para a obtenção do resíduo mineral fixo (cinzas), as amostras foram submetidas à mufla, com temperatura de 550°C, pesando-se o resíduo remanescente. Os lipídios foram determinados a partir de extração com éter de petróleo em sistema tipo Soxhlet.

A proteína bruta foi determinada a partir da quantificação do nitrogênio total, após digestão ácida, destilação pelo método Kjeldahl e titulação. O fator de conversão de nitrogênio para proteína bruta adotado foi de 6,25.

A fração de fibra alimentar foi determinada a partir do método enzimático 991.43 da AOAC<sup>9</sup>.

**Tabela 1.** Composição percentual dos ingredientes utilizados nas diferentes amostras de multimisturas.

Ingredientes/ Amostras	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Farelo de trigo	28,88	32	14,56	34,78	32,6	37,47		44,3		46,2	6,22	43,1	15,61	54,43	14,57	32,61	17,58	49,02	30,03	49,02
Farelo de arroz	14,44	32	14,56	34,78	16,3	22,48	13,1	8,9		17,3	3,11		15,61	11,1	10,6	16,31	7,73	19,61		19,61
Flocos de aveia	7,22							13,1	8,9									9,8	15,02	
Farinha de trigo								8	71,4	11,5	10,06		24,25		23,84		28,73			
Farinha de aveia		8	10,74	8,7						11,5		7,19		4,64						9,8
Farinha de milho	7,22	16	26,94	8,7	32,6	13,96		8,9	14,2	11,5	11,59	14,3	28,17	12,41	23,84	32,61	30,39	9,8	18,02	9,8
Farinha de arroz																				
Farinha de soja			12,86						7,2			2,15								6,01
Farinha de mandioca	7,22		19,35	8,7	16,3	15,43		9,7		11,5	6,4	7,19	16,07	13,72	21,19	16,31	12,15	9,8	25,53	9,8
Germe de trigo	7,22							13,1	8											
Fibra de trigo								26,3												
Fibra de milho								26,3												
Fibra de soja	7,22			2,17				6,5												
Açúcar mascavo	7,12	8										7,19								
Linhaça em pó	3,6																			
Gergelim em pó	3,6				1,3		1,3	2,2				1,43						0,49		
Amendoim	3,6																			
Pó de sementes	2,16		0,59		1,3	5,14		0,6		0,9	1,01	2,86	0,18	1,8	2,65	0,54	1,66	0,74	3,15	0,19
Pó de folhas verdes	0,36	3,2	0,1	2,17	0,7	5,51		0,4	7,2		0,61	1,43	0,11	1,09	2,65	0,65	1,66	0,74	1,8	1,47
Pó de casca de ovo		0,8												0,82	0,66	0,98			0,45	
Leite em pó																				60,99

A determinação de atividade de água foi feita em aparelho AquaLab, digital, modelo CX-2 (marca Decagon).

### Composição mineral

Os macrominerais e microminerais foram determinados conforme métodos descritos por Tedesco et al.<sup>10</sup>.

### Macrominerais

Obteve-se um extrato a partir da digestão completa da amostra em ácido sulfúrico e alta temperatura (350-375°C).

- Fósforo: foi determinado por espectrofotometria numa alíquota de extrato após adição de molibdato de amônio e ácido aminonaftolsulfônico.

- Potássio: foi determinado por fotometria de chama após diluição do extrato, ajustando-se a sensibilidade do aparelho com os padrões adequados.

- Cálcio e Magnésio: foram determinados por espectrofotometria de absorção atômica com chama ar/acetileno após diluição do extrato e adição de solução ácida de estrôncio.

### Microminerais

Obtiveram-se extratos das amostras a partir de digestões ácidas sob temperaturas controladas, primeiramente com ácido nítrico (120°C) e, posteriormente, com ácido perclórico (180-190°C).

- Cobre, Zinco, Ferro e Manganês: foram determinados por espectrofotometria de absorção atômica com chama ar/acetileno.

- Sódio: foi determinado por fotometria de chama após diluição do extrato, ajustando-se a sensibilidade do aparelho com os padrões adequados.

### Análise estatística

Os resultados foram submetidos à análise multivariada de agrupamento hierárquico, conforme o método de Ward e indicado por Hair Jr. et al.<sup>11</sup>. O programa utilizado para as análises foi o SPSS 8.0 para Windows. As médias dos grupos foram submetidas a análises de Tukey, estabelecendo-se um nível de significância de 5%.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A determinação da composição química do alimento a partir dos teores de nutrientes presentes é importante como indicativo dos distintos efeitos que estas substâncias podem exercer no organismo humano. Desta maneira, a variação na composição química de determinado alimento, como no caso, a multimistura, pode definir melhor ou descaracterizar seu uso na nutrição humana.

Embora os resultados da composição centesimal das amostras de multimisturas tenham demonstrado amplas variações (Tabelas 2 e 3), eles se assemelharam à resultados relatados em outros trabalhos<sup>12,13,14,15</sup>. Esta variação pode ser atribuída à grande heterogeneidade das formulações (Tabela 1), que se diferenciam tanto em identidades como em quantidades dos ingredientes usados na obtenção das multimisturas.

Na data de recebimento e análise das amostras de multimisturas, estava em vigor a Resolução RDC nº53, de 15 de junho de 2000 da ANVISA<sup>16</sup>, que estabelecia um limite máximo de 6,0% de umidade e substâncias voláteis e um limite mínimo de 5,5% de resíduo mineral fixo (cinzas) para misturas à base de farelos de cereais, além disso, estavam estabelecidos limites para parâmetros como fibra bruta, acidez em solução, ácido cianídrico e ácido fólico. Atualmente vigora a Resolução nº263, de 22 de setembro de 2005<sup>17</sup>, nesta Resolução está estabelecido um limite máximo apenas para a umidade e substâncias voláteis, que passou a ser de 15% para misturas à base de farelos, enquanto que os demais parâmetros abordados na Resolução anterior não aparecem mais.

Ambas Resoluções<sup>16,17</sup>, estabelecem que produtos como a multimistura devem apresentar, obrigatoriamente, a seguinte sentença: “*O Ministério da Saúde adverte: não existem evidências científicas de que este produto previna, trate ou cure doenças*”; além de vetar a indicação do produto para suprir deficiências nutricionais. Isto não foi observado em nenhuma das amostras de multimisturas estudadas.

A partir das análises realizadas, constatou-se que 55% das amostras apresentaram teor de umidade e substâncias voláteis superiores ao fixado pela legislação anterior, ou seja, a Resolução nº53<sup>16</sup>, enquanto que, considerando a Resolução vigente<sup>17</sup> todas as amostras estão abaixo do limite máximo estabelecido (Tabela 2). Porém, deve-se considerar que mesmo constituindo-se em valores elevados de umidade para a natureza das amostras em questão e independente dos limites de umidade e substâncias voláteis estabelecidos na legislação, os parâmetros de conservação devem ser estabelecidos considerando primeiramente a atividade de água, que para todas as amostras foram inferiores a 0,6 (Tabela 2); indicando pequeno risco de deterioração por crescimento fúngico e bacteriano<sup>18</sup>.

Em relação às cinzas, apenas três amostras, 15% das amostras, apresentaram o limite mínimo estipulado pela legislação anterior, de 5,5g%, (multimisturas 4, 6 e 12); resultado semelhante foi constatado no trabalho realizado por Vizeu et al<sup>3</sup>. Este fato poderia ser indicativo de amostras de multimisturas menos eficazes na complementação mineral de dietas acrescidas deste suplemento, porém como a atual legislação<sup>17</sup> não estabelece mais um limite mínimo de cinzas, o potencial de suplementação mineral das

multimisturas pode ser melhor definido a partir de uma análise específica de minerais. De maneira geral, as multimisturas com os maiores teores de cinzas, como por exemplo, as amostras 1, 4, 6, 12, 19 e 20 (Tabela 2), apresentam expressiva porcentagem de farelos na composição (Tabela 1).

As proteínas constituem uma parcela significativa e menos variável, quando comparadas aos demais nutrientes presentes nas multimisturas analisadas (Tabela 3). Mesmo assim, dois grupos bem definidos quanto a esta medida puderam ser obtidos com o agrupamento estatístico, sendo que as multimisturas pertencentes aos grupos 1 e 3 apresentaram teores aproximadamente 38% superiores de PB em comparação àquelas dos grupos 2 e 4. São diversos os ingredientes que contribuem para o teor protéico das multimisturas, porém algumas multimisturas com altos teores protéicos, por exemplo as amostras 1, 7, 8, 12 e 19, inseridas nos grupos com maior teor protéico, caracterizam-se por apresentar farinha de soja ou germe de trigo na composição (Tabelas 1 e 3).

**Tabela 2.** Valores de substâncias voláteis, atividade de água e cinzas das multimisturas.

Multimisturas	Substâncias voláteis (g% na amostra integral)	Atividade de água	Cinzas g% na amostra integral
1	4,59	0,30	5,30
2	7,08	0,44	3,87
3	5,19	0,29	3,60
4	9,27	0,60	6,41
5	6,83	0,50	4,00
6	3,84	0,35	6,01
7	5,74	0,44	4,43
8	5,71	0,40	3,89
9	6,71	0,38	3,97
10	9,28	0,59	3,86
11	4,46	0,32	2,76
12	3,38	0,25	5,63
13	5,45	0,38	3,36
14	8,30	0,45	4,42
15	4,61	0,23	3,40
16	9,25	0,52	3,85
17	9,31	0,49	2,81
18	9,70	0,54	3,59
19	7,35	0,46	5,14
20	7,75	0,42	4,74

Sabe-se, no entanto, que o teor protéico não estabelece uma avaliação da qualidade nutricional da proteína, que tem seu perfil de aminoácidos variável conforme a fonte de origem<sup>19</sup>. Como nas multimisturas as proteínas são de origem vegetal, deduz-se que estas sejam de menor valor biológico. No entanto, deve-se considerar que mesmo uma pequena contribuição da multimistura quanto a este nutriente pode ser muito importante,

**Tabela 3.** Grupos de multimisturas formados quanto às diferenças de composição centesimal (% de massa seca).

Grupo	Multimisturas	PB*	Lipídios	CNE*	FAT*	FAS*	FAI*	Proporção FAS:FAI
1	1, 6, 12 e 19	15,92 3,38 <sup>a</sup>	± 8,54 2,97 <sup>a</sup>	± 36,41±5,15 <sup>b</sup>	29,76±3,06 <sup>a</sup>	7,77 ± 1,33 <sup>a</sup>	21,99 ± 2,26 <sup>a</sup>	1 : 2,83
2	2, 3, 4, 5, 11 e 13	11,42 1,96 <sup>b</sup>	± 7,15 1,20 <sup>ab</sup>	± 56,65±12,10 <sup>a</sup>	14,66±7,16 <sup>b</sup>	1,91 ± 1,44 <sup>c</sup>	11,53 ± 4,27 <sup>b</sup>	1 : 6,04
3	7, 8, 9 e 14	16,10 2,55 <sup>a</sup>	± 5,34 1,04 <sup>bc</sup>	± 47,84±4,16 <sup>ab</sup>	20,20±3,05 <sup>b</sup>	3,53 ± 0,82 <sup>b</sup>	16,67 ± 3,54 <sup>ab</sup>	1 : 4,72
4	10, 15, 16, 17, 18 e 20	11,75 2,26 <sup>b</sup>	± 3,53 0,87 <sup>c</sup>	± 52,56±9,93 <sup>a</sup>	19,81±6,21 <sup>b</sup>	0,71 ± 0,49 <sup>c</sup>	16,64 ± 4,18 <sup>ab</sup>	1 : 23,44

\* PB = proteína bruta, CNE = carboidratos calculados por diferença (100 – demais parâmetros), FAT = fibra alimentar total, FAS = fibra alimentar solúvel, FAI = fibra alimentar insolúvel.

\*\* Valores expressos como média ± desvio padrão.

\*\*\* Letras distintas entre as médias indicam diferença estatística significativa ao nível de 5% pelo teste de Tukey.

uma vez que deficiência protéica tem sido apontada como principal problema das dietas de populações carentes. Tal fato é ressaltado por alguns autores, que frisam a possibilidade do aproveitamento de folhas verdes e outras matérias-primas, atualmente pouco utilizadas ou desperdiçadas, como fontes protéicas<sup>20</sup>. Entre as novas formulações de multimisturas propostas sugerem-se a inclusão de ingredientes de alta qualidade protéica quanto ao perfil aminoacídico, são exemplos o leite em pó, inclusive presente em grande quantidade na multimistura 11, e a farinha de milho QPM BR 473, com teores significativos de aminoácidos essenciais como lisina e triptofano<sup>19</sup>.

Os lipídios (extrato etéreo) são constituintes menos expressivos nas amostras de multimisturas, no entanto, não podem ser considerados irrelevantes, pois estes, quando presentes nas condições em que ocorrem as suplementações, podem contribuir de forma decisiva para a adequada absorção de vitaminas lipossolúveis e, conseqüentemente, na utilização metabólica de proteínas e carboidratos<sup>1</sup>. Da mesma forma que relatado para proteína, o valor nutricional desta fração alimentar pode ser amplamente variável, de acordo com a fonte utilizada. Óleos presentes na linhaça, semente de girassol, castanha e amêndoas, entre outros, são fontes de ácidos graxos poliinsaturados (PUFAS), que reconhecidamente exercem efeitos consideráveis ao bom funcionamento metabólico e manutenção da saúde humana<sup>21,22</sup>. Já, fontes menos nobres não causarão estes mesmos efeitos benéficos. Alguns ingredientes, tais como linhaça, semente de girassol, gergelim e amendoim, com relativo baixo custo, são usados na formulação de multimisturas (tabela 1). O uso destes ingredientes em maior proporção nas multimisturas aumentaria os teores de ácidos graxos poliinsaturados neste suplemento e, numa dieta constantemente suplementada, poderia reverter-se em efeitos

benéficos à saúde, ao mesmo tempo, requereria cuidados especiais para evitar o desenvolvimento de processo oxidativo.

Nas últimas duas décadas, com o expressivo aumento de consumo de alimentos refinados, a fibra alimentar vem adquirindo um *status* importante do ponto de vista nutricional. O valor nutritivo agregado aos teores de fibra alimentar se deve aos seus respectivos efeitos fisiológicos, diferentes para as frações (insolúvel e solúvel) e diretamente relacionados com suas propriedades físico-químicas (solubilidade, absorção/retenção de água, absorção de compostos orgânicos e capacidade de ligação)<sup>23</sup>.

A proporção diferenciada entre os grupos quanto a FAS:FAI, pode resultar em efeitos fisiológicos distintos no organismo humano. Dietas com maior proporção de fibras alimentares insolúveis resultam em aumento da absorção e retenção de água, facilitando o movimento do bolo digestivo no trato gastrointestinal, causando aumento no peso das fezes e velocidade de trânsito das mesmas; desta forma há uma redução de quadros de constipação e efeitos positivos sobre alguns males tais como hemorróidas, varizes e diverticulites. Já, dietas com maior proporção de fibras alimentares solúveis podem auxiliar no controle e diminuição dos níveis de colesterol e glicose sanguínea, bem como, servirem de fonte de fermentação para bactérias benéficas da flora intestinal com produção de ácidos graxos de cadeia curta<sup>23</sup>.

Em todos os grupos puderam-se constatar teores de FAI superiores aos de FAS, porém, variáveis de acordo com o respectivo grupo, o que está relacionado aos ingredientes usados nas diferentes formulações de multimisturas. Maiores teores de FAI nas multimisturas, geralmente, são causados por proporções mais elevadas de farelos de cereais e folhas verdes nas formulações<sup>13</sup>, como verificado nas amostras do grupo 1 (Tabelas 1 e 3). Enquanto que, maiores

teores de FAS, geralmente, são oriundos de ingredientes como aveia, pós de sementes e derivados de soja, que apresentam teores consideráveis de FAS na sua composição<sup>13</sup>, isto foi constatado principalmente nas amostras dos grupos 1 e 3 (Tabelas 1 e 3).

De acordo com a Portaria n° 27 da ANVISA de 13 de janeiro de 1998<sup>24</sup>, que estabelece o Regulamento Técnico Referente à Informação Nutricional Complementar, para um alimento ser considerado com alto teor de fibras alimentares, estas devem constituir no mínimo 6g em 100g de produto. Constata-se assim, que todas as amostras estudadas poderiam ser consideradas de alto teor de fibras alimentares de acordo com a legislação vigente, porém considerando a quantidade de multimistura habitualmente utilizada na suplementação, cerca de 5% no peso da refeição, a alimentação não estaria caracterizada como de alto teor de fibras alimentares.

Um aspecto nutricional negativo associado ao consumo de fibras alimentares é a possibilidade de haver diminuição da disponibilidade de minerais, como alguns estudos já demonstraram *in vitro*<sup>23</sup>. Estudos clínicos examinando os efeitos de fibras alimentares no balanço mineral em humanos confirmam este efeito antinutricional, principalmente com a utilização de fibras purificadas, como a celulose. Entretanto, alguns estudos indicam que as fibras alimentares da dieta não têm efeitos negativos sobre a absorção de minerais em humanos, atribuindo este efeito antinutricional aos fitatos que, geralmente, acompanham os teores de fibras alimentares, pois ambos provêm de algumas fontes em comum<sup>6,23</sup>.

O avanço do conhecimento sobre determinantes do crescimento e ganho de peso em crianças tem destacado o papel dos micronutrientes. Sabe-se que os minerais desempenham diversas funções no organismo, atuando entre outros, como cofatores enzimáticos, sendo necessários em quantidades que dependem da fase de crescimento, das condições fisiológicas, do estado nutricional e da saúde do indivíduo<sup>3</sup>. Neste contexto, foi possível observar que em relação aos minerais, as amostras de multimisturas foram agrupadas em três grupos estatisticamente distintos, de acordo com os teores determinados.

Como esperado, os teores de cinzas das amostras foram diretamente relacionados com os respectivos teores dos minerais individuais (correlações superiores a  $r=0,63$ ,  $p<0,05$ )<sup>11</sup>, com exceção do Ca, que por sua vez tem seus teores relacionados à constituintes particulares da formulação das multimisturas, como casca de ovos.

Como já enfatizado em outros trabalhos<sup>3, 6, 12, 14, 15</sup>, as multimisturas apresentam teores significativos de macro e microminerais em comparação aos demais alimentos. No entanto, quando simulado o seu uso como suplemento alimentar na dieta (de 1 a 5%), estas não alcançam os teores mínimos da legislação para serem consideradas fontes minerais. De acordo com a legislação, Portaria n° 27 de 13 de janeiro de 1998<sup>24</sup>, para um alimento ser considerado fonte de mineral específico, deve fornecer no mínimo 15% da quantidade da ingestão diária recomendada (IDR) deste, enquanto que para ser considerado de alto teor, esta percentagem deve ser de no mínimo 30%.

**Tabela 4.** Grupos de multimisturas agrupados quanto às diferenças de macrominerais (mg/100 g de massa seca).

Grupo	Multimisturas	P	K	Ca	Mg
1	1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10 e 19	574,25 ± 69,46 <sup>a</sup>	799,12 ± 118,10 <sup>a</sup>	52,15 ± 22,49 <sup>b</sup>	161,97 ± 17,64 <sup>a</sup>
2	2, 9, 12, 13, 14 e 15	398,42 ± 59,56 <sup>b</sup>	587,70 ± 95,57 <sup>b</sup>	156,24 ± 59,91 <sup>a</sup>	136,10 ± 25,57 <sup>b</sup>
3	11, 16, 17, 18 e 20	367,59 ± 57,26 <sup>b</sup>	462,06 ± 45,60 <sup>c</sup>	37,80 ± 15,10 <sup>b</sup>	112,60 ± 7,34 <sup>c</sup>

\*os valores estão expressos como média ± desvio padrão

\*\*letras distintas entre as médias indicam diferença estatística significativa ao nível de 5% pelo Teste de Tukey

**Tabela 5.** Grupos de multimisturas agrupadas quanto às diferenças de microminerais (mg/100 g de massa seca).

Grupo	Multimisturas	Zn	Cu	Mn	Fe	Na
1	1, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 14, 18 e 20	6,98 ± 0,71 <sup>b</sup>	0,85 ± 0,097 <sup>b</sup>	7,42 ± 1,20 <sup>b</sup>	6,05 ± 1,30 <sup>b</sup>	6,90 ± 1,86 <sup>a</sup>
2	2, 3, 5, 13, 15, 16 e 17	5,34 ± 0,41 <sup>c</sup>	0,53 ± 0,071 <sup>c</sup>	5,08 ± 0,99 <sup>c</sup>	4,90 ± 0,64 <sup>b</sup>	6,49 ± 2,32 <sup>a</sup>
3	12 e 19	8,49 ± 0,05 <sup>a</sup>	1,25 ± 0,014 <sup>a</sup>	9,96 ± 1,68 <sup>a</sup>	8,15 ± 0,23 <sup>a</sup>	5,80 ± 3,34 <sup>a</sup>

\*os valores estão expressos como média ± desvio padrão

\*\*letras distintas entre as médias indicam diferença estatística significativa ao nível de 5% pelo Teste de Tukey

Considerando as 20 amostras de multimisturas analisadas, pode-se inferir que apresentam altos teores minerais, correspondendo a mais de 30% da IDR para crianças de 1 a 10 anos para P, Mg, Zn, Cu, Mn e Fe em 100g de amostra integral das multimisturas<sup>25</sup>. Porém, como a multimistura é acrescida à alimentação, em torno de 5% do peso da refeição, a relação entre IDRs e concentração destes minerais deve ser estabelecida levando em consideração o acréscimo que é feito na alimentação. Então, o único mineral que atinge a concentração na alimentação para que a multimistura seja considerada como fonte, em 65% das amostras (multimisturas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 14, 16, 18 e 20), e, como de alto teor, em 10% das amostras (multimisturas 12 e 19), é o manganês.

Em outros trabalhos<sup>3,6</sup>, o número de multimisturas analisadas para minerais é bem menor e com menor variação entre as matérias-primas constituintes, quer dizer com formulações muito parecidas, porém os resultados encontrados

foram reproduzidos neste estudo, inclusive enfatizaram uma maior contribuição do manganês da multimistura para o alcance da IDR deste mineral.

Deve-se ainda ressaltar que a variação significativa nos teores de minerais encontrada entre os grupos analisados não é suficiente para inferir sobre o valor nutritivo das respectivas multimisturas, pois existe uma grande variação de disponibilidade biológica de minerais, que depende principalmente da natureza química do composto, da complexação com outras substâncias contidas nos alimentos e da competição de dois ou mais elementos pelo mesmo sítio de ação ou mecanismo de absorção<sup>3,26</sup>. Por exemplo, em multimisturas com altos teores de minerais e ao mesmo tempo com teores consideráveis de fibras e substâncias antinutricionais, é provável que parte destes minerais não seja aproveitada pelo organismo, portanto, para que a multimistura seja de maior valor nutritivo, quanto aos minerais, é mais apropriado que estes minerais sejam provenientes de ingredientes livres de substâncias com ação antinutricional.

Especificamente considerando os teores de cálcio, foi observado que os determinados no presente estudo foram inferiores aos citados em outros trabalhos<sup>3,6,12,14</sup>. A explicação para este fato pode estar nas matérias-primas utilizadas nas multimisturas analisadas nas diversas pesquisas, pois nas multimisturas com maior teor de cálcio, o pó de casca de ovos era um ingrediente bastante relevante na composição, enquanto que nas multimisturas analisadas neste trabalho, o pó de casca de ovos esteve presente em apenas 25% das amostras e em quantidades muito pequenas, que não chegaram a 1% da formulação total (Tabela 1).

A recomendação da Pastoral da Criança a nível nacional<sup>8</sup>, é de adicionar uma pequena quantidade de pó de cascas de ovos nas multimisturas, baseando-se em estudos que descrevem que o do carbonato de cálcio das cascas de ovos é muito bem aproveitado e contribui de forma significativa para o aporte diário de cálcio nas populações de baixa renda<sup>27</sup>. Por outro lado, alguns críticos do uso das cascas de ovos, baseiam-se em argumentos acerca da interação Ca:Fe, na qual o aumento na ingestão de Ca pode resultar na instalação de um quadro de anemia em indivíduos com uma ingestão marginal de Fe, em especial devido a interferência do carbonato de cálcio, presente em grande quantidade na casca do ovo<sup>28</sup>. Ao mesmo tempo, a Pastoral da Criança orienta sobre a preparação do pó de casca de ovos, pois há a preocupação de contaminação microbiológica por *Salmonella spp.* se não for realizada uma sanitização adequada nas cascas de ovos<sup>8,29</sup>.

## CONCLUSÃO

De maneira geral, os resultados da composição centesimal e mineral demonstraram ampla variabilidade, o que pode ser atribuído à grande diferença do tipo e proporção de ingredientes usados nas formulações destas multimisturas.

As análises indicam que as fibras alimentares e os minerais destacam-se nas multimisturas. Ingredientes tais como farelos de cereais e folhas verdes em geral contribuíram para os teores de FAI, enquanto que ingredientes como aveia, pós de sementes e derivados de soja contribuíram para os teores de FAS. Mesmo as amostras apresentando quantidades significativas de fibras alimentares e minerais, a suplementação em 5% da dieta, apenas permite caracterizar 65% das amostras como fonte e 10% como de alto teor de manganês, considerando a IDR deste mineral para crianças até 10 anos de idade.

## AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pelo apoio financeiro, à Pastoral da Criança – Diocese de Santa Maria pela concessão de amostras e informações, à EMATER RS e à NOVOZYMES pela doação das enzimas utilizadas nas análises.

## REFERÊNCIAS

1. Ferreira HS, Paes CAMC. Efetividade de uma multimistura como suplemento da dieta básica regional. Anais da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Rio de Janeiro, v.1, 1998.
2. UNICEF. Alimentação Alternativa. Aspectos Nutricionais e Sociais. O papel das Instituições. Fortaleza, 1994. 14p.
3. Vizeu VE, Feijó MBS, Campos RC. Determinação da composição mineral de diferentes formulações de multimistura. Ci Tecnol Aliment 2005; 25(2): 254-58.
4. Brandão TTC, Brandão RF. Alimentação Alternativa. Brasília: INAN/Ministério da Saúde. 1996. 95p.
5. Beausset I. Estudio de las bases científicas para el uso de alimentos alternativos en la nutrición humana. INAN/UNICEF; jun 1992.
6. Santos HB, Madruga MS, Bion FM, Antunes NLM, Mendes K, Aguida R. Estudos bioquímicos e hematológicos em ratos sobre biodisponibilidade de minerais numa dieta enriquecida com multimistura. Ci Tecnol Aliment. 2004; 24 (4): 613-8.
7. Azevedo VB, Dias MM, Boaventura GT, Carmo MGT, Fernandes NR. Influência da multimistura na gestação de ratas: pesos materno e fetal e triglicerídios séricos. Rev Nutr. 2003; 16 (1): 83-91.
8. Recomendações básicas para preparo da multimistura. Site da Pastoral da Criança: [http://www.pastoraldacrianca.org.br/htmltonuke.php?filnavn=dicas/segalim/dicas\\_mai\\_2000.htm](http://www.pastoraldacrianca.org.br/htmltonuke.php?filnavn=dicas/segalim/dicas_mai_2000.htm) Acesso em 21 de outubro de 2006.
9. AOAC. Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 17 ed. Washington, USA; 2000.
10. Tedesco MJ, Gianello C, Bissani CA, Bohnen H, Volkweiss SJ. Análises de solo, plantas e outros materiais. 2ª ed. Porto

- Alegre (RS): Boletim Técnico do Departamento de Solos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1995.
11. Hair Jr. JF, Anderson RE, Tatham RL, Black WC. *Multivariate Data Analysis with Readings*. 4<sup>th</sup> ed. Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall; 1995.
  12. Madruga MS, Camara FS. The chemical composition of "Multimistura" as a food supplement. *Food Chem*. 2000; 68 (1): 41-4.
  13. Oliveira EM, Fernandes NRA, Boaventura GT. Qualidade protéica da dieta consumida por crianças desnutridas do município de Quissamã e adicionada de alimentos não convencionais: estudo em ratos [monografia]. Niterói, Rio de Janeiro: Universidade Federal Fluminense, 1997.
  14. Madruga MS, Santos HS, Bion FM, Antunes NLM. Avaliação nutricional de uma dieta suplementada com multimistura: estudo em ratos *Ci Tecnol Aliment*. 2004; 24 (1): 129-33.
  15. Instituto de Tecnologia de Alimentos. Avaliação química e nutricional de farinha composta. Campinas, 1995. 10p.
  16. Brasil. Resolução RDC nº53 de 15 de junho de 2000 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Misturas à Base de Farelo de Cereais. *Diário Oficial da União, Brasília, DF*, 19 jun. 2000. Seção 1, p. 36-7.
  17. Brasil. Resolução RDC nº263 de 22 de setembro de 2005 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Aprova o Regulamento Técnico para Produtos de Cereais, Amidos, Farinhas e Farelos. *Diário Oficial da União, Brasília, DF*, 23 set. 2005. Seção 1, p. 368-9.
  18. Bobbio, PA, Bobbio FO. *Química de processamento de Alimentos*. 2<sup>a</sup> ed. São Paulo: Livraria Varela; 1992.
  19. Gloria ECS, Almeida NAV, Costa A, Henriques Jr. E, Martins SL, Paula H, Silva ME, SANTOS RC, Malaquias LCC. Protein evaluation of a nutritional supplement based on QPM BR 473 maize. *Rev Nutr*. 2004; 17(3): 379-85.
  20. Pechnik E, Guimarães LR, Panek A. Sobre o aproveitamento da folha de mandioca (*Manihot* sp) na alimentação humana. II. Valor Nutritivo. *Arq Bras Nutr*. 1962; 18(1/2): 11-23.
  21. Muller M, Do Prado IN, Lobo Jr. AR, Campovilla LCT, Rigolon LP. Fontes de gordura ômega-3 e ômega-6 sobre a digestibilidade aparente de novilhos de corte confinados. *Acta Scientiarum Ani Sci*. 2004; 26(3):393-8.
  22. Machado FMS, Santiago VR. Os benefícios do consumo de alimentos funcionais. In: Torres EAF, Machado FMS. *Alimentos em questão: uma abordagem técnica para as dúvidas mais comuns*. São Paulo: Ponto Crítico; 2001. p. 35-43.
  23. Sá RM, De Francisco A. Curso Teórico - Prático de fibras alimentares. Universidade Federal de Santa Catarina, Laboratório de Ciência e Tecnologia de Cereais, Florianópolis, jun 2000.
  24. Brasil. Portaria nº27 de 13 de janeiro de 1998 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Regulamento Técnico referente à Informação Nutricional Complementar. *Diário Oficial da União, Brasília, DF*, 16 jan. 1998. Seção 1, p. 1-3.
  25. Brasil. Portaria nº33 de 13 de janeiro de 1998 da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Regulamento Técnico sobre a Ingestão Diária Recomendada (IDR) de Proteína, Vitaminas e Minerais. *Diário Oficial da União, Brasília, DF*, 16 jan. 1998. Seção 1, p. 5-8.
  26. Sgarbieri VC. *Alimentação e nutrição: fator de saúde e desenvolvimento*. São Paulo; Almed; 1987.
  27. Naves MMV. Pó da casca de ovo como fonte de cálcio: qualidade nutricional e contribuição para o aporte adequado de cálcio. 2003. Disponível em: [http://www.proec.ufg.br/revista\\_ufg/fome/casca.html](http://www.proec.ufg.br/revista_ufg/fome/casca.html) Acesso em 25/10/2006.
  28. Coelho RG. Interações nutricionais/parte 1: Interações ao nível do trato gastrointestinal. *Rev. Metab. Nutr*. 1995; 2 (3): 106-17.
  29. Barros MR, Andreatti Filho RL, Lima ET, Sampaio HM, Crocci AJ. Survival of *Salmonella enteritidis* in Eggs Artificially Contaminated, After Disinfection and Stored at Different Temperatures. *Rev. Bras. Cienc. Avic*. 2001; 3 (3): 219-23.

# Avaliação do leite *in natura* comercializado clandestinamente no município de Morrinhos, GO.

Avaliation of *in natura* milk commercialized without due authorization in Morrinhos city,GO.

RIALA6/1088

Rosângela C. QUINTANA<sup>1</sup>, Lílian C. CARNEIRO<sup>1\*</sup>.

\* Endereço para correspondência: Rua Urias de Oliveira Filho, quadra 44, lote 05; Setor: Jardim Europa – Goiânia – GO, Brasil. CEP: 74325-040. lilian.carneiro@ueg.br

<sup>1</sup>Universidade Estadual de Goiás, unidade de Morrinhos – UEG- Morrinhos - GO. Rua 14 n° 625, Jardim América, Morrinhos - GO. CEP: 75650. Departamento de Biologia.

Recebido:27/03/2006 – Aceito para publicação: 07/02/2007

## RESUMO

Em Morrinhos,GO, é uma prática comum os produtores rurais distribuírem o leite diretamente aos consumidores. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a qualidade microbiológica e físico-química do leite *in natura* produzido no município e distribuído diretamente aos consumidores. Foram realizadas análises microbiológicas e físico-químicas do leite cru comercializado clandestinamente no município de Morrinhos - GO. No período de agosto a dezembro de 2005. Foram coletadas e analisadas 21 amostras de leite. Os resultados mostraram 15 (71,4%) amostras com contagens de bactérias mesófilas superiores a  $10^5$  UFC/mL, para *Staphylococcus aureus* os níveis foram superiores a  $10^4$  UFC/mL em 6 amostras (28,5 %), os índices para bactérias psicrotróficas e coliformes totais ultrapassam  $10^4$  UFC/mL; em doze e sete amostras analisadas (58% e 35%), respectivamente. Cinco amostras (24%) estavam contaminadas com coliformes fecais. As análises físico-químicas realizadas foram: densidade, crioscopia, acidez, gordura, extrato seco total, extrato seco desengordurado, alizarol, cloreto, amido, peróxido de hidrogênio, formol, hipoclorito e inibidor (antibiótico). Destas, apenas duas (10%) das análises de crioscopia e quatro (19%) das análises de gordura, encontravam-se fora dos padrões. Para o teste com alizarol sete (33%) do total analisado, apresentaram instabilidade e em duas (10%) das amostras, o cloreto estava presente. Considerando as análises microbiológicas e físico-químicas, há a necessidade de se fazer um trabalho de conscientização junto aos produtores, visando melhorar as características higiênico-sanitárias.

**Palavras-chave.** leite clandestino, saúde pública, microbiologia de alimentos.

## ABSTRACT

In Morrinhos, GO, it is a common practice for rural producers to distribute milk directly to consumers. Thus, this study aimed at assessing both microbiological and physical chemical quality of raw milk produced in this municipality and distributed to consumers. Microbiological and physical chemical analyses were conducted in clandestine raw milk commercialized in the municipality of Morrinhos, in Goiás, from August to December, in 2005. 21 samples of milk were collected and assessed. Outcomes have shown 15 (71.4%) samples with mesophile bacteria score higher than 10 UFC/mL, for *Staphylococcus aureus* levels were higher than 10 UFC/mL in 6 samples (28.5%), rates for psychotrophic bacteria and total coliforms overcome 10 UFC/mL; In 12 and 7 samples analysed, 58% and 35%, respectively. 5 samples (24%) were contaminated with fecal coliforms. Physical chemical analyses performed were: density, cryoscopy, acidity, fat, total dry extratum, fatless dry extratum, alizarol, cloretum, amido, hydrogen peroxide, formol, hypochlorite, and inhibitor (antibiotics). From these ones, only 2 (10%) of cryoscopy and 4 (19%) of fat analyses did not follow standards. For alizarol trials, 7 (33%) of total amount shown unstability, and in 2 (10% of samples), choretum was present. Regarding microbiological and physical chemical analyses, there is the need to work on making producers aware in order to improve hygienic sanitary characteristics.

**Key words.** clandestine milk, public health, food microbiology.

## INTRODUÇÃO

O leite é considerado um alimento quase completo para a espécie humana, sendo amplamente comercializado e consumido pela população, especialmente crianças e idosos<sup>1</sup>. É um alimento muito importante, principalmente nos países subdesenvolvidos, onde as deficiências alimentares são maiores<sup>2</sup>, de alto valor nutritivo para o homem<sup>3</sup>, recebendo por este motivo, grande atenção por parte dos pesquisadores e autoridades ligadas à área de saúde e tecnologia de alimentos, principalmente pelos riscos de veiculação de microrganismos patogênicos e deterioradores<sup>4</sup>.

Mediante a proibição legal imposta à comercialização do leite cru no Brasil, (Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002, do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento), todo o leite produzido, para ser comercializado diretamente ao consumidor deve ser pasteurizado<sup>5</sup>. É importante analisar um produto altamente perecível que está sendo comercializado fora dos parâmetros normativos vigentes, uma vez que este produto sem pasteurização pode transmitir inúmeras enfermidades ao homem, causadas por vários microrganismos patogênicos. A este respeito a Organização Mundial de Saúde comprovou a existência de sete enfermidades viróticas básicas e de 16 bacterianas veiculadas por este produto<sup>6</sup>.

Considerando a importância que o leite assume na alimentação humana, realizou-se no presente trabalho, a partir de parâmetros higiênicos sanitários, uma avaliação da qualidade microbiológica e físico-química do leite cru, produzido e comercializado clandestinamente no município de Morrinhos - GO e distribuído diretamente ao consumidor. Divulgando, dessa forma, os resultados sobre a qualidade do leite comercializado na região e avaliando os riscos inerentes deste produto aos consumidores.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas e analisadas 21 amostras de leite de vaca, cru, comercializado clandestinamente no município de Morrinhos - GO. Procedeu-se a coleta de 250 mL de leite nos domicílios dos consumidores, em recipientes previamente esterilizados. As amostras foram acondicionadas em caixas térmicas com gelo até a manipulação das mesmas. As análises microbiológicas e físico-químicas foram realizadas no período de agosto a dezembro de 2005.

### Análises Microbiológicas

As análises microbiológicas foram realizadas segundo o método recomendado pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento<sup>7</sup>. Para a contagem de bactérias mesófilas e psicotróficas, utilizou-se o método de semeadura em profundidade, em ágar padrão para contagem (PCA). As placas foram incubadas a 35°C por 48 horas e a 10 °C por cinco dias, respectivamente; na contagem de *Staphylococcus aureus*, as amostras foram semeadas em ágar Baird Parker (ABP) e as placas incubadas a 37°C por 48 horas. A contagem de coliformes totais e

fecais foi procedida em placas petrifilm<sup>3m</sup> EC. Para contagem de coliformes totais com diferenciação de *E. coli*, utilizou-se um sistema pronto de meio de cultura contendo ágar vermelho violeta bile (VRBA) com incubação de 48 horas a 37°C; após esse período, as colônias foram contadas e multiplicadas pelo fator da diluição (os meios de culturas utilizados foram da marca Merck).

Todos os resultados foram expressos em unidade formadora de colônias por mililitro (UFC/mL).

### Análises físico-químicas

As análises físico-químicas foram realizadas de acordo com a instrução normativa número 51<sup>5</sup>. O índice crioscópico corresponde à medição do ponto de congelamento; a acidez foi determinada através do acidímetro de Dornic; a densidade a 15°C foi determinada pelo termolactodensímetro de Quevenne; a gordura, pelo butirômetro de Gerber. Com os resultados dos teores de gordura e de densidade, determinou-se o extrato seco total (EST) utilizando o Disco de Ackermann. O valor do extrato seco desengordurado (ESD) foi obtido pela subtração do teor de gordura do extrato seco total. Foram realizadas pesquisas de amido, alizarol, peróxido de hidrogênio, cloreto, formol, hipoclorito e inibidor (antibiótico); os quais foram realizados de acordo com normas estabelecidas por LANARA/MA<sup>8</sup>.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 mostra os resultados das análises de contagem de bactérias mesófilas, *Staphylococcus aureus*, psicotróficas, coliformes totais e coliformes fecais efetuadas em 21 amostras de leite cru, comercializado clandestinamente no município de Morrinhos - GO.

**Tabela 1.** Resultados das análises de contagem de bactérias mesófilas, *Staphylococcus aureus*, Psicotróficas e Coliformes Totais e Fecais em 21 amostras de leite cru.

Amostras	Contagem de Bactérias Mesófilas (UFC/mL)	Contagem de <i>S. aureus</i> (UFC/mL)	Contagem Psicotróficos (UFC/mL)	Contagem de Coliformes Totais (UFC/mL)	Contagem de Coliformes Fecais (UFC/mL)
01	1,3.10 <sup>7</sup>	1,3.10 <sup>2</sup>	6,7.10 <sup>6</sup>	3,4.10 <sup>3</sup>	<1
02	1,8.10 <sup>7</sup>	8,4.10 <sup>4</sup>	1,5.10 <sup>7</sup>	1,0.10 <sup>3</sup>	0,2.10 <sup>4</sup>
03	3,6.10 <sup>6</sup>	7,3.10 <sup>3</sup>	4,0.10 <sup>6</sup>	2,2.10 <sup>3</sup>	8.10 <sup>3</sup>
04	4,7.10 <sup>7</sup>	7,7.10 <sup>4</sup>	5,0.10 <sup>7</sup>	4,0.10 <sup>4</sup>	< 1
05	< 1	1.10 <sup>2</sup>	< 1	1.10 <sup>5</sup>	< 1
06	2,5.10 <sup>6</sup>	6.10 <sup>1</sup>	1,2.10 <sup>5</sup>	2,1.10 <sup>3</sup>	< 1
07	2,1. 10 <sup>6</sup>	< 1	1,5.10 <sup>6</sup>	1,0.10 <sup>3</sup>	< 1
08	4,2.10 <sup>5</sup>	1,4.10 <sup>3</sup>	2,3.10 <sup>5</sup>	2,2.10 <sup>6</sup>	< 1
09	8,6.10 <sup>6</sup>	8,6.10 <sup>3</sup>	3,8.10 <sup>6</sup>	3,9.10 <sup>4</sup>	< 1
10	1,2.10 <sup>6</sup>	1,1.10 <sup>4</sup>	1,2.10 <sup>6</sup>	5.10 <sup>5</sup>	6.10 <sup>4</sup>
11	2,3.10 <sup>6</sup>	5,3.10 <sup>6</sup>	2,1.10 <sup>6</sup>	4.10 <sup>5</sup>	< 1
12	1,3.10 <sup>5</sup>	4,7.10 <sup>3</sup>	1,9.10 <sup>5</sup>	3.10 <sup>6</sup>	< 1
13	5,5.10 <sup>4</sup>	1.10 <sup>1</sup>	2,0.10 <sup>4</sup>	2,0.10 <sup>2</sup>	< 1
14	4,2.10 <sup>6</sup>	1.10 <sup>3</sup>	3,6.10 <sup>6</sup>	1,2.10 <sup>3</sup>	< 1
15	6,5.10 <sup>4</sup>	1.10 <sup>5</sup>	1,0.10 <sup>4</sup>	1,8.10 <sup>7</sup>	< 1
16	1,0.10 <sup>6</sup>	1.10 <sup>2</sup>	6,8.10 <sup>5</sup>	0,3.10 <sup>2</sup>	< 1
17	1,0.10 <sup>6</sup>	1.10 <sup>4</sup>	6,8.10 <sup>6</sup>	7,5.10 <sup>4</sup>	< 1
18	1,5.10 <sup>6</sup>	2.10 <sup>5</sup>	4,2.10 <sup>6</sup>	2,5.10 <sup>2</sup>	3.10 <sup>4</sup>
19	1,0.10 <sup>6</sup>	6,7.10 <sup>6</sup>	5,5.10 <sup>5</sup>	2,0.10 <sup>3</sup>	0,6.10 <sup>4</sup>
20	7,5.10 <sup>6</sup>	3,0.10 <sup>3</sup>	4,7.10 <sup>6</sup>	9,0.10 <sup>2</sup>	< 1
21	3,0.10 <sup>5</sup>	1.10 <sup>4</sup>	3,6.10 <sup>5</sup>	5,8.10 <sup>4</sup>	< 1

< 1 = Significa que não houve crescimento bacteriano.

Observa-se na Tabela 1, que quinze (71,4%) amostras apresentam valores de contagem de bactérias mesófilas superiores a  $10^5$  UFC/mL. Esses resultados conferem com os apresentados por Carvalho et al.<sup>9</sup> e Silva et al.<sup>10</sup> que encontraram 70% em 18 e 20 amostras analisadas, respectivamente. Badini et al.<sup>4</sup> obtiveram 68,3% acima de  $10^5$  UFC/mL, resultados semelhantes ao descritos anteriormente. Ainda que um alimento esteja isento de patógenos e que não tenha ocorrido alteração em suas características organolépticas, a presença de um número elevado de microorganismos mesófilos é indicativo de insalubridade. Além disso, uma alta contagem pode indicar a exposição do alimento a condições que possam ter permitido a introdução e multiplicação de espécies patogênicas<sup>9</sup>.

Seis amostras (28,5%), analisadas neste estudo, apresentam valores de *S. aureus* acima de  $10^4$  UFC/mL, valores superiores a estes podem causar doenças nos consumidores. Silva et al.<sup>10</sup> encontraram valores similares ao analisar 20 amostras e detectaram 25% acima de  $10^4$  UFC/mL. Este microorganismo, quando presente no leite cru, geralmente, provém de vacas com mastite, dos manipuladores e de condições higiênicas deficientes<sup>11</sup>. O *S. aureus* é um dos maiores causadores da mastite bovina, com índice elevado de infecção no rebanho bovino nacional. Sua presença em alimentos pode representar risco para a saúde do consumidor<sup>12</sup>.

Nas contagens de bactérias psicrotróficas, doze amostras (58%), estão acima de  $10^5$  UFC/mL. A grande quantidade de bactérias psicrotróficas pode decompor mais rapidamente o leite, prejudicando o seu armazenamento, considerando que este ficará sob refrigeração na casa dos consumidores<sup>13</sup>. Embora esses microorganismos sejam destruídos pelo processo de pasteurização, quando presentes no leite cru, podem produzir enzimas extracelulares termorresistentes (proteinasas e lipases)<sup>2</sup>. Analisando coliformes totais e coliformes fecais, Carvalho et al.<sup>9</sup> e Picinin<sup>14</sup> encontraram 35% das amostras com índices acima de  $10^4$  UFC/mL e duas amostras estavam contaminadas com coliformes fecais. Neste trabalho foram encontrados valores similares, 33% das amostras (sete) estavam acima do padrão descrito e cinco amostras (23,8%) estavam contaminadas com coliformes fecais.

Os resultados destas análises sugerem falta de higiene na ordenha do leite, uma vez que os coliformes totais são encontrados no meio ambiente e os coliformes fecais habitam exclusivamente o trato intestinal de seres humanos e animais<sup>11</sup>. Portanto, a presença destes microorganismos em alimentos revela contaminação fecal recente, indicando risco potencial à saúde do consumidor, pois várias linhagens de *E. coli* são patogênicas para o homem<sup>15</sup>.

A Tabela 2 mostra os resultados das análises físico-químicas de densidade, crioscopia, acidez, EST e ESD, efetuadas em 21 amostras de leite cru, comercializadas clandestinamente no município de Morrinhos - GO.

Os resultados da tabela 2 mostram que 100% das amostras apresentam valores de densidade dentro dos valores mínimos da nova legislação – Instrução Normativa nº 51, ou

sejam, de 1,028°C a 1,034°C; os mesmos resultados também foram obtidos por Nascimerio<sup>16</sup>.

**Tabela 2.** Resultados quantitativos das análises físico-químicas.

Análises físicoquímicas	Média	Valor de Referência	Porcentagem (%) de amostras dentro das normas
Densidade (15 °C)	1032	1028 – 1034	100%
Crioscopia	-0,541	Máximo – 0,530°H	90%
Acidezl (°D)	15,8	14° - 18 °D	100%
Gordura (%)	3,5	Mínimo de 3%	81%
Extrato Seco Total (%)	13,0	9,21 – 15,19	100%
Extrato Seco Desengordurado (%)	9,0	8,12 – 9,80	100%

Acidez titulável em °D (graus Dornic)

Instrução Normativa nº 51 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento

Neste trabalho, os índices crioscópicos (diminuição do ponto de congelamento) das amostras variaram de  $-0,496^{\circ}\text{H}$  a  $-0,587^{\circ}\text{H}$ . Duas amostras (10%), estavam fora dos padrões da nova legislação (máximo de  $-0,530^{\circ}\text{H}$ ). Machado et al.<sup>15</sup> encontraram 80% das amostras em desacordo com os padrões normativos.

Pela legislação vigente, 100% das amostras analisadas em nosso estudo estão dentro dos parâmetros para acidez ( $14^{\circ}$  a  $18^{\circ}\text{D}$ ). Nascimerio et al.<sup>16</sup>, encontraram o oposto do descrito acima, ou seja, 100% de suas amostras estavam em desacordo com a Normativa 51. Fernandes<sup>17</sup>, em seu trabalho, justifica os resultados de Nascimerio. Porém o binômio tempo/temperatura pode não ter atuado sob amostras obtidas neste trabalho, a ponto de alterar as análises físico-químicas, não havendo assim tempo suficiente para a lactose se desdobrar em ácidos, apresentando resultados aceitáveis.

O teor de gordura do leite analisado nas amostras deste estudo foi o parâmetro que mais alterou, variando de 2,4% a 4,5%. Dezesete amostras (81%) apresentam valores dentro da nova legislação (o mínimo exigido pela normativa nº 51 do Ministério da Agricultura e Abastecimento é de 3%); Machado et al.<sup>15</sup> e Nascimerio<sup>16</sup>, encontraram variações de 2,57% a 4,0% e de 2,1% a 3,9%, (29% e 40% das amostras estavam dentro das normas), respectivamente. A variação encontrada, provavelmente, é decorrente das diferenças entre as linhagens genéticas, da alimentação e o estágio de lactação dos animais, desnate do mesmo para produção de outros derivados<sup>18</sup>.

Para o EST foram encontrados valores entre 11,3% a 13,8%, de acordo com a normativa nº 51 os resultados aceitáveis são de 9,12% a 15,19%; desta forma, 100% das amostras encontram-se normais. O ESD variou entre 8,6 a 9,4%, estando dentro das normas para leite cru, tipo C, que estabelecem o mínimo de 8,4%.

A Tabela 3 mostra os resultados das análises físico-químicas para a determinação do teor de alizarol, cloreto, amido, peróxido de hidrogênio, formol, cloro e antibiótico, efetuadas

em 21 amostras de leite cru, comercializadas clandestinamente no município de Morrinhos - GO.

**Tabela 3.** Resultados qualitativos de análises físico-químicas.

Análises físico-químicas	Porcentagem (%) dentro das normas
Alizarol	67
Cloreto	90
Amido	100
Peróxido de Hidrogênio	100
Formol	100
Hipoclorito	100
Inibidor (Antibiótico)	100

Instrução Normativa nº 51 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento

O alizarol é um produto indicador de acidez, utilizado em plataformas de indústrias leiteiras, porém é uma análise abolida em países desenvolvidos. Por meio dessa análise encontramos sete amostras (33%) em desacordo. Sendo que neste estudo, o método da acidez titulável com solução dornic apresenta 100% das amostras dentro dos padrões. Sugerimos que esta diferença esteja nas reações químicas existentes entre o alizarol e a bactéria fermentadora de lactose, podendo alterar os resultados<sup>14</sup>.

As pesquisas de cloreto também sofreram alterações em duas amostras (10%). Foram realizadas pesquisas de amido, peróxido de hidrogênio, formol, hipoclorito e inibidor (Antibiótico) e os resultados foram negativos em todas as amostras.

## CONCLUSÃO

Por meio das análises microbiológicas realizadas, podemos constatar que as bactérias mesófilas foram as que mais alteraram o leite. Nas análises físico-químicas, a pesquisa do alizarol foi a que apresentou a maior quantidade de amostras fora dos padrões estabelecidos pelo Ministério da Agricultura. Treze amostras apresentam-se sem nenhum tipo de alteração físico-química.

Considerando as análises microbiológicas e físico-químicas, apenas uma amostra apresenta-se dentro dos padrões do Ministério da Agricultura. Contudo, essa situação não interfere, substancialmente, na qualidade do leite, havendo necessidade de se fazer um trabalho de conscientização junto aos produtores, visando melhorar as características higiênico-sanitárias.

Com base nos resultados, listamos as seguintes recomendações, visando ao melhoramento da qualidade do leite:

- Exigência de atestado sanitário do rebanho, para entrega do leite nos laticínios;

- Realização de cursos de capacitação para os produtores sobre higiene de ordenha, manejo do rebanho, administração e gerência rural;

- Promoção de treinamento e divulgação de informações sobre a melhoria da qualidade da matéria-prima;

- Maior rigidez na fiscalização do comércio do leite, com o intuito de proibir a venda informal.

## REFERÊNCIAS

1. Neusa S, Garrido NS, Morais, JMT, Briganti RC, Oliveira MA, Bergamini AMM, Oliveira SAV, Favaro RMD. A avaliação da qualidade físico-química e microbiológica do leite pasteurizado proveniente de mini e micro-usinas de beneficiamento da região de Ribeirão Preto – SP, Rev Inst. Adolfo Lutz 2001; 60 (2): 141-6.
2. Brum JVF. Pesquisa de microorganismos psicotróficos em leite cru produzidos nos estados do Paraná e Santa Catarina 2004. Anais XXI do Congresso Nacional de Laticínios de Juiz de Fora.
3. Rossi DA. Correlação entre as provas da redução do azul de metileno a 30 e 37°C e a contagem padrão de mesosófilos em leite plataforma. Rev laticínio Cândido Tostes 2001; (318): 17-20.
4. Badini KB, Filho AN, Amaral LA e Germano PML. Risco à saúde representado pelo consumo de leite cru comercializado clandestinamente. Rev Saúde Pú 1996; 30 (6): 549 - 52.
5. Brasil. Ministério da Agricultura. Instrução Normativa nº 51 de 18 de setembro de 2002. Regulamentos Técnicos de Produção Identidade, Qualidade, Coleta e transporte de Leite. Diário Oficial da União, Brasília, 18 de setembro de 2002, p. 39.
6. Brandão SCC. Leite: legislação, responsabilidade e saúde pública. Rev Balde Branco 1994; 360: 68-71.
7. Brasil. Ministério da Agricultura. Instrução Normativa nº 62 de 26 de agosto de 2003. Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para controle de Produtos de origem animal e de Água. Diário Oficial da União, Brasília 26 de agosto de 2003, p. 39.
8. LANARA. Laboratório Nacional de referencia Animal. Métodos Analíticos Oficiais para controle de produtos de origem animal e seus Ingredientes II – Métodos Físicos e químicos XVII – Queijo Brasília-DF, 1981.
9. Carvalho PT, Pandolfo FC, Menegol S, Perico R, Katsuda MS. A avaliação da qualidade de amostras de leite cru comercializado no município de Araçatuba e potenciais risco decorrentes de seu consumo. Hig Alim 2001; 15 (86): 31-8.
10. Silva EM. Avaliação da qualidade microbiológica de leite cru comercializado por produtos de Município de Santa Helena – PR. Anais XXI. Congresso nacional de Laticínios. 2004. Juiz de Fora.
11. Amaral LA, Isa H, Dias LT, Junior ODR e Filho NA. Avaliação da eficiência da desinfecção de teteiras e dos tetos no processo de ordenha mecânica de vacas. Pesq Vet Brás 2004; 24 (4): 173-7.

12. Loganatham S, Thompson NR. Composition of cow's milk I. Environmental and managerial influences. *J Dairy Sci* 1968; 51 (12): 1928-32.
13. Assumpção EG, Piccoli-Valle RH, Hirsch D, Abreu LR. Fontes de contaminação por *Staphylococcus aureus* na linha de processamento de queijo prato. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2003; 55 (3): 366-70.
14. Picinin LCA. Tecnologia e inspeção de produtos de origem animal. [Dissertação de Mestrado]. Escola de Veterinária: Universidade de São Paulo, 2000.
15. Machado RS, Kawakami E, Goshima S, Patrício FR, Neto UF. Gastrite hemorrágica por alergia ao leite de vaca: relato de dois casos. *J. Pediatr* 2003; 79 (4): 363-8.
16. Nascimerio IR. Efeito do armazenamento e do transporte na qualidade do leite Aquida Ba/SE. *Anais XXI Congresso Nacional de laticínios 2004*. Juiz de Fora, 59 (339).
17. Fernandes A M. Avaliação do iogurte produzido com leite contendo diferentes níveis de células somáticas. [Dissertação de Mestrado]. São Paulo, São Paulo: Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, 2003.
18. Silva MVGBS, Ferreira WJ, Cobuci JA, Guaragna GP, Oliveira PRP. Estimativas de tendência genética para características produtivas em um rebanho do Ecótipo Mantiqueira. *Rev Bras Zootec* 2001; 30 (5): 1466-1475.

# Efeito da adição de *Streptococcus thermophilus* como cultura adjunta na maturação e caracterização físico-química e sensorial de queijo Prato

## Effect of the addition of *Streptococcus thermophilus* as adjunct culture on ripening and physicochemical and sensory characterization of Prato cheese

RIALA6/1089

Claudia R. B. SILVA<sup>1</sup>, Aline Cristina NABUCO<sup>1</sup>, Bruna R. MORETTI<sup>1</sup>, Ana Lúcia Barretto PENNA<sup>1\*</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>1</sup>UNESP - Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos, Rua Cristóvão Colombo, 2265 - São José do Rio Preto - SP. \*E-mail: analucia@ibilce.unesp.br .

Recebido: 14/06/2005 - Aceito para publicação: 28/12/2006

### RESUMO

As culturas lácteas desempenham funções fundamentais na maturação de queijos, tais como produção de ácido láctico e de compostos aromatizantes voláteis. Neste trabalho, o objetivo foi avaliar a ação de *Streptococcus thermophilus* como cultura adjunta, nos índices de proteólise e nas características físico-químicas e sensoriais do queijo Prato. As amostras de queijo foram preparadas conforme dois tratamentos: (1) utilização de cultura mesofílica - *Lactococcus lactis* ssp *lactis* e *Lactococcus lactis* ssp *cremoris* (tratamento 1) e (2) cultura mesofílica acrescida de *Streptococcus thermophilus* (tratamento 2). Durante a maturação dos queijos, foram realizadas análises físico-químicas (extrato seco total, gordura, gordura no extrato seco - GES, cinzas, nitrogênio, proteína total, índice de extensão da maturação - IEM, índice de profundidade da maturação - IPM, tirosina, triptofano e atividade de água) e sensoriais (odor, aroma, doce, ácido, salgado, amargo, adstringente, picante, elasticidade, firmeza, friabilidade, adesividade, solubilidade e umidade). O queijo fabricado conforme o tratamento 1 foi o mais proteolítico, resultando em características sensoriais mais acentuadas de acidez, amargor, sabor picante, elasticidade e solubilidade, comparado ao produto preparado com adição de *Streptococcus thermophilus*.

**Palavras-chave.** *Streptococcus thermophilus*, proteólise, propriedades físico-químicas e sensoriais, queijo Prato.

### ABSTRACT

Lactic acid bacteria are responsible for performing fundamental functions for cheese manufacturing, such as production of lactic acid and volatile flavoring compounds. The aim of this investigation was to evaluate the *Streptococcus thermophilus* activity, as an adjunct culture, on proteolysis during ripening and, on the development of physicochemical characteristics and sensory properties of Prato type cheese. For this study, cheeses were manufactured in a pilot-scale, according to two treatment processes: (1) use of mesophilic culture - *Lactococcus lactis* ssp *lactis* and *Lactococcus lactis* ssp *cremoris* (treatment 1), and (2) mesophilic culture added with *Streptococcus thermophilus* (treatment 2). At 30 and 48 days of ripening, the physicochemical characteristics (dry matter, titratable acidity, fat, fat in dry matter, ashes, protein contents, ripening extension and depth indexes, tyrosine and tryptophan content, and water activity) were analyzed. Sensory properties (smell, aroma, sweetness, sourness, saltiness, bitterness, astringency, pungency, elasticity, firmness, friability, adhesiveness, solubility and humidity) were evaluated at 30 days of ripening. In cheeses under treatment 1, casein was most extensively hydrolyzed during ripening, thus they exhibited higher levels of acidity, bitterness, piquant taste, elasticity, and solubility when compared to those prepared with the addition of *S. thermophilus*.

**Key words.** *Streptococcus thermophilus*, proteolysis, physicochemical and sensory properties, Prato cheese.

## INTRODUÇÃO

O queijo Prato possui um sabor suave, próprio, de cheiro não ácido, nem picante e gosto tendendo ao adocicado<sup>1</sup>. É classificado como gordo (45-59,9% de gordura no extrato seco) e de média umidade (36-45,9%) e deve apresentar consistência semi-dura ou elástica, textura compacta, lisa, fechada, com algumas olhaduras pequenas, bem distribuídas, ou sem olhaduras, cor amarelada ou amarelo-palha<sup>2</sup>. O seu rendimento de fabricação situa-se por volta de 9-9,5 litros de leite/Kg de queijo<sup>3</sup>. É um queijo que possui perfil de maturação predominantemente proteolítico<sup>4</sup>.

O queijo Prato deve ser consumido sempre após a maturação que é de aproximadamente 40 dias, um período de tempo de maturação considerado médio devido à complexidade dos fenômenos químicos e bioquímicos que ocorrem. No entanto, este período de tempo é considerado longo para quem deseja uma rápida rotação de capital de giro<sup>5</sup>.

Para diminuir custos com a matéria-prima e mão-de-obra, alguns fabricantes de queijo Prato têm diminuído o tempo de maturação sem o uso adicional de qualquer tipo de tecnologia, prejudicando suas características. Desta forma, o produto vem perdendo seus padrões de qualidade e identidade e, conseqüentemente, seu valor comercial<sup>5</sup>.

Uma das alternativas para acelerar a maturação em queijos consiste no uso de culturas adjuntas, que são linhagens selecionadas de bactérias lácteas ou de outros microrganismos relacionados com a maturação do queijo. Comumente a cultura adjunta é adicionada ao leite de fabricação juntamente com a cultura láctea tradicional, com o objetivo principal de melhorar a qualidade sensorial do produto<sup>6</sup>.

O *Streptococcus thermophilus* multiplica-se bem a 44°C, hidrolisa a lactose via  $\beta$ -galactosidase, utiliza poucos substratos de carbono (lactose, glicose, sacarose), requer aminoácidos complexos e é pouco proteolítico. É capaz de hidrolisar proteínas em peptídeos e aminoácidos essenciais para sua nutrição através de proteinases associadas à parede celular e de peptidases citoplasmáticas. Outros estudos identificaram a presença de peptidases intracelulares liberadas no queijo após a lise celular durante a maturação<sup>7</sup>.

A formação de sabor do queijo é definida como sendo um processo extremamente complexo e resultante de um equilíbrio entre todos os compostos originários do metabolismo da lactose, lipídeos e proteínas<sup>8</sup>. A fração hidrossolúvel de queijos maturados contém componentes que possuem importante contribuição no sabor<sup>9</sup>. Durante o processo de maturação o queijo perde água por evaporação em intensidade variável. As alterações das proteínas e das gorduras são conseqüências da ação de bactérias e fungos, das quais resultam em ácidos voláteis e proteínas mais simples.

A gordura tem importante papel na obtenção da textura e sabor dos queijos. O desenvolvimento do sabor lipolítico característico do queijo pode ser obtido diretamente pela presença de ácidos graxos, ou indiretamente, após

transformações bioquímicas que resultam na formação de outros compostos flavorizantes, como cetonas, metil-cetonas e lactonas<sup>10</sup>.

A proteólise também possui papel importante no processo, seja diretamente, pela formação de aminoácidos e peptídeos pequenos, ou indiretamente, via catabolismo de aminoácidos<sup>11</sup>. Os compostos originados destas reações tanto podem originar compostos desejáveis como indesejáveis (*off-flavors*) na formação do sabor do queijo.

O trabalho objetivou avaliar o efeito da adição de *Streptococcus thermophilus* como cultura adjunta na evolução da proteólise, características físico-químicas e propriedades sensoriais do queijo Prato.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Os queijos Prato foram produzidos na Planta Piloto do Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos da UNESP a partir de 25 L de leite pasteurizado com 3,5% de gordura, utilizando-se um tanque mecanizado de fabricação com capacidade para 50L de leite. No tratamento 1 foram adicionados 2% de cultura mesofílica composta por *Lactococcus lactis* ssp *lactis* e *Lactococcus lactis* ssp *cremoris*, e no tratamento 2, uma cultura mista com 2% desta cultura mesofílica adicionada de *Streptococcus thermophilus*. Ao leite também foram adicionados 0,03% de coalho e 0,3% de cloreto de cálcio. A coagulação ocorreu entre 30-40 minutos, sendo o corte realizado durante 10-15 minutos, seguido da retirada de 1/3 do soro e aquecimento até 40°C. O tempo de tratamento da massa foi de 60 minutos a contar do corte. A massa foi enformada e prensada por 30 minutos, invertida e prensada até o dia seguinte. Os queijos foram desenformados e colocados para salga em salmoura com densidade entre 18 e 20° Baumé, durante 5 horas. Os queijos foram retirados da salga e, após secagem, embalados a vácuo e estocados em câmara para maturação (13°C e 85% UR).

As análises físico-químicas foram realizadas em triplicata aos 30 e 48 dias de maturação dos queijos, sendo determinados os seguintes parâmetros: extrato seco total (EST)<sup>12</sup>, acidez titulável<sup>13</sup>, gordura<sup>13</sup>, gordura no extrato seco (GES= Gordura/ESTx100), cinzas<sup>13</sup>, nitrogênio total-NT<sup>14</sup>, nitrogênio solúvel em pH 4,6-NNC<sup>15</sup>, nitrogênio solúvel em TCA 12%-NNP<sup>15</sup>, tirosina e triptofano<sup>16</sup> e atividade de água<sup>17</sup>. O índice de extensão da maturação (IEM) foi determinado por NNC/NT x 100 e o índice de profundidade da maturação (IPM) por NNP/NT x 100<sup>18</sup>.

Após 30 dias de maturação, os queijos foram submetidos à avaliação sensorial utilizando o modelo Etana<sup>19</sup>, considerando-se os seguintes atributos: odor, aroma, doce, ácido, salgado, amargo, adstringente, picante, elasticidade, firmeza, friabilidade, adesividade, solubilidade e umidade, por equipe de 30 consumidores de queijos. Este modelo apresenta um diagrama contendo os 14 descritores em escala de 5 pontos,

conforme se observa no modelo Etana<sup>19</sup>, oferecendo a possibilidade de evidenciar rapidamente os parâmetros sensoriais que valorizam o produto. Antes da avaliação sensorial os provadores foram informados a respeito das definições relativas a cada um dos atributos sensoriais utilizados na avaliação dos queijos (Quadro 1).

A sessão de avaliação sensorial foi realizada no período da tarde (entre 15 e 17 horas) em cabines individuais, com iluminação branca artificial. As amostras de queijo Prato foram cortadas em cubos de aproximadamente 1,5 cm de aresta, colocadas em um copinho plástico descartável e codificadas usando-se números de 3 dígitos, tomados ao acaso, de acordo com as instruções de Moraes<sup>20</sup>. Os provadores receberam uma bandeja contendo as amostras, uma ficha de avaliação e água para ajudar a limpar o paladar entre uma amostra e outra.

A análise de variância (ANOVA) dos resultados foi realizada a partir de um delineamento inteiramente casualizado (DIC), realizando-se teste de média de Tukey ao nível de 5 % de significância ( $p < 0,05$ ), utilizando o programa computacional Estat, desenvolvido por Banzatto e Kronka<sup>21</sup>.

**Quadro 1.** Definições de termos descritores empregados na avaliação sensorial do queijo Prato.

Atributos sensoriais	Definições
Odor	propriedade sensorial perceptível no queijo por meio do órgão olfativo, cheirando as substâncias voláteis
Aroma	propriedade sensorial perceptível por meio do retro-olfato antes da deglutição. Este estímulo é levado pela nuvem aromática liberada pela mastigação e guiado através do nariz, pela respiração
Doce	gosto elementar provocado pelas soluções aquosas de substâncias como a sacarose ou frutose
Ácido	quantifica o gosto elementar provocado pelas substâncias ácidas diluídas como ácido cítrico ou tartárico
Salgado	quantifica o gosto elementar provocado pelas soluções aquosas diluídas de diferentes substâncias como o cloreto de sódio
Amargo	quantifica o gosto elementar provocado pelas soluções aquosas diluídas de substâncias tais como quinino e cafeína
Adstringente	quantifica a sensação complexa referente à contração da mucosa que se produz, por exemplo, com os taninos ou banana verde
Picante	sensação de aquecimento da cavidade bucal como aquela provocada por pimenta
Elasticidade	habilidade de uma substância recuperar sua forma inicial e dimensões após ter sido submetido à pressão
Firmeza	resistência a uma dada deformação
Friabilidade	característica da substância ser facilmente reduzida em pedaços
Adesividade	esforço necessário para prevalecer sobre forças que mantêm duas superfícies em contato
Solubilidade	sensação que se desenvolve quando a amostra se derrete rapidamente na saliva
Umidade	percepção da presença de água sentida na boca

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

A Tabela 1 apresenta os resultados médios da avaliação físico-química dos queijos Prato fabricados com dois tipos de culturas lácteas aos 30 e 48 dias de maturação.

**Tabela 1.** Caracterização físico-química média\* dos queijos Prato durante a maturação.

Análises	Tratamento 1		Tratamento 2	
	30 dias	48 dias	30 dias	48 dias
Acidez (%)	1,20 <sup>a</sup> ± 0,03	1,17 <sup>a</sup> ± 0,01	0,64 <sup>c</sup> ± 0,00	0,78 <sup>b</sup> ± 0,00
Extrato seco total (%)	59,85 <sup>c</sup> ± 0,41	60,86 <sup>b</sup> ± 0,11	62,54 <sup>a</sup> ± 0,35	61,51 <sup>b</sup> ± 0,42
Gordura (%)	28,0 <sup>a</sup> ± 0,0	28,0 <sup>a</sup> ± 0,0	28,2 <sup>a</sup> ± 0,3	28,0 <sup>a</sup> ± 0,0
GES (%)	46,8 <sup>a</sup> ± 0,3	46,0 <sup>ab</sup> ± 0,1	45,0 <sup>b</sup> ± 0,7	45,5 <sup>b</sup> ± 0,3
Cinzas (%)	4,15 <sup>bc</sup> ± 0,05	4,22 <sup>ab</sup> ± 0,04	4,29 <sup>a</sup> ± 0,02	4,10 <sup>c</sup> ± 0,04
Nitrogênio (%)	3,98 <sup>c</sup> ± 0,01	3,81 <sup>c</sup> ± 0,09	4,66 <sup>a</sup> ± 0,04	4,23 <sup>b</sup> ± 0,13
Proteína total (%)	24,87 <sup>c</sup> ± 0,05	23,85 <sup>c</sup> ± 0,58	29,12 <sup>a</sup> ± 0,25	26,88 <sup>b</sup> ± 0,34
NNC (%)	0,45 <sup>c</sup> ± 0,00	0,65 <sup>a</sup> ± 0,00	0,37 <sup>d</sup> ± 0,01	0,58 <sup>b</sup> ± 0,00
NNP (%)	0,33 <sup>b</sup> ± 0,01	0,45 <sup>a</sup> ± 0,00	0,19 <sup>d</sup> ± 0,00	0,29 <sup>c</sup> ± 0,00
IEM (%)	11,33 <sup>c</sup> ± 0,11	17,08 <sup>a</sup> ± 0,45	7,93 <sup>d</sup> ± 0,20	13,72 <sup>b</sup> ± 0,45
IPM (%)	8,18 <sup>b</sup> ± 0,27	11,69 <sup>a</sup> ± 0,29	4,16 <sup>d</sup> ± 0,14	6,90 <sup>c</sup> ± 0,18
Tirosina (mg/100g queijo)	153,14 <sup>b</sup> ± 0,52	160,85 <sup>a</sup> ± 2,70	135,84 <sup>d</sup> ± 1,05	142,09 <sup>c</sup> ± 2,28
Triptofano (mg/100g queijo)	54,08 <sup>a</sup> ± 0,18	52,33 <sup>b</sup> ± 0,80	49,52 <sup>c</sup> ± 0,36	47,91 <sup>d</sup> ± 0,79
A <sub>w</sub>	0,97 <sup>c</sup> ± 0,00	0,98 <sup>a</sup> ± 0,00	0,97 <sup>b</sup> ± 0,00	0,97 <sup>d</sup> ± 0,00

\* análise em triplicata (média ± desvio padrão).

<sup>a, b, c, d</sup> Letras iguais na mesma linha não diferem entre si a 5% de probabilidade (Teste de Tukey). GES – gordura no extrato seco; NNC – nitrogênio solúvel em pH 4,6; NNP: nitrogênio solúvel em TCA 12%; Aw: atividade de água; IEM – índice de extensão da maturação; IPM: índice de profundidade da maturação.

Tratamento 1 - Fermentação com *L. lactis* ssp *lactis* e *L. lactis* ssp *cremoris*.  
Tratamento 2 - Fermentação com *L. lactis* ssp *lactis* e *L. lactis* ssp *cremoris* e *S. thermophilus*.

Os queijos do tratamento 2 apresentaram menor teor de acidez do que os queijos do tratamento 1, sendo que neste tratamento não houve diferença significativa de acidez no decorrer da maturação. Apesar dos queijos do tratamento 2 apresentarem menor acidez, esta teve aumento significativo no decorrer do processo de estocagem. Esta diferença entre os tratamentos está relacionada com a microbiota presente. Segundo Moreno et al.<sup>1</sup> os queijos processados com espécies que utilizam lentamente a lactose apresentam uma elevação mais rápida do pH. Assim, podemos observar que no queijo 2 houve um consumo rápido de lactose.

Aos 30 dias de fabricação os queijos do tratamento 2 apresentaram maiores valores de sólidos totais do que os do tratamento 1, sendo que aos 48 dias a diferença não foi significativa. Pode-se considerar que os queijos do tratamento 1 são levemente mais úmidos do que os do tratamento 2.

Os teores de gordura observados não apresentaram diferença significativa, uma vez que ambos os queijos foram fabricados com leite que apresentaram a mesma porcentagem de gordura. A porcentagem de gordura no extrato seco (GES) variou de 45,04 a 46,79%. Estes valores encontram-se de acordo com o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos<sup>22</sup>, o qual preconiza que queijos gordos devem conter entre 45 e 59,9% de GES.

O conteúdo de cinzas variou de 4,10 a 4,29%. A cinza de um alimento é o resíduo inorgânico que permanece após a queima da matéria orgânica, que é transformada em CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O e NO<sub>2</sub>. A cinza é constituída principalmente de grandes quantidades de K, Na, Ca e Mg, pequenas quantidades de Al, Fe, Cu, Mn e Zn e traços de Ar, I, F e outros elementos<sup>23</sup>.

Pode ser observado que as porcentagens de proteína total foram significativamente diferentes nos queijos dos tratamentos 1 e 2, variando, respectivamente, de 23,85% a 29,12% no tratamento 2. Estas variações são decorrentes da composição do leite e do processo de fabricação que influenciam a composição final do queijo e, conseqüentemente, o perfil de maturação<sup>1</sup>.

Nos dois tratamentos houve um aumento dos índices de maturação (IEM e IPM) no período avaliado. Os queijos do tratamento 1 apresentaram índices maiores, comparados ao do tratamento 2, evidenciando uma maior proteólise nos queijos no primeiro tratamento. O índice de extensão da maturação mede o desdobramento do nitrogênio total em nitrogênio solúvel, devido à degradação das caseínas pela quimosina, plasmina e proteinases de bactérias lácteas, e é um fator importante na composição final e nas características sensoriais do produto. O índice de profundidade mede a formação de peptídeos pequenos e aminoácidos que se acumulam durante a maturação, devido principalmente à ação proteolítica de proteinases e peptidases bacterianas sobre os compostos nitrogenados provenientes da degradação das caseínas<sup>1</sup>. Assim, apesar do uso do *Streptococcus thermophilus* no queijo 2, a proteólise foi menos intensa neste queijo, provavelmente devido ao menor conteúdo de umidade.

Observou-se que o teor de tirosina teve um aumento ao longo da maturação nos dois queijos, enquanto que o teor de triptofano diminuiu. Além disso, o queijo 1 apresentou valores maiores nos dois parâmetros. O desdobramento da proteína em aminoácidos aumenta a qualidade do queijo, devido à alteração da textura da massa e à liberação de compostos relacionados ao aroma e sabor. As oscilações dos aminoácidos, observadas durante a maturação, baseiam-se na ocorrência de reações de desaminação, transaminação e descarboxilação onde os aminoácidos livres são hidrolisados e posteriormente resultam em ácidos graxos, amins, aldeídos e álcoois, os quais possuem propriedades flavorizantes responsáveis pelo desenvolvimento de sabor de origem proteolítica<sup>24</sup>.

Os valores de atividade de água variaram entre 0,97% e 0,98%, atendendo as necessidades mínimas de atividade de água para o desenvolvimento de bactérias lácteas, de 0,93% a 0,96%, dependendo da espécie<sup>25</sup>.

A Tabela 2 apresenta os resultados da avaliação sensorial dos queijos Prato para os tratamentos 1 e 2, após 30 dias de maturação. Os atributos sensoriais de acidez, amargor, sabor picante, elasticidade, solubilidade e umidade se apresentaram mais acentuados nos queijos do tratamento 1, quando comparado aos do tratamento 2, além disso foi observado uma menor firmeza nos queijos do tratamento 1. Os outros atributos sensoriais se apresentaram semelhantes nos dois queijos.

**Tabela 2.** Caracterização sensorial média\* de queijos Prato fabricados com diferentes culturas lácteas.

Atributos sensoriais	Tratamento 1	Tratamento 2
Aroma	3,84 <sup>a</sup> ± 1,17	3,64 <sup>a</sup> ± 1,30
Doce	1,62 <sup>a</sup> ± 1,13	1,75 <sup>a</sup> ± 1,09
Ácido	2,40 <sup>a</sup> ± 1,02	1,56 <sup>b</sup> ± 1,01
Salgado	3,04 <sup>a</sup> ± 1,01	2,54 <sup>a</sup> ± 0,71
Amargo	1,72 <sup>a</sup> ± 1,06	1,03 <sup>b</sup> ± 0,67
Adstringente	1,56 <sup>a</sup> ± 1,130	1,07 <sup>a</sup> ± 0,65
Picante	1,88 <sup>a</sup> ± 1,22	0,96 <sup>b</sup> ± 0,77
Elasticidade	2,88 <sup>a</sup> ± 1,14	2,16 <sup>b</sup> ± 1,22
Firmeza	3,21 <sup>b</sup> ± 1,07	3,92 <sup>a</sup> ± 0,76
Friabilidade	3,27 <sup>a</sup> ± 1,12	3,26 <sup>a</sup> ± 0,96
Adesividade	2,52 <sup>a</sup> ± 1,02	1,98 <sup>a</sup> ± 0,85
Solubilidade	3,08 <sup>a</sup> ± 1,05	2,40 <sup>b</sup> ± 0,83
Umidade	3,08 <sup>a</sup> ± 0,89	1,69 <sup>b</sup> ± 0,83

\* n=30 consumidores de queijo (média ± desvio padrão).

<sup>a,b</sup> Letras iguais na mesma linha não diferem entre si a 5% de probabilidade (Teste de Tukey)

Tratamento 1 - Fermentação com *L. lactis* ssp *lactis* e *L. lactis* ssp *cremoris*.

Tratamento 2 - Fermentação com *L. lactis* ssp *lactis* e *L. lactis* ssp *cremoris* e *S. thermophilus*.

As diferenças observadas nos atributos sensoriais podem ser relacionadas ao fato dos queijos do tratamento 1 terem apresentado uma maior proteólise (menor firmeza, maior elasticidade, solubilidade e adesividade), como mostra sua caracterização físico-química, quando comparado ao queijo 2. As características de textura de um queijo maturado estão relacionadas principalmente com a degradação das proteínas do queijo, influenciadas por outros fatores, tais como: umidade, relação umidade/caseína, sal e atividade proteolítica e peptidolítica das culturas lácteas<sup>26</sup>.

Os peptídeos gerados pela renina servem de substrato para proteinases microbianas, gerando pequenos peptídeos e aminoácidos que contribuem para o fundo do sabor e algumas vezes para o amargor, se a atividade das enzimas é excessiva. A proteólise excessiva (renina muito proteolítica, muita umidade ou pouco sal) também pode levar ao amargor<sup>7</sup>. Geralmente este sabor está associado a presença de polipeptídeos com um alto conteúdo de resíduos hidrofóbicos<sup>27</sup>. No presente trabalho a percepção do amargor foi maior nos queijos do tratamento 1, mais proteolisado.

O efeito imediato da proteólise na textura dos queijos duros e semi-duros é o amaciamento devido à quebra da rede de caseína, como mostram os resultados sensoriais, mas este efeito é muito dependente do pH. O alto valor de pH permite às proteínas permanecerem em uma matriz que se amacia conforme aumenta a proteólise<sup>27</sup>.

## CONCLUSÕES

O uso de *Streptococcus thermophilus* como cultura adjunta na fabricação do queijo Prato não resultou em maior proteólise como indicam os índices de profundidade e extensão da maturação, sendo mais intensa nos queijos do tratamento 1, os quais apresentaram maior teor de umidade. A variação na intensidade da proteólise resultou em alterações nas características sensoriais dos queijos. Os queijos mais proteolisados, sem a adição da cultura adjunta, apresentaram menor firmeza, maior acidez e gosto amargo, maior sensação picante, elasticidade, adesividade, solubilidade e umidade.

## REFERÊNCIAS

1. Moreno I, Van Dender AGF, Costa GAN, Vialta A, Lerayer ALS, Silva AT, Destro MT. Propriedades físicas e composição química e bioquímica durante a maturação de queijo prato de diferentes origens. *Rev Inst Laticínios Cândido Tostes* 2002; 57 (327): 136-9.
2. Silva AT. Maturação de queijo tipo prato: influência da adição de enzimas proteolíticas no processo [Dissertação de mestrado]. Campinas, São Paulo: Universidade de Campinas, 1998. 119 pp.
3. Costa Júnior LCG, Pinheiro AJR. Influência da relação caseína/gordura nas características físico-químicas do queijo prato. *Rev Inst de Laticínios Cândido Tostes* 1998; 53 (305): 29-49.
4. Baldini VLS, Campos SDS, Silva AT, Van Dender AGF, Lajolo FM. Alterações das características químicas e de textura do queijo tipo Prato ao longo do processo de maturação. *Rev Inst Laticínios Cândido Tostes* 1998; 53(304): 53-9.
5. Silva AT, Van Dender AGF, Baldini VLS. Perfil eletroforético do queijo tipo Prato obtido com incorporação de enzimas proteolíticas. *Rev Inst Laticínios Cândido Tostes* 1999; 54 (309): 150-6.
6. Silva AT, Moreno I, Van Dender AGF, Vialta A. Efeito da redução do teor de gordura na população microbiana e na formação de flavor do queijo. *Rev Ind Laticínios* 2004; 50: 58-61.
7. Fox PF, Law J, McSweeney PLH, Wallace J. Biochemistry of cheese ripening. In: Fox PF, editor. *Cheese: chemistry, physics and microbiology*. London: Chapman & Hall; 1997.
8. Yvon M, Rijnen L. Cheese flavour formation by amino acid catabolism. *Int Dairy J* 2001; 11 (4/7): 185-201.
9. Engels WJ, Visser S. Isolation and comparative characterization of components that contribute to the flavour of different types of cheese. *Neth Milk Dairy J* 1994; 48 (3): 127-40.
10. Sabioni JG. Contribuição da atividade lipolítica e proteolítica na formação de flavor em queijos e no desenvolvimento de produtos aromáticos de origem láctea. *Rev Inst Laticínios Cândido Tostes* 2000; 54 (312): 30-9.
11. Fox PF. Proteolysis during cheese manufacturing and ripening. *J Dairy Sci* 1989; 72 (6): 1379-400.
12. Case RA, Bradley Jr RL, Williams RR. Chemical and physical methods. American Public Health Association. *Standard methods for the examination of dairy products*. 15<sup>nd</sup> ed. Washington (DC): 1985. p. 327-404.
13. Instituto Adolfo Lutz (BR). Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. São Paulo (SP); 1985.
14. Association of Official Analytical Chemists - AOAC. *Dairy products. Official methods of analysis*. 16<sup>nd</sup> ed. Arlington, 1997.
15. Silva PHF, Pereira DBC, Oliveira LL, Costa Júnior LCG. Físico-química do leite e derivados: métodos analíticos. Juiz de Fora (MG): Oficina de Impressão; 1997.
16. Vakaleris DG, Price WV. A rapid spectrophotometric method for measuring cheese ripening. *J Dairy Sci* 1959; 42 (2): 264-76.
17. Van Dender AGF, Sevilhano LA, Yotsuyanagi K, Jardim DCP. Determinação da atividade de água de queijos usando crioscopia eletrônica. *Rev Inst Laticínios Cândido Tostes* 1995; 50 (3): 18-26.
18. Wolfschoon-Pombo AF. Índices de proteólise em alguns queijos brasileiros. *Boletim do Leite* 1983; 55 (661): 1-8.
19. Giomo A. Tasting the cheese and sensory analysis. In: Symposium "Cheese in all their aspects". *Bulletin of the IDF* 2001; 369: 30-3.
20. Moraes MAC. Métodos para avaliação sensorial dos alimentos. Campinas (SP): Ed. Unicamp; 1983.
21. Banzato DA, Kronka SD. Experimentação agrícola. 3<sup>rd</sup> ed. Jaboticabal (SP): Funesp; 1995.
22. Brasil. Portaria nº 358 de 1997 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade do queijo Prato. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 4 set. 1997. nº172, p.19690*.
23. Cecchi HM. Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos. Campinas (SP): Editora da Unicamp; 1999.
24. Fox PF, Guinee TP, Cogan TM, McSweeney PLH. *Fundamentals of cheese science*. Gaithersburg: Aspen Publishers; 2000.
25. Beresford TP, Fitzsimons NA, Brennan NL, Cogan TM. Recent advances in cheese microbiology. *Int. Dairy J* 2001; 11 (4): 259-74.
26. Katsuda MS, Miglioranza LHS, Ferreira SHP, Fonseca ICB. Caracterização química, sensorial e de textura, de queijo tipo prato com teor reduzido de gordura. *Rev Inst Laticínios Cândido Tostes* 1999; 54 (309): 128-33.
27. Varnan AH, Sutherland JP. *Leche y productos lácteos: tecnología, química y microbiología*. Zaragoza: Editorial Acribia; 1994.

# Avaliação das condições higiênico-sanitárias de cominho e pimenta do reino em pó comercializados em cidades do Estado de São Paulo, Brasil, mediante a presença de matérias estranhas

Evaluation of ground pepper and cumin sold in retail market of São Paulo State, Brazil, based on the presence of extraneous materials

RIALA6/1090

Rejane Alexandre S. GRACIANO<sup>1</sup>; Márcia Bittar ATUI<sup>2</sup>; Márcia N. DIMOV<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Seção de Microscopia Alimentar - Instituto Adolfo Lutz de São José do Rio Preto.

<sup>2</sup> Seção de Microscopia Alimentar - Instituto Adolfo Lutz.

\* Endereço para correspondência: Instituto Adolfo Lutz, Divisão de Bromatologia e Química, Seção de Microscopia Alimentar, Av. Dr. Arnaldo, 355 – 01246-902 – São Paulo – SP email: dimonog@ial.sp.gov.br

Recebido: 05/05/2006 – Aceito para publicação: 01/12/2006

## RESUMO

A pesquisa de sujidades leves presentes nos alimentos é de fundamental importância para manutenção da qualidade física, sanitária e nutricional do produto. O objetivo deste estudo foi verificar as condições higiênico-sanitárias de amostras de cominho e pimenta do reino em pó comercializados em cidades do Estado de São Paulo. Foram analisadas 69 amostras de pimenta do reino em pó e 47 amostras de cominho em pó, adquiridas no comércio de São Paulo, Campinas, Ribeirão Preto, Santo André, São José do Rio Preto e Sorocaba no período de abril de 1999 a maio de 2000. As amostras dos condimentos em estudo foram analisadas nos Laboratórios de Microscopia Alimentar do IAL Central e Regional de S.J.R.P. Foram utilizados os métodos de flutuação descritos pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC) International, 17<sup>a</sup> ed., 2000. De acordo com os resultados obtidos observou-se que das 47 amostras de cominho analisadas, 44 continham fragmentos de insetos, 3 continham ácaros e 11 pêlos de roedor. Em relação às amostras de pimenta do reino, das 69 analisadas, 68 continham fragmentos de insetos, 17 ácaros, 16 pêlos de roedor, além de outras sujidades. De acordo com a Resolução RDC nº 175 de 8 de julho de 2003, 11 (23,4%) amostras de cominho e 16 (23,2%) amostras de pimenta do reino são consideradas impróprias ao consumo por conter pêlos de roedor.

**Palavras-chave.** sujidades leves, condimentos, fragmentos de insetos, pêlos de roedor, ácaros.

## ABSTRACT

Investigation on the presence of light filth in foods is relevant topic for maintaining the physical, sanitary and nutritional quality of the product. The objective of this study was to verify the sanitary-hygienic conditions of ground cumin and black pepper marketed in cities of the state of São Paulo. Sixty-nine samples of ground black pepper and forty-seven samples of ground cumin were analyzed. These samples were purchased from markets located in São Paulo, Campinas, Ribeirão Preto, Santo André, São José do Rio Preto and Sorocaba, during the period between April, 1999 and May, 2000. The samples were analyzed at Instituto Adolfo Lutz in São Paulo and in São José do Rio Preto. The flotation methods described by the Association of Official Analytical Chemists (AOAC) International, 17<sup>th</sup>, 2000 were employed, performing the assays in duplicates; and the results were expressed as an arithmetic average. According to the obtained results, of 47 ground cumin samples 44 contained insect fragments, 3 were contaminated with mites, and 11 with rodent hair. Of 69 analyzed ground black pepper samples, 68 were contaminated with insect fragments, 17 contained mites, and 16 samples presented rodent hairs, in addition to other impurities. According to the RDC Resolution nº 175, July 8, 2003, 11 (23.4%) cumin samples and 16 (23.2%) black pepper samples were considered inadequate for human consumption as they contained rodent hairs.

**Key words.** light filth, spices, insect fragments, rodent hairs and mites.

## INTRODUÇÃO

A pesquisa de sujidades leves presentes nos alimentos é de fundamental importância para manutenção da qualidade física, sanitária e nutricional do produto. Dentre as matérias estranhas, estão às sujidades leves que são definidas como materiais mais leves que apresentam propriedades oleofílicas e são separadas do produto por flutuação em uma mistura óleo-água, como por exemplo: fragmentos de insetos, ácaros, pêlos animais e bárbulas de aves<sup>1</sup>.

Dentre as sujidades leves existem aquelas que são evitáveis durante o processamento do alimento através das Boas Práticas de Fabricação e do plano Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) em vigor na indústria produtora.

Os condimentos são substâncias sápidas de origem natural com ou sem valor nutritivo empregados nos alimentos com o fim de modificar ou exaltar o seu sabor. Essas substâncias deverão ser puras, sãs e limpas, além de corresponderem às suas características botânicas normais. As especiarias estudadas nesse trabalho foram *Piper nigrum* L. e o *Cuminum cyminum* L. que segundo a RDC nº 276, de 22 de setembro de 2005, as partes vegetais utilizadas são os frutos. Ainda segundo esta legislação, os condimentos devem ser obtidos, processados, enlatados, transportados e conservados em condições que não produzam, desenvolvam e/ou agreguem substâncias físicas, químicas ou biológicas que coloquem em risco a saúde do consumidor<sup>2</sup>.

O uso dos condimentos estimulou a sua importação e estes podem chegar ao consumidor com baixa qualidade, causada pela perda de seus óleos essenciais voláteis, pela contaminação por microrganismos ou pela infestação por insetos. Como são oriundos de diversos órgãos vegetais, colhidos em regiões tropicais e subtropicais, submetidos a variações climáticas e secos de modo artesanal, estão sujeitos à fermentação e/ou à proliferação de microrganismos<sup>3</sup>.

As condições sanitárias das plantações influem nos níveis de contaminação, assim como os cuidados com a colheita. Por outro lado, o armazenamento em galpões velhos, úmidos, mal ventilados, com paredes cobertas de bolor, propiciam a multiplicação das espécies contaminantes e/ou a invasão por novas espécies a partir do ambiente. A perda de qualidade das especiarias traduz-se por diminuição das propriedades sensoriais: cor, odor e sabor<sup>3</sup>.

Os condimentos e seus derivados têm sido usados no preparo de alimentos há milhares de anos, conferindo-lhes sabor e aroma diferenciados. O Brasil é o segundo maior produtor de pimenta do reino no mundo, sendo que um dos componentes que contribuem para aumentar o seu valor como condimento é o seu óleo essencial. A ação inibitória das especiarias e de seus extratos, nos diferentes microrganismos, já foi relatada<sup>4</sup>.

Em relação aos riscos oferecidos pelos condimentos a saúde, no que concerne à culinária familiar, onde o consumo

dá-se logo após o preparo, há pouco perigo. O problema maior diz respeito à indústria de alimentos, onde a utilização é em larga escala e os produtos serão consumidos, após um prazo variável de estocagem. Assim, as conservas insuficientemente esterilizadas, pratos cozidos, embutidos, queijos e massas constituem substrato favorável para os microrganismos contidos nas especiarias. Outro risco que pode ser apontado relaciona-se a utilização das especiarias como guarnição de alimentos, quando colocadas na superfície dos mesmos, podendo propiciar o desenvolvimento de bolores<sup>3</sup>.

O Código de Defesa do Consumidor, que entrou em vigor em 11 de março de 1991, provocou mudanças significativas nas relações entre consumidores de alimentos e indústrias processadoras do Brasil<sup>5</sup> e a atual legislação para o cumprimento dos parâmetros microscópicos, Resolução RDC nº 175 de 8 de julho de 2003, estabelece disposições gerais para avaliação de matérias estranhas macroscópicas e microscópicas prejudiciais à saúde humana em alimentos embalados, inclusive bebidas e águas envasadas, relacionadas aos riscos a saúde humana<sup>6</sup>.

Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a presença de sujidades leves, em amostras de cominho e pimenta do reino em pó comercializadas em cidades do Estado de São Paulo.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas 69 amostras de pimenta do reino em pó e 47 amostras de cominho em pó de 22 e 14 marcas respectivamente, com lote e prazo de validade distintos, adquiridas no comércio de São Paulo, Campinas, Ribeirão Preto, Santo André, São José do Rio Preto e Sorocaba no período de abril de 1999 a maio de 2000. As amostras dos condimentos em estudo foram analisadas nos Laboratórios de Microscopia Alimentar do IAL Central e Regional de São José do Rio Preto.

Para análise de matérias estranhas em cominho em pó foi utilizado o método de flutuação nº 975.49 A (a) e B (b)<sup>7</sup> e para pimenta do reino moída foi utilizado o método de flutuação nº 972.40 A<sup>8</sup>, descritos pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC) International, 17ª ed., 2000.

As análises foram realizadas em duplicata e os resultados expressos como a média aritmética.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos para as amostras de cominho em pó estão apresentados na Tabela 1.

Estes produtos podem ser infestados e avariados por insetos que se desenvolvem na área de produção e colheita. Os insetos comuns no campo incluem os das Ordens Lepidoptera, Coleoptera, Hymenoptera, Homoptera e Hemiptera e no

armazenamento principalmente Coleoptera e Lepidoptera podem atacar o produto. Outros artrópodes podem promover infestações tais como ácaros, “trips” e aranhas<sup>9</sup>.

**Tabela 1.** Número e porcentagem de amostras com presença de sujidades leves em 47 amostras de cominho em pó e 69 de pimenta do reino moída. São Paulo, 2000.

	Presença		Ausência	
	n	%	n	%
<b>COMINHO</b>				
Fragmentos de insetos	44	93,6	3	6,4
Ácaros	3	6,4	44	93,6
Pêlos de roedor	11	23,4	36	76,6
<b>PIMENTA DO REINO</b>				
Fragmentos de insetos	68	98,5	1	1,5
Ácaros	17	24,6	52	75,4
Pêlos de roedor	16	23,2	53	76,4
Pêlos não identificados	4	5,8	65	76,8
Larvas vivas	4	5,8	65	94,2
Fragmento. de larvas	7	10,1	62	89,9
Outras sujidades	2	2,9	67	97,1

n= número de amostras.

De acordo com a Tabela 1, observou-se que a maioria das amostras de cominho (93,6%) continha algum tipo de fragmento de inseto ou de campo ou de armazenamento, indicando uma alta incidência deste tipo de sujidade leve no cominho. Embora estes tipos de insetos não causem nenhum dano à saúde do consumidor, as indústrias devem produzir seus produtos em locais adequados segundo a legislação de Boas Práticas de Fabricação, considerando ainda o Padrão de Identidade e Qualidade do Produto<sup>10</sup>.

Esse tipo de contaminação embora inócua a saúde, não é perceptível pelo consumidor que adquire o produto e não consegue reconhecer sua qualidade. Geralmente, existem dois problemas principais na associação entre o consumo dos artrópodos versus doença. O primeiro é a diversidade do alimento e dos insetos e o segundo é a falta de pesquisas e dados disponíveis na área<sup>9, 11</sup>.

Observa-se também que 11 (23,4%) amostras estavam contaminadas com pêlos de roedor. Estes podem estar presentes nos alimentos e sua identificação é importante, pois são indicadores de contaminação acidental ou fecal. Os ratos e camundongos têm o hábito de lambe-se, ocasião na qual, engolem os pêlos que resistem à digestão e são eliminados nos excrementos, portanto o achado de pêlos nos alimentos, pode indicar a presença de bactérias fecais<sup>12, 13</sup>.

Os roedores constituem sérios problemas em todas as fases de processamento, produção e armazenamento de gêneros alimentícios. Além das perdas de alimento devidas ao consumo por estes animais, ocorre a contaminação pela presença de seus pêlos, fezes e/ou urina. Os roedores são transmissores em potencial, de uma série de doenças, entre elas a leptospirose, causada por diversos sorotipos de *Leptospira interrogans*, que se alojam nos rins desses animais e são continuamente eliminadas pela urina. Quando depositadas na água, ou em superfícies para o preparo de alimentos que estejam úmidas, as

leptospiras tem chance de sobreviver durante um tempo suficientemente longo para serem infectantes. Existem outras doenças transmitidas por roedores e/ou através de seus excrementos e urina como, salmoneloses, peste (bubônica, pneumônica, septicêmica) e viroses, entre outras<sup>14</sup>.

Das 47 amostras de cominho analisadas, 3 continham ácaros, sendo que em 1 amostra foram encontrados 27 ácaros, 4 pêlos de roedor e 196 fragmentos de insetos evidenciando a falta de adoção de boas práticas de produção deste produto.

Os ácaros têm importância médico-sanitária elevada em virtude de poderem veicular bactérias, leveduras e fungos. As partículas fecais dos ácaros possuem substâncias tóxicas capazes de causar sensibilização nos homens ou animais, resultando em enterites agudas, podendo provocar lesões macróticas na mucosa intestinal<sup>15</sup>.

Os ácaros encontrados nas amostras de cominho em pó eram ácaros terciários na sua maioria (Cryptostigmata-Oribatida) que vivem nas camadas superficiais do solo, onde se alimentam de algas, fungos, líquens, folhas deterioradas e podres<sup>16</sup>.

A contaminação acarina pode ser devida à falta de limpeza no processamento, mau armazenamento, alto nível de umidade dos produtos, deficiência de circulação de ar, falta de boas práticas durante transporte, ensacamento, acúmulo de resíduos e a presença de fungos e bactérias tornando o alimento impróprio ao consumo humano<sup>15,17</sup>.

A Tabela 1 resume os dados obtidos na pimenta do reino e observa-se que 98,5% das amostras continham fragmentos de insetos, 24,6% continham ácaros e 23,2% continham pêlos de roedor evidenciando a falta de adoção de Boas Práticas de Fabricação e a presença de matérias estranhas prejudiciais à saúde, representada por pelos de roedor, uma vez que os roedores podem veicular patógenos aos alimentos.

A pimenta do reino em especial poderá ser adicionada ao alimento na hora da degustação, sem nenhuma etapa posterior que elimine um possível patógeno veiculado, aumentando o risco de infecção<sup>3</sup>.

Assim como nas amostras de cominho, os fragmentos de insetos encontrados em pimenta do reino não eram nocivos à saúde, por não pertencerem às Ordens Blattodea e Diptera, que são considerados vetores mecânicos<sup>6</sup>.

Gecan et al. realizaram um estudo com vários tipos de condimentos adquiridos no varejo, para determinação da qualidade sanitária dos mesmos. No que concerne à pimenta do reino, os autores verificaram que das 1523 amostras analisadas, 1499 (98,4%) continham fragmentos de insetos, o que vem de encontro com os dados obtidos neste estudo onde encontramos 98,5% das amostras com fragmentos de insetos<sup>18</sup>.

Correa et al. analisaram outros tipos de condimentos moídos (canela e páprica) e também encontraram como maior contaminante os fragmentos de insetos<sup>19</sup>.

Em relação aos pêlos de roedor, Gecan et al. encontraram 20% das amostras contaminadas, e no presente estudo, 23,2% continham este contaminante<sup>18</sup>. De acordo com a Resolução RDC nº 175<sup>6</sup>, 23,4% das amostras de cominho e 23,2% das

amostras de pimenta do reino são consideradas impróprias ao consumo humano por apresentar pêlos de roedor.

**Tabela 2.** Estatísticas descritivas das sujidades leves isoladas em amostras de 50g cada de cominho e pimenta do reino em pó. São Paulo, 2000.

COMINHO	var	média	mediana	dp	min	max	Q1	Q3
FI	23,0	9,0	41,2	0,0	196,0	4,0	20,0	
AC	0,6	0,0	4,0	0,0	27,0	0,0	0,0	
PR	0,3	0,0	0,7	0,0	4,0	0,0	0,0	
PIMENTA	var	média	mediana	dp	min	max	Q1	Q3
FI	115,0	30,0	232,0	0,0	1323,0	14,8	81,0	
AC	0,8	0,0	2,6	0,0	18,0	0,0	0,3	
PR	0,7	0,0	2,6	0,0	20,0	0,0	0,5	

FI: fragmento de inseto, AC: ácaro, PR: pêlo de roedor.

var: variável estudada, dp: desvio padrão, min: contagem mínima, max: contagem máxima, Q1: primeiro quartil, Q3: terceiro quartil.

Embora haja um alto índice de amostras de cominho em pó (93,6%) com fragmentos de insetos, a média se manteve em 23 fragmentos de insetos por 10g, sendo que em uma amostra foi encontrado o número máximo de 196 por 10g. Esta alta variabilidade pode ser explicada pela falta de homogeneidade que o contaminante apresenta no produto. Podemos então utilizar a mediana como referência que foi de 9 fragmentos de insetos por 10g, demonstrando que é possível produzir este tipo de condimento com baixo número de fragmentos de insetos, sem pêlos de roedor e ácaros.

Comparando-se com a pimenta do reino, verificou-se que a mesma apresentou diferenças significativas em relação ao cominho quanto à média de fragmentos de insetos. Verificou-se em uma amostra o número máximo de 1323 fragmentos de insetos em 50g e em outra amostra 700 fragmentos de insetos, 20 pêlos de roedor e 18 ácaros em 50g. Os dados obtidos indicam a não adoção das Boas Práticas de Fabricação nestas indústrias, uma vez que a mediana foi de 30 fragmentos de insetos e ausência de pelos de roedor e ácaros em 50g.

As amostras muito contaminadas são pontuais, não representam a realidade e dependem das medidas sanitárias adotadas pelas indústrias que deveriam ser freqüentemente monitoradas pela Vigilância Sanitária visando um produto inócuo ao consumo.

De acordo com a Tabela 2 a pimenta do reino apresenta maior contaminação por fragmentos de insetos do que o cominho, apresentando 75% das amostras com 81 fragmentos de insetos em 50g do produto.

## CONCLUSÕES

Pelos resultados obtidos no presente estudo podemos concluir que:

A maioria das amostras de cominho e pimenta do reino apresentou presença de fragmentos de insetos oriundos do campo e/ou armazenamento, estando de acordo com a atual legislação RDC nº 175 por não serem considerados prejudiciais à saúde.

Devido à variabilidade do número de fragmentos de insetos encontrados por amostra, conclui-se que certos fabricantes podem obter produtos em condições higiênico-sanitárias satisfatórias.

De acordo com a Resolução RDC nº 175, 23,4% das amostras de cominho e 23,2% das amostras de pimenta do reino foram consideradas impróprias ao consumo por conter pelos de roedor, evidenciando o contato do alimento com roedores que são nocivos a saúde humana.

## REFERÊNCIAS

1. Association of Official Analytical Chemists (AOAC). Official Methods of Analysis of AOAC International. 17<sup>a</sup> ed., William Horwitz (Editor), Gaithersburg, MD, 2000.
2. Brasil. Resolução RDC nº 276, de 22 de setembro de 2005. ANVISA Aprova o Regulamento Técnico para Especiarias, Temperos e Molhos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 23 de setembro 2005. Seção I, p 378.
3. Germano PML, Germano MIS. Importância e risco das especiarias. Hig Alim 1998, 12(57): 23-31.
4. Ristori CA, Pereira MA dos S, Gelli DS. O efeito da pimenta do reino preta moída frente à contaminação *in vitro* com *Salmonella* Rubislaw. Rev Inst Adolfo Lutz 2002; 62(2): 31-3.
5. Brasil. Lei nº 8.078, de 11 de setembro de 1990. Presidência da República, Casa Civil. Dispõe sobre a proteção do consumidor e dá outras providências. Diário Oficial da União. Brasília, DF, nº 176, 12 de setembro de 1990. Suplemento, p. 1-12.
6. Brasil. Resolução RDC nº 175, de 08 de julho de 2003. ANVISA. Aprova o Regulamento Técnico de Avaliação de Matérias Macroscópicas e Microscópicas Prejudiciais a Saúde Humana em Alimentos Embalados. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 2003. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/rdc/175\\_03rdc.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/rdc/175_03rdc.htm). 14 abril 2004.
7. Association of Official Analytical Chemists (AOAC). Official Methods of Analysis of AOAC International. 17<sup>a</sup> ed., William Horwitz (Editor), Gaithersburg, MD, AOAC Official Method 975.49 A(a) e B(b), 2000.
8. Association of Official Analytical Chemists (AOAC). Official Methods of Analysis of AOAC International. 17<sup>a</sup> ed., William Horwitz (Editor), Gaithersburg, MD, AOAC Official Method 972.40 A, 2000.
9. Food and Drug Administration (FDA). The food defect action levels: current levels for human use that present no health hazard. Washigton, US Department of Health and Human Services/Public Heath Service Food and Drug Administration Bureau of Foods, 1982, 20p.
10. Brasil. Portaria SVS/MS nº 326, de 30 de julho de 1997. Regulamenta as Condições Higiênicos-Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Produtores/

- Industrializadores de Alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 1 de agosto de 1997. Seção I.
11. Wirtz RA. Food Pests as Disease Agents. In: Gorham JR ed. Ecology and Management of Food – Industry Pests. (FDA Technical Bulletin Number 4) Association of Official Analytical Chemists, Arlington, Virginia, p: 469-475, 1991.
  12. Vasquez AW. Hair structure and identification. In: Gorhan, JR ed. Training manual for analytical entomology in the food industry. Washington DC, Food and Drug Administration, 1977. p: 70-76 (FDA Technical Bulletin, 2).
  13. Vasquez AW. Hairs. In: Gorhan, JR ed. Principles of food analyses for filth, decomposition, and foreign matter. Washington, DC, Food and Drug Administration, 1981. p 125-170 (FDA Technical Bulletin, 1).
  14. Carvalho Neto C. Manual prático de biologia e controle de roedores. 2ª ed. rev. ampl. São Paulo, CIBA – GEIGY; 1987.
  15. Baggio D, Franzolin MR. Análise e controle dos ácaros em alimentos e produtos armazenados. In: Encontro Nacional de Analistas de Alimentos, 1991. 18p.
  16. Hughes AM. Mites of stored food and houses. 2ª ed. London, Min. Agric. Food, [Technical Bulletin, 2], 1976.
  17. Krantz GW. Manual of acarology. 2ª ed. Corvallis, Oregon State University Book Store, 1978.
  18. Gecan SJ, Bandler R, Glaze LE, Atkinson JC. Microanalytical Quality of Ground and Unground Marjoram, Sage and Thyme, Ground Allspice, Black Pepper and Paprika. Journal of Food Protection 1986; 49(3): 216-221.
  19. Correia M, Daros VSMG, Silva RP. Matérias estranhas em canela em pó e páprica em pó, comercializadas no Estado de São Paulo. Ciênc Tecnol Aliment. 2000; 20(3): 1-10.

# Avaliação da atividade antimicrobiana de preparações de própolis comercializadas na cidade de São Paulo

## Antimicrobial activity evaluation of propolis products for sale in São Paulo city

RIALA6/1091

Mariangela Tirico AURICCHIO <sup>1\*</sup>, Adriana BUGNO <sup>2</sup>, Adriana Aparecida Buzzo ALMODÓVAR<sup>2</sup>, Tatiana Caldas PEREIRA<sup>2</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Instituto Adolfo Lutz – Diretoria de Serviço de Medicamentos – SP/SP  
Av. Dr. Arnaldo, 355 – 01246-902 – e-mail: mauricch@ial.sp.gov.br

<sup>2</sup>Instituto Adolfo Lutz – Seção de Controle de Esterilidade e Pirogênio – SP/SP  
Recebido: 05/06/2006 – Aceito para publicação: 09/01/2007

### RESUMO

A própolis é uma substância resinosa de diferentes origens, com propriedades anti-inflamatórias e antimicrobianas, a qual tem sido estudada sob vários aspectos. Neste estudo, nove preparações de própolis comercializadas em farmácias da cidade São Paulo, foram avaliadas quanto à atividade contra *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis* e *Streptococcus mutans*. Utilizou-se o método de difusão em ágar, avaliando-se cada produto em condição não diluída, na diluição indicada e em um décimo da diluição recomendada. Os resultados indicaram que as diluições recomendadas nos rótulos dos produtos não evidenciaram atividade antimicrobiana.

**Palavras-chave.** própolis, atividade antimicrobiana

### ABSTRACT

Propolis is a resinous substance from diverse origins with antinflammatory and antimicrobial properties, which has been studied on some aspects. In this study, nine propolis products, sold in pharmacies and drugstores of São Paulo city, were evaluated for their claimed antimicrobial properties displayed in flask labels and/or product use instruction brochures. Antimicrobial activity was evaluated against *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, and *Streptococcus mutans*. The method of diffusion in agar was used for evaluating every product in undiluted solutions, in a recommended dilution, and diluted one to tenth of recommended dilution. The results indicated that the recommended dilutions of products showed no antimicrobial activity.

**Key words.** propolis, antimicrobial activity

### INTRODUÇÃO

A própolis é uma substância resinosa balsâmica, de origem botânica variada. Sua coloração varia do verde amarelado ao marrom, tem sabor fortemente acre, frequentemente amargo de odor agradável, que as abelhas extraem dos brotos de arbustos e árvores com a finalidade de calafetar pequenas aberturas na colméia, bem como, purificar e descontaminar o ar internamente a esta. Suas propriedades anti-sépticas e anti-inflamatórias são conhecidas

desde a antiguidade, tendo sido utilizada pelos sacerdotes egípcios em unguentos e cremes para embalsamar, pelos gregos e por outras civilizações estudadas<sup>1,2</sup>. Apesar de sua utilização ao longo dos séculos, foi nas décadas recentes que se iniciaram as investigações científicas sobre a composição e emprego da própolis.

A composição depende da disponibilidade das fontes vegetais das quais as abelhas retiram o material para sua elaboração e, também da função desejada na colméia, sendo que a própolis usada para reparo da colméia tem proporção maior de cera, resultando

em material mais duro, enquanto que aquela usada para vedar os favos tem pouca ou nenhuma cera, sendo por isso mais macia. As outras substâncias sempre encontradas na própolis são os flavonóides, grupo de substâncias universalmente distribuídos nas plantas, e que indicam a origem da própolis. A composição da própolis no Brasil e suas variações em relação a hidrocarbonetos, ésteres, álcoois de ésteres e terpenos tem sido estudadas<sup>3,4</sup>.

A atividade antimicrobiana para alguns tipos de própolis também tem sido avaliada e se constituído em objeto de revisões<sup>1,5-16</sup>.

Neste estudo, preparações líquidas de própolis, comercializadas em farmácias da cidade São Paulo, foram avaliadas quanto à atividade antimicrobiana alegada em rótulos e/ou folhetos que acompanham o produto. As amostras foram submetidas ao teste para verificação da atividade antimicrobiana frente aos microrganismos frequentemente relacionados a infecções da cavidade bucal.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Amostra

Foram avaliadas nove diferentes preparações de própolis, comercializadas em farmácias da cidade de São Paulo: (1) própolis em solução aquosa (27 mg/mL); (2) própolis em solução alcoólica a 12%; (3) extrato alcoólico de própolis a 30%; (4) extrato alcoólico de própolis a 11%; (5) solução alcoólica de própolis a 20%; (6) extrato alcoólico de própolis a 20%; (7) extrato alcoólico de própolis a 15%; (8) própolis em spray e (9) própolis e ervas em spray.

Das nove preparações avaliadas, sete apresentaram-se na forma de solução para serem ingeridas após diluição em água, leite ou suco, de acordo com as indicações do rótulo e embalagem, e duas apresentaram-se como "spray" para serem aspergidas diretamente na cavidade bucal.

### Preparação da suspensão microbiana

Culturas de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 e *Candida albicans* ATCC 10321 foram cultivadas em caldo Caseína de soja (DIFCO®), incubadas a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  por 48 horas, em aerobiose. As culturas de *Enterococcus faecalis* ATCC 19433 e *Streptococcus mutans* ATCC 25175 foram realizadas em caldo Caseína de soja (DIFCO®), incubadas a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  por 48 horas, em condições de anaerobiose.

Após cultivo, as suspensões microbianas foram preparadas em solução fisiológica para conterem aproximadamente de  $1$  a  $2 \times 10^8$  UFC/mL, baseando-se na escala 0,5 de McFarland<sup>17</sup>.

### Avaliação da atividade antimicrobiana

Cada produto foi submetido à avaliação da atividade antimicrobiana utilizando a técnica de Difusão em Agar, de acordo com CLSI<sup>17</sup> (antigo NCCLS).

### Preparação das amostras de própolis

Os produtos 1 a 6 foram analisados em três condições: a) sem diluição, b) diluídos em solução fisiológica de acordo com recomendações do fabricante (dose recomendada) e c) em dose 10 vezes superior à dose recomendada. Os produtos 7 a 9 foram analisados sem diluição, de acordo com recomendações do fabricante.

Soluções de eritromicina (na concentração de  $1\mu\text{g/mL}$ ) e de nistatina (nas concentrações de 50 e 30 UI/mL), preparadas conforme indicado em compêndios farmacopêicos<sup>18</sup>, foram utilizadas como controle da atividade antimicrobiana.

### Avaliação da atividade antimicrobiana

Alíquotas de  $200\mu\text{L}$  de cada suspensão microbiana preparada foi adicionada a  $25\mu\text{L}$  de agar Caseína de soja (Merck®), fundido e resfriado, contido em placas de Petri,  $90 \times 100$  mm. Após a solidificação, foram efetuados seis orifícios com diâmetro aproximado de 10 mm. Alíquotas de  $100\mu\text{L}$  de amostra ou solução antibiótica foram adicionadas nos orifícios e as placas foram incubadas a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  por 24 horas, nas mesmas condições descritas para o preparo das suspensões microbianas.

Após o período de incubação, mediou-se o diâmetro dos halos de inibição. A presença de halo com diâmetro igual ou superior a 11 mm foi indicativa de atividade antimicrobiana satisfatória.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as avaliações foram realizadas em quadruplicata e as tabelas 1 e 2 apresentam os diâmetros médios dos halos de inibição.

Entre os produtos avaliados sem diluição, verificou-se que o produto 1 não apresentou atividade antimicrobiana, estando de acordo com outros estudos que evidenciaram que os componentes antibacterianos da própolis são insolúveis em água<sup>5,15,19</sup>.

A atividade antimicrobiana do extrato de própolis se deve à presença de flavonóides, que são solubilizados em meio alcoólico, além de outros princípios ativos que sinergicamente contribuem para a atividade antimicrobiana<sup>1,6</sup>. Endler e col.<sup>20</sup> demonstraram que a concentração do álcool etílico, utilizado na preparação de extrato de própolis, não apresentou atividade inibitória contra *Pseudomonas* spp e *Staphylococcus aureus*.

A maioria dos relatos menciona que a própolis tem acentuada ação inibitória *in vitro* sobre bactérias gram-positivas<sup>7-9,12,14-15,20</sup>. A diferença de sensibilidade entre bactérias gram-positivas e gram-negativas frente à própolis pode ser devida às características da composição da parede celular entre os dois grupos de bactérias<sup>21</sup>. No presente estudo, foram utilizadas apenas bactérias gram-positivas, sendo que em relação à atividade antibacteriana, os produtos 2 a 9 exibiram atividade inibitória, quando testados puros, frente aos microrganismos

**Tabela 1.** Atividade antimicrobiana de preparações contendo própolis avaliadas sem diluição: halos de inibição de crescimento (mm).

Produto	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Streptococcus mutans</i>	<i>Candida albicans</i>
1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
2	16,0 ± 1,7	15,0 ± 2,4	10,8 ± 1,7	14,7 ± 1,5	0,0
3	13,5 ± 1,3	15,5 ± 3,0	14,3 ± 1,5	17,0 ± 1,0	13,0 ± 1,2
4	16,0 ± 2,8	16,5 ± 2,4	0,0	19,7 ± 1,5	12,7 ± 1,5
5	14,5 ± 2,9	16,8 ± 1,6	10,5 ± 1,6	16,5 ± 0,7	11,5 ± 1,3
6	16,5 ± 1,7	17,3 ± 1,0	0,0	17,7 ± 0,6	12,0 ± 0,8
7	16,8 ± 1,5	16,4 ± 1,5	0,0	15,7 ± 1,2	12,3 ± 1,0
8	14,5 ± 2,9	13,0 ± 1,9	0,0	15,3 ± 2,1	10,8 ± 0,5
9	12,5 ± 1,9	11,5 ± 0,8	0,0	15,5 ± 0,7	10,5 ± 0,1
Eritromicina <sup>a</sup>	19,1 ± 1,2	18,6 ± 1,0	15,1 ± 0,9	19,8 ± 0,8	---
Nistatina <sup>b</sup>	---	---	---	---	12,0 ± 0,8
Nistatina <sup>c</sup>	---	---	---	---	17,0 ± 0,6

<sup>a</sup>1µg/mL <sup>b</sup> 30 UI/mL <sup>c</sup>50 UI/mL — não realizado

*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Streptococcus mutans*, enquanto que frente a *Enterococcus faecalis*, apenas o produto 3 apresentou atividade inibitória.

Em relação à atividade antifúngica inibitória, verificouse que os produtos 3 a 9 apresentaram halos de inibição menores em relação às bactérias gram-positivas, confirmando os achados de Koo e colaboradores<sup>21</sup>.

A Tabela 2 apresenta os resultados dos produtos na forma diluída, tendo sido utilizadas diluições para a obtenção de soluções com as doses recomendadas pelos fabricantes dos produtos (D<sub>R</sub>) e com dose dez vezes superior à recomendada (D<sub>1</sub>). Os produtos 2 a 5, quando avaliados na condição D<sub>1</sub>,

apresentam atividade inibitória somente para *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*; na condição D<sub>R</sub>, nenhum dos produtos apresentou atividade inibitória, evidenciando que os mesmos são utilizados em condições ineficazes para a ação antimicrobiana aludida na rotulagem.

De acordo com a ANVISA, para o registro de produtos com indicação terapêutica que contenham própolis como ingrediente ativo, devem ser atendidos os requisitos da Resolução RDC 132/2003<sup>22</sup>, dentre os quais estão a comprovação de eficácia e de segurança de uso, bem como apresentar e atender requisitos mínimos de identidade e qualidade validados para possibilitar seu controle de qualidade.

**Tabela 2.** Atividade antimicrobiana de preparações contendo própolis avaliadas com diluição: halos de inibição de crescimento (mm).

Produto	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Staphylococcus epidermidis</i>		<i>Enterococcus faecalis</i>		<i>Streptococcus mutans</i>		<i>Candida albicans</i>	
	D <sub>1</sub>	D <sub>R</sub>	D <sub>1</sub>	D <sub>R</sub>	D <sub>1</sub>	D <sub>R</sub>	D <sub>1</sub>	D <sub>R</sub>	D <sub>1</sub>	D <sub>R</sub>
1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
2	11,5 ± 0,6	0,0	12,3 ± 0,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
3	11,3 ± 0,6	0,0	13,0 ± 2,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
4	11,0 ± 0,2	0,0	13,0 ± 1,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
5	11,0 ± 0,4	0,0	12,3 ± 1,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

D<sub>R</sub> = dose recomendada

D<sub>1</sub> = 10 x D<sub>R</sub>

Os resultados obtidos neste estudo decorrem da falta de padronização geral das preparações a base de produtos naturais; a adição de excipientes, incluindo os solventes empregados na preparação do extrato de própolis, pode interferir na eficácia antimicrobiana originalmente verificada para a matéria-prima vegetal ativa e comprometer a eficácia do produto final.

A concentração de extrato de própolis, nas sete amostras, variou entre 11 e 30%, enquanto em outras duas, a concentração não foi mencionada.

## CONCLUSÃO

Os resultados mostram que as informações no rótulo dos produtos são incompatíveis com a atividade antimicrobiana proposta.

## REFERÊNCIAS

1. Burdock GA. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (Propolis). *Food Chem Toxicol* 1998; 347-63.
2. Almeida EC, Menezes H. Anti-inflammatory activity of propolis extracts: a review. *J Venom Anim Toxins* 2002; 8: 191-212.
2. Negri G, Marcucci C, Salatino A. Comb and propolis waxes from Brazil (states of São Paulo and Paraná). *J Braz Chem Soc* 2000; 11(5): 453-7.
3. Soares GDM, Citó AMGL, Lopes JAD, Chaves MH. Triterpenos isolados de própolis piauiense. Disponível em [http://www.s bq.org.br/ranteriores/23/resumos/0759]. Acesso em 07/04/04.
4. Astudillo LS, Ávila R, Morrison RA, Gutierrez MC, Bastida J, Codima C, Schimmeda-Hirschmann G. Biologically active compounds from Chilean propolis. *Bol Soc Chil Quím* 2000; 45(5): 577-81.
5. Pinto MS, Faria JE, Message D, Cassini STA, Pereira CS, Gioso MM. Efeito de extratos de própolis verde sobre bactérias patogênicas isoladas do leite de vacas com mastite. *Braz J Vet Res Anim Sci* 2001; 38(6): 278-83.
6. Fernandes JR, Lopes CAM, Sforcin JM, Funari SRC. Population analysis of susceptibility to propolis in reference strains of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *J Venom Anim Toxins* 1997; 3(2):287-94.
7. Fernandes A, Leomil L, Fernandes AAH, Sforcin JM. The antibacterial activity of propolis produced by *Apis mellifera* L. and Brazilian stingless bees. *J Venom Anim Toxins* 2001; 7(2):173-82.
8. Fernandes A, Lopes MMR, Colombari V, Monteiro ACM, Vieira EP. Atividade antimicrobiana de própolis de *Apis mellifera* obtidas em três regiões do Brasil. *Ciência Rural* 2006; 36(1): 294-7.
9. Kujumgiev A, Tsvetkova I, Serkedjieva Y, Bankova V, Christov R, Popov S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *J Ethnopharmacol* 1999; 64: 235-40.
10. Santos FA, Bastos EMA, Uzeda M, Carvalho MAR, Farias LM, Moreira ESA, Braga FC. Antibacterial activity of Brazilian propolis and fractions against oral anaerobic bacteria. *J Ethnopharmacol* 2002; 80: 1-7.
11. Moreno MIN, Isla MI, Cudmani NG, Vattuone MA, Sampietro AR. Screening of antibacterial activity of Amaicha del valle (Tucumán, Argentina) propolis. *J Ethnopharmacol* 1999; 68: 97-102.
12. Vargas AC, Loguercio AP, Witt NM, Costa MM, Silva MS, Viana LR. Atividade antimicrobiana "in vitro" de extrato alcoólico de própolis. *Ciência Rural* 2004; 34(1): 159-63.
13. Bosio, K, Avanzini C, D'Avolio A, Ozino O, Savoia D. In vitro activity of propolis against *Streptococcus pyogenes*. *Lett Appl Microbiol* 2000, 31:174-7.
14. Tolosa L, Cañizares E. Obtención, caracterización y evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de propóleos de Campeche. *Ars Pharmaceutica* 2002; 43(1-2):187-204.
15. Marcucci MC. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apodologie* 1995; 26: 83-99.
16. NCCLS Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; Approved Standard – Eighth Edition. NCCLS document M2 – A8, v 23, n 1, 2003. Disponível em [http://www.anvisa.gov.br/servicos/audite/manuais/clsi/clsi\_OPASM2-A8.pdf]. Acesso em 16/12/2005.
17. United States Pharmacopeia. 28 ed. United States Pharmacopeial Convention, Rockville, 2005.
18. Park KY, Ikegaki M. Preparation of water and ethanolic extracts of propolis and evaluation of the preparations. *Biosc. Biotechnol. Biochem.* 1998; 62(11): 2230-2.
19. Endler AL, Oliveira SC, Amorim CA, Carvalho MP, Pileggi M. Teste de eficácia da própolis no combate a bactérias patogênicas das vias respiratórias. *Ci. Biol. Saúde* 2003; 9(2):17-20.
20. Takaisi-Kikuni NB, Schilcher H. Electron microscopy and microcalorimetric investigations of the possible mechanism of the antibacterial action of a defined propolis provenance. *Planta Med*, 1994; 60: 222-7.
21. Koo H, Gomes BPFA, Rosalen PL, Ambrosano GMB, Park YK, Cury JA. In vitro antimicrobial activity of propolis and Arnica Montana against oral pathogens. *Arch Oral Biol* 2000; 45:141-8.
22. Brasil, Leis e Decretos – Resolução RDC no. 132 de 29 de maio de 2003. Dispõe sobre o registro de medicamentos específicos. Disponível em [http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php]. Acesso em 29/03/06.

# Alterações histológicas no coração de ratos expostos a compostos organofosforados por tempo prolongado

## Heart histological changes in rats long-term exposed to organophosphate

RIALA6/1092

Edenilson Eduardo CALORE<sup>1,2</sup>; Emerson NARCISO<sup>3</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Departamento de Patologia, Instituto Emílio Ribas, Av. Dr. Arnaldo, 165 - 01246-900 - São Paulo/SP, Brasil. Fax: 55 11 3721-2467. e-mail: eecalore@terra.com.br

<sup>2</sup>Departamento de Fisiopatologia Experimental, Faculdade de Medicina – Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, Brasil. Av. Dr. Arnaldo, 455 - Cerqueira César CEP: 01246903 - São Paulo - SP Telefone: (011) 3061-7000.

<sup>3</sup>Instituto Biológico, São Paulo, Brasil. Departamento de Toxicologia. Avenida Conselheiro Rodrigues Alves, 1.252 CEP 04014-002

Fone (011)5087-1700 - São Paulo - SP - Brasil.

Recebido: 03/07/2006 – Aceito para publicação: 17/11/2006

### RESUMO

Além da intoxicação aguda, os organofosforados podem ser responsáveis por outras situações mórbidas a médio e longo prazo. Não foram descritos até o momento os efeitos a longo prazo no sistema cardio-circulatório decorrentes da exposição prolongada aos organofosforados. Foi nosso objetivo estudar alguns desses possíveis efeitos por métodos histológicos e morfométricos no coração de ratos tratados semanalmente por 12 semanas com doses sub-letais (menos do que 1/3- grupo G5- ou 1/6- grupo G2,5- da DL50) do organofosforado metamidofós. Foi observado o aumento no peso do coração e hipertrofia de fibras musculares cardíacas nos animais tratados; a média do menor diâmetro dos miócitos cardíacos dos animais controle foi de  $64,93 \pm 5,82$  micra e nos tratados foi respectivamente de  $82,24 \pm 12,39$  (G2,5) e  $88,88 \pm 10,19$  (G5), havendo diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle e cada um dos grupos tratados. Sabe-se que a hipertrofia muscular esquerda é um dos principais fatores associados à disfunção cardiovascular. Embora não tenha sido estudado a função cardiovascular, é possível que a exposição experimental mais prolongada a organofosforados possa causar insuficiência cardíaca. Este fato tem uma importância maior no contexto de que a exposição inadvertida e prolongada a esses compostos seja comum em alguns países, incluindo o Brasil.

**Palavras-chave.** músculo cardíaco, organofosforado, inibidores da colinesterase, insuficiência cardíaca, morfologia, morfometria.

### ABSTRACT

Organophosphate can be responsible for causing acute intoxications, and in inducing delayed effects. Effects on the cardio-vascular system after long-term exposition to organophosphate have not been described, so far. The objective of the present study was to study whether these effects on heart could be caused by these compounds contact. Adult male Wistar albino rats, divided into groups, received weekly an enteral sub-lethal dose of organophosphate methamidophos for 12 consecutive weeks. Then, their hearts were examined by means of histological and morphometric methods. Hypertrophy of cardiac muscle cells in treated animals was observed, and this finding was confirmed by means of morphometric methods, that is, the measurement of smallest diameter of cardiac muscular cells. The mean value of the smallest diameter of cardiac myocytes from controls was  $64.93 \pm 5.82\mu\text{m}$ , and from two treated animals groups was  $82.24 \pm 12.39\mu\text{m}$  and  $88.88 \pm 10.19\mu\text{m}$ , respectively. Although the functional consequences of cardiac hypertrophy were not the object of the present study, the 3 month-treated animals did not show any sign of heart failure. However, it could not be disregarded that long term exposition to organophosphate might cause any functional cardiac disorder, including heart failure. These heart histology alterations are relevant, as Brazilian people are frequently undergo to long-term exposure to these compound with deleterious results.

**Key words.** muscle cardiac, organophosphate, cholinesterase inhibitors, heart failure, morphology, morphometry.

## INTRODUÇÃO

Em nosso ambiente somos frequentemente expostos a substâncias nocivas como compostos organofosforados. Estas substâncias são anticolinesterásicos amplamente utilizados como pesticidas na lavoura e em domicílios, ambientes nos quais o ser humano pode permanecer exposto a estes compostos. A intoxicação ocorre pela exposição acidental ou em tentativas de suicídio. A intoxicação aguda desencadeia uma síndrome clínica por hiperestimulação do sistema nervoso autônomo, predominando sintomas relacionados à atividade parassimpática e de forma menos intensa a sintomas do sistema nervoso autônomo simpático incluindo taquicardia e hipertensão arterial sistêmica<sup>1</sup>. Além da intoxicação aguda, os organofosforados podem ser responsáveis por outras situações mórbidas incluindo a chamada síndrome intermediária e a síndrome de neurotoxicidade retardada. Já os sintomas decorrentes da síndrome intermediária e a síndrome de neurotoxicidade retardada estão relacionados ao comprometimento do sistema nervoso central e periférico<sup>2-9</sup>.

Os sintomas decorrentes da intoxicação ou exposição crônica aos organofosforados incluem depressão, comprometimento cognitivo e aumento do risco de suicídio<sup>7,8,10-12</sup>. Em ratos foi descrito comportamento anormal após exposição ao organofosforado clorfenvifos, com diminuição da atividade exploratória e locomotora<sup>9</sup>.

Os efeitos a longo prazo no sistema cardio-circulatório decorrentes da exposição prolongada aos organofosforados são pouco conhecidos. O presente trabalho investigou as alterações morfológicas no coração de ratos após a exposição ao organofosforado metamidofos por tempo prolongado.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Três grupos de ratos albinos adultos (com seis-animais em cada) pesando aproximadamente 300 g foram utilizados para o experimento. Os animais foram pesados no início e ao final do experimento e tratados com 12 doses consecutivas, semanais do organofosforado metamidofos (O,S-dimetylphosphoramidotioate). A DL50 oral dessa substância para ratos foi previamente calculada em 18mg/kg de peso corporal. Os animais permaneceram em jejum 12h antes de cada administração e foram tratados respectivamente com 2,5 (grupo G2,5) ou 5mg grupo (G5) de metamidofos, em cada dose. Essa substância foi previamente diluída em glicerofornol na proporção de 3,125mg/ml para o grupo G2,5 ou 6,25 mg/ml para o grupo G5,0. Concomitantemente, grupo A de seis animais recebeu apenas glicerofornol pela mesma via, tendo sido mantidos nas mesmas condições que os ratos tratados.

Após cada administração os animais foram observados por 12 horas para a detecção de sintomas de intoxicações como fasciculações, tremores e convulsões,

característicos das intoxicações agudas por organofosforados. Após 24 h os animais foram submetidos à leve sedação com cloridrato de ketamina e coletado o sangue do plexo peri-orbitário com pipeta Pasteur. A atividade da colinesterase plasmática foi medida nos três grupos de animais empregando o método colorimétrico de Ellman<sup>13</sup>, modificado por Wilhelm<sup>14</sup>, usando a acetiltiocolina como substrato nos três grupos de animais. Essa atividade foi expressa em  $\Delta E/ml/min$  a um comprimento de onda de 430 nm. Os dados foram submetidos à análise estatística do teste de Kruskal-Wallis e de Turkey Kramer.

Os animais foram eutanasiados por exposição a altas doses de cloridrato de ketamina, 8 dias após a última administração do organofosforado (numero do protocolo da comissão de bioética: 15/05). Os corações foram imediatamente dissecados, pesados e um corte transversal foi feito na porção média dos ventrículos. O segmento inferior foi fixado em paraformaldeído e incluído em parafina realizando-se a seguir cortes histológicos de quatro micra de espessura, em micrótomo. Os cortes histológicos foram colhidos em lâminas de vidro e corados pelo método da hematoxilina-eosina.

O segmento superior foi imediatamente congelado em isopentano previamente resfriado em nitrogênio líquido. Cortes transversais destes materiais foram realizados em micrótomo criostato (espessura de seis micra) também corados pela hematoxilina-eosina.

## Morfometria

Estudos morfométricos foram realizados no material congelado, neste a retração de tecido, que é normalmente observada em material fixado em formol, é evitada. Imagens tomadas ao acaso das secções obtidas em criostato foram captadas por um microscópio óptico acoplado a uma câmera digital e a um computador com um sistema de análise de imagens. As imagens foram salvas e foi medido o diâmetro real (menor diâmetro) de 100 fibras musculares cardíacas tomadas ao acaso (100 fibras musculares cardíacas do ventrículo esquerdo de cada animal). Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística pelo teste de Kruskal-Wallis e teste de comparação múltipla de Dunn.

## RESULTADOS

Não foi observada diferença no ganho de peso entre os três grupos ( $p > 0,05$  teste de Kruskal Wallis) de animais submetidos ao tratamento.

Observou-se diminuição na atividade da colinesterase plasmática nos animais tratados em relação aos controles. A atividade da colinesterase plasmática nos animais controle foi de  $0,079 \pm 0,009$  e nos grupos tratados foi de  $0,047 \pm 0,011$  (G2,5) e  $0,044 \pm 0,003$  (G5). Houve diferença estatística entre o grupo controle e os grupos tratados ( $p < 0,001$ -teste de Kruskal-Wallis). No entanto não

foi observada diferença estatística entre os grupos tratados (G-2,5 e G-5,0,  $p < 0,05$ - teste de Turkey Kramer).

Quanto aos sintomas da intoxicação foram observados tremores e fasciculações exclusivamente no grupo G-5,0 no período que se seguiu apenas à 1ª administração do organofosforado.

A média de peso dos corações controle foi de  $0,96 \pm 0,017$ , sendo maior nos animais tratados: no grupo G2,5 foi de  $1,13 \pm 0,103$  e no grupo G-5,0 foi de  $1,15 \pm 0,112$ . Observamos diferença estatística entre o grupo controle e cada um dos grupos tratados ( $p < 0,05$ - teste de Kruskal-Wallis).

### Histologia e Morfometria

Não se observou necrose ou inflamação no coração dos ratos controles ou tratados (Figura 1). Havia, no entanto, pela análise qualitativa, aparente hipertrofia de miócitos cardíacos nos grupos tratados, nas secções de criostatos corados pela Hematoxilina-eosina. Esta hipertrofia foi confirmada por estudos morfométricos. A média do menor diâmetro dos miócitos cardíacos dos animais controle foi de  $64,93 \pm 5,82$  micra, o do grupo G-2,5 foi  $82,24 \pm 12,39$ , e a do grupo G-5,0 foi de  $88,88 \pm 10,19$ . Observamos diferença estatística entre os grupos controle e cada um dos grupos tratados (teste de comparação múltipla Dunn -  $p < 0,001$  para ambos os grupos tratados). Não houve, porém diferença entre os grupos tratados pelo teste de Dunn ( $p > 0,05$ ). (Tabelas)

**Tabela 1.** Atividade de colinesterase plasmática após 24 horas da primeira administração, expressada como  $\Delta E/mL/min$ , 430 nm comprimento de onda ( $\Delta E =$  variação de absorbância). Havia diferenças estatísticas entre o grupo controle e o grupo G2,5 ( $p < 0,001$ ), e entre o controle e o grupo G5,0 ( $p < 0,001$ ). Não houve diferença estatística entre o grupo G2,5 e G5,0 ( $p > 0,05$ ) (ANOVA e teste de comparação múltipla Turkey-Kramer).

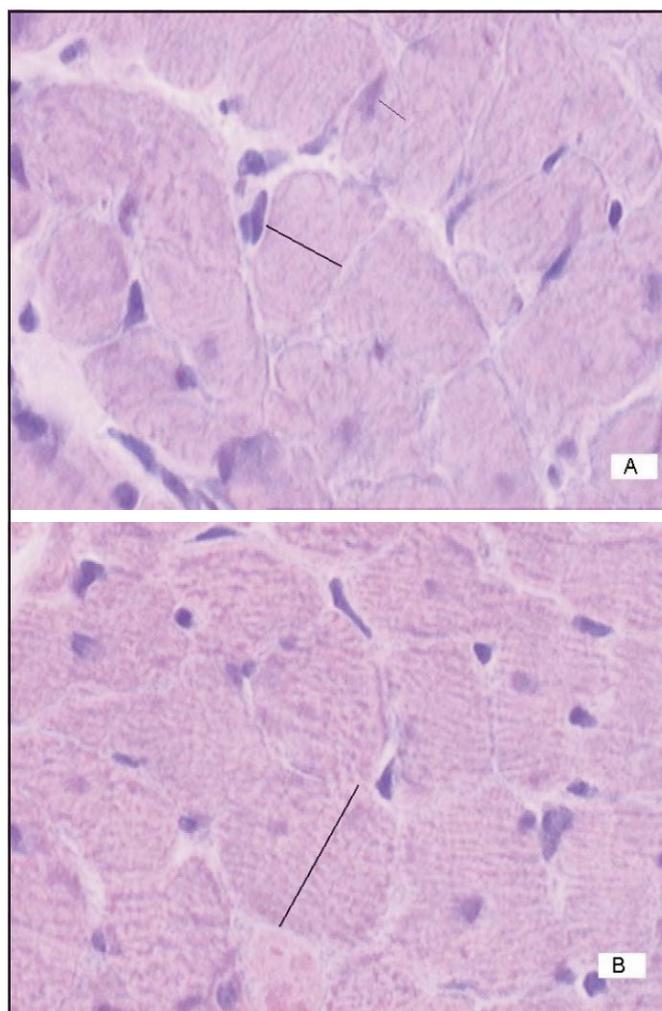
	Controle	G2,5	G5,0
Atividade de colinesterase (Média $\pm$ desvio padrão)	$0,079 \pm 0,009$	$0,047 \pm 0,011$	$0,044 \pm 0,003$

**Tabela 2.** A tabela mostra o peso dos corações (miligramas) de animais tratados e dos animais controles. Houve diferença estatística entre os pesos dos corações do controle e do grupo G2,5 e entre o controle e o grupo G5 ( $p < 0,05$ ). Não houve diferença estatística entre o grupo G2,5 e G5 ( $p > 0,05$ ). (teste não paramétrico Kruskal-Wallis ANOVA).

Grupo controle (Média $\pm$ desvio padrão)	G2,5	G5
$0,96 \pm 0,017$	$1,13 \pm 0,103$	$1,15 \pm 0,112$

**Tabela 3.** Essa tabela compara a média do menor diâmetro (micrômetros) dos miócitos cardíacos de ratos tratados com o organofosforado metamidofós durante três meses, assim como os controles. Diferença estatística foi observada entre o grupo G2,5 e o controle (teste de comparação múltipla de Dunn,  $p < 0,001$ ), entre o grupo G5 e o controle (teste de comparação múltipla de Dunn,  $p < 0,001$ ), mas não entre os grupos tratados, entretanto o diâmetro médio dos miócitos cardíacos do grupo G5 eram maiores do que os do grupo G2,5. (Teste estatístico de Kruskal-Wallis KW=27.293,  $p < 0,001$ ).

	Controle	G2,5	G5
(Média $\pm$ desvio padrão)	$64,93 \pm 5,82$	$82,24 \pm 12,39$	$88,88 \pm 10,19$



**Figura 1.** Representação histológica do coração de ratos do grupo controle (A) e ratos tratados com o organofosforado metamidofós durante 12 semanas consecutivas com 5 mg/kg do peso corporal (B). Coloração pela Hematoxilina-eosina x280- fragmento de coloração congelado em isopentano, previamente resfriado em nitrogênio líquido.

### DISCUSSÃO

Embora existam numerosos trabalhos referentes às síndromes agudas induzidas por organofosforados o mesmo não é verdadeiro quanto à exposição prolongada a esses compostos.

No entanto, atualmente já existem evidências de que esses efeitos tenham importância para saúde humana, animal ou ambiental.

No presente trabalho por estudos morfométricos, observou-se que a exposição ao organofosforado metamidofos provoca hipertrofia de fibras musculares cardíacas de ratos. Esta hipertrofia cardíaca, no entanto, não pode ser facilmente explicada. Embora tenha sido documentada hipertensão arterial sistêmica nas intoxicações agudas por anti-colinesterásicos<sup>15-17</sup> decorrente da hiperatividade simpática que ocorre em menor relevância nas intoxicações por organofosforados, não se observaram sequer sintomas persistentes de hiperatividade colinérgica, que sabidamente preponderam sobre as atividades simpáticas. Portanto, esta hipótese está praticamente descartada que a hipertrofia cardíaca seja decorrente da ação direta dos organofosforados, induzindo talvez, a produção de fatores de crescimento que atuem nas células musculares cardíacas devendo ser objetivo de estudos ulteriores.

A hipertrofia cardíaca é um fenômeno complexo que envolve muitas vias bioquímicas incluindo a ação de moléculas como a calcineurina<sup>18</sup>, aumento da expressão do mRNA do NAT1<sup>19</sup>, aumento de cardiotrofina<sup>20</sup>. Visto que há necessidade de esclarecimento dos mecanismos de hipertrofia cardíaca na intoxicação por organofosforados, esses aspectos deverão ser abordados também nesta situação.

Sabe-se que a hipertrofia muscular esquerda é um dos principais fatores associados à disfunção cardiovascular. Embora não tenha sido observado nos animais indícios de disfunção cardíaca, não podemos descartar que a exposição experimental mais prolongada a organofosforados possa resultar em insuficiência cardíaca, sendo bastante provável que o mesmo seja verdadeiro para outros mamíferos como o homem. Este fato tem uma importância maior ainda dentro do contexto de que a exposição inadvertida e prolongada a estes compostos é comum em alguns países, incluindo o Brasil.

## REFERÊNCIAS

1. Gordon CJ, Padnos BK. Prolonged elevation in blood pressure in the unrestrained rat exposed to chlorpyrifos. *Toxicology*. 2000; 146(1): 1-13.
2. Cavanagh JB. The toxic effects of tri-ortho-cresyl phosphate on nervous system; an experimental study in hens. *J Neurol Neurosurg Psychiatr*. 1954; 17:163-72.
3. Sprague GL, Bickford AA. Effect of multiple diisopropylfluorophosphate injections in hens: a behavioral biochemical and histological investigation. *J Toxicol Environ Health*. 1981; 8 (5-6): 973-88.
4. Johnson MK. Organophosphates and delayed neuropathy - Its NTE alive and well? *Toxicol Appl Pharmacol*. 1990; 102(3):385-99.
5. Lotti M. The pathogenesis of organophosphate polyneuropathy. *Crit. Rev Toxicol*. 1992 1; 21(6):465-87.
6. Rosenstock L, Keifer M, Daniell WE, Mc Monnell R, Claypoole K. The Pesticide Health Effects Study Group. Chronic central nervous system effects of acute organophosphate pesticide intoxication. *Lancet*. 1991; (8761)338:223-37.
7. Levin HS, Rodnitzky RL. Behavioral effects of organophosphate in man. *Clin Toxicol*, 1976; 9(3): 391-403.
8. Kamiya H, Okumura K, Ito M, Saburi Y, Tomida T, Hayashi K, Matsui H, Hayakawa T. Calcineurin inhibitor attenuates cardiac hypertrophy due to energy metabolic disorder. *Can J Cardiol*. 2001; 17(12): 1292-8.
9. Socko R, Gralewicz S, Gorny R. Long-term behavioral effects of a repeated exposure to chloropheniphos in rats. *Int Occup Med Environ Health*. 1999; 12: (2): 105-17.
10. Etri MM, Nickell WT, Ennis M, Skau K, Shipley MT. Brain nor epinephrine reductions in soman-intoxicated rats: association with convulsions and Ache inhibition, time course, and relation to other monoamines. *Exp Neurol*. 1992; 118(2): 153-63.
11. Britt, JO, Martin JL, Okerberg CV, Dick EJJr. Histopathologic changes in the brain, heart and skeletal muscle of Rhesus Macaques, ten days after exposure to soman n organophosphorus nerve agent. *Comp Med*. 2000; 50(2): 133-9.
12. Kassa J, Koupilová M, Herink J, Vachek J. Long-term influence of low-level sarin exposure on behavioral and neurophysiological functions in rats. *Acta Medica*. 2001; 44(1): 21-7.
13. Ellman GL, Coutney KD, Andres VJr. Feather-Stone RM. A new rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol*. 1961; 7:88-95.
14. Wilhelm K. Determination of human plasma cholinesterase activity by adapted Ellman method. *Arh Hig Rad Tokskol*. 1967; 19:199-207.
15. Saadeh AM, Farsakh NA, al-Ali MK. Cardiac manifestations of acute carbamate and organophosphate poisoning. *Heart*. 1997; 77(5): 461-4.
16. Smith EC, Padnos B, Gordon CJ. Peripheral versus central muscarinic effects on blood pressure, cardiac contractility, heart rate, and body temperature in the rat monitored by radiotelemetry. *Pharmacol Toxicol*. 2001; 89(1):35- 42.
17. Yen DH, Yen JC, Len WB, Wang LM, Lee CH, Chan SH. Spectral changes in systemic arterial pressure signals during acute mevinphos intoxication in the rat. *Shock*. 2001; 15(1): 35-41.
18. Kamiya H, Okumura K, Ito M, Saburi Y, Tomida T, Hayashi K, Matsui H, Hayakawa T. Calcineurin inhibitor attenuates cardiac hypertrophy due to energy metabolic disorder. *Can J Cardiol*. 2001; 17(12): 1292-8.
19. Sangaralingham SJ, Pak BJ, Tse MY, Angelis E, Adams MA, Smallegange C, Pang SC. Expression of the translational repressor NAT1 in experimental models of cardiac hypertrophy. *Mol Cell Biochem*. 2003; 245 (1-2): 183-90.
20. Freed DH, Moon MC, Borowiec AM, Jones SC, Zahradka P, Dixon IM. Cardiotrophin-1: expression in experimental myocardial infarction and potential role in post-MI wound healing. *Mol Cell Biochem*. 2003; 254 (1-2): 247-56.

# Avaliação dos exames laboratoriais para o diagnóstico das meningites infecciosas no estado de Sergipe, durante o período de 1997 a 2003

Assessment of the laboratorial examinations for diagnosing infectious meningitis performed in the Sergipe state, during the period from 1997 to 2003

RIALA6/1093

Antonio M. BARBOSA JUNIOR\*<sup>2,3</sup>, Dângelly L. F. M. de MÉLO<sup>3</sup>, Patrícia O. SANTOS<sup>3</sup>, Maria de Fátima TRAVÁLIA<sup>1</sup>, Rita de C. TRINDADE<sup>3</sup>.

\*Endereço para correspondência: Av. Marechal Rondon, s/n Jardim Rosa Elze. CCBS/DMO, 145, sala 15. São Cristóvão, Sergipe. CEP: 49100-000. Telefone: 79 3212 6628. E-mail para contato: amjunior@ufs.br

<sup>1</sup>Laboratório de Micologia, Instituto Parreiras Hortas, LACEN/SE.

<sup>2</sup>Bolsista de Iniciação Científica Pibic/CNPq.

<sup>3</sup>LMA, Laboratório de Microbiologia Aplicada, UFS, Universidade Federal de Sergipe.

Recebido: 07/11/2005 – Aceito para publicação: 15/12/2006

## RESUMO

As meningites infecciosas continuam a ocorrer no país com alta incidência e elevados índices de mortalidade, apesar da existência de programas de prevenção da doença e dos avanços na tecnologia empregada na detecção dos microrganismos envolvidos. O exame laboratorial do líquido cefalorraquidiano (LCR) é a base para efetuar o diagnóstico e para introdução de tratamento eficaz ao paciente. Na rotina laboratorial, são utilizados para o diagnóstico: exame microscópico, cultura e pesquisa de antígeno. Visando conhecer a eficiência e a capacidade de resposta, bem como para efetuar a correlação das referidas técnicas laboratoriais com os dados clínicos, este trabalho investigou 510 fichas de registros de pacientes com suspeita de meningite, atendidos pelo Serviço Único de Saúde, que deram entrada no período de 1997 a 2003, no Laboratório Central de Saúde Pública no estado de Sergipe, no Instituto Parreiras Horta. Foi realizada a análise de frequências absolutas dos testes utilizados no diagnóstico das meningites infecciosas. Os dados mostram uma diminuição, nos últimos anos, da porcentagem de confirmação de diagnóstico de meningite por meio de cultura, fato que pode ser observado em pesquisas realizadas em outros laboratórios do Brasil. Em contrapartida, verifica-se um aumento expressivo no número de paciente com meningites confirmado por meio de bacterioscopia, utilizando-se a coloração de Gram. Os resultados apresentados confirmam a importância do diagnóstico rápido e preciso que ofereça vantagens clínicas significativas para o emprego da terapia antimicrobiana adequada e acompanhamento da evolução da doença.

**Palavras-chave.** diagnóstico microbiológico, meningite infecciosa, Sergipe.

## ABSTRACT

High incidences of infectious meningitis with high mortality index remains occurring in Brazil, despite of the prevention programs and significant advances in the microorganism identification technologies. The laboratorial examination of the cerebrospinal fluid (CSF) is fundamental for accomplishing an accurate diagnosis and for introducing adequate treatment. Microscopic examination, culture, and antigen detection have been used in laboratory routine. This study aimed to assess the techniques used in Sergipe in the period from 1997 to 2003 for infectious meningitis diagnosis. The 510 record sheets of patients with suspicion of meningitis, who had given entrance during that period in the Central Laboratory of Health Public - Instituto Parreiras Horta in the State of Sergipe, were analyzed. Analyzes on absolute frequencies of the tests used for infectious meningitis diagnosis was carried out. In the last years, a reduction in frequency of cases confirmed by culture has perceived. This fact has also been noticed in other Brazilian laboratories. On the other hand, a substantial increase in the number of cases confirmed

by bacterioscopy (Gram stain) has been observed. Efficient meningitis diagnosis provides significant clinical benefits for monitoring patients, introducing the antimicrobial therapy, and for disease evolution following-up.

**Key words.** Microbial diagnosis, infectious meningitis, laboratorial diagnosis.

---

## INTRODUÇÃO

As meningites infecciosas continuam ocorrendo em nosso meio com alta incidência e elevados índices de mortalidade, apesar de existirem programas de prevenção da doença e das técnicas avançadas de detecção dos microrganismos. A utilização do líquido cefalorraquidiano (LCR), dentre os vários materiais biológicos, tem se mostrado mais adequado para a realização de exames laboratoriais por favorecer diagnóstico preciso e confiável. O Ministério da Saúde<sup>1</sup> preconiza que para o diagnóstico das meningites sejam realizados, na rotina laboratorial, o exame microscópico, a cultura microbiana e a pesquisa de antígeno no LCR.

O exame microscópico do LCR (bacterioscopia ou exame direto) é valorizado por possibilitar a visualização rápida do agente etiológico, que é importante para a identificação presuntiva do microrganismo e para a confirmação do diagnóstico clínico<sup>1</sup>. O conhecimento precoce do agente é importante para a correta administração do antimicrobiano, como também, para fazer o diagnóstico diferencial entre meningite bacteriana e fúngica, crucial para o prognóstico. Erros na interpretação dos resultados na microscopia podem ocorrer, principalmente, se os microrganismos sofrerem alterações físico-químicas, decorrentes da administração prévia de antibióticos, capazes de alterar a estrutura da parede celular bacteriana e falsear os resultados da coloração de Gram<sup>2</sup>. Além disso, falhas operacionais podem possibilitar o desenvolvimento de bactérias contaminantes, oriundas, por exemplo, da pele do paciente, das mãos do operador ou mesmo dos tubos de coleta<sup>1</sup>.

Em relação ao cultivo de microrganismos, método considerado padrão ouro é importante se ter cuidado com o transporte e conservação do LCR, assim como na escolha dos meios de cultura, principalmente, porque os microrganismos causadores das meningites infecciosas são bastante sensíveis a alterações de umidade, calor e temperatura<sup>3</sup>. O Ministério da Saúde<sup>1</sup> salienta a importância do registro, na ficha do paciente, do volume de LCR semeado e se o mesmo fazia ou não uso de antimicrobianos antes da punção, fato que pode inibir o desenvolvimento microbiano *in vitro*<sup>1</sup>. É possível que a importância do volume esteja ligada à sensibilidade do teste, ou seja, às probabilidades de crescimento microbiano.

Recomendam-se os exames imunobiológicos (Latex e Contra-imunoeletroforese – CIE) como complemento ao diagnóstico das meningites infecciosas, na pesquisa de antígenos presentes no LCR<sup>1</sup>; a qualidade deste exame depende da qualidade

dos reagentes e dos anti-soros empregados na reação imunológica, principalmente para a detecção de *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae*.

Relatos de resultados falso-positivos devido a reações cruzadas entre gêneros e espécies bacterianas<sup>4,5</sup> justificam a importância do cuidado com a qualidade dos reagentes, bem como da correta interpretação dos resultados, durante a realização de técnicas imunológicas.

Após consultar todos os parâmetros recomendados pelo Ministério da Saúde para o diagnóstico das meningites infecciosas, o presente trabalho visou realizar um levantamento sobre a utilização das técnicas preconizadas para o diagnóstico das meningites infecciosas no Estado de Sergipe, no período de outubro de 1997 a junho de 2003, e correlacionar com o diagnóstico clínico obtido.

## MATERIAL E MÉTODO

No período de outubro de 1997 a junho de 2003, foram analisadas 516 fichas de pacientes com suspeita de meningite, atendidos pelo Serviço Único de Saúde (SUS) que deram entrada no Laboratório Central de Saúde Pública no Estado de Sergipe localizado no Instituto Parreiras Horta (LACEN/SE-IPH). A investigação foi realizada buscando levantar os dados acerca da realização e dos resultados disponibilizados pelos exames recomendados pelo Centro de Referência Nacional para Meningite no Instituto Adolfo Lutz – Ministério da Saúde<sup>1</sup>, a saber: imunobiológico, microscopia e cultura.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

No diagnóstico das meningites infecciosas tornam-se importantes, os procedimentos de coleta, transporte, e o processamento adequado da amostra de LCR, uma vez que este é um sítio caracteristicamente estéril, cuja colonização por qualquer microrganismo significa infecção grave. Portanto, punção lombar feita de modo asséptico seguido de rápido transporte dessa amostra clínica, agilidade no processamento da microscopia direta (coloração de Gram e Tinta da China) e cultivo microbiano, contribuem para um preciso diagnóstico e identificação correta do agente etiológico. Esses dados fornecem informações que podem ser utilizadas em estudos epidemiológicos das meningites infecciosas.

O diagnóstico baseado na bacterioscopia, ou exame direto depende do número de bactérias por mL de LCR não centrifugado, uma vez que a bacterioscopia só é sensível a partir de  $10^5$  bactérias/mL<sup>5</sup>. Dados da literatura revelam que, nesse método, o índice de erros de leitura é elevado<sup>2</sup>, e que quando comparados com os resultados obtidos pelo cultivo do microrganismo chega a representar 15%<sup>6</sup>.

Quando há necessidade de um processamento diferenciado do material biológico (como a técnica utilizada para o cultivo de *Mycobacterium tuberculosis*), além dos critérios acima citados torna-se fundamental a proximidade entre o local da coleta e o laboratório de processamento, pois, por se tratar de um microrganismo altamente contagioso, de desenvolvimento lento cujo cultivo só é realizado nos laboratórios de referência em micobactérias, quanto mais imediata for a sementeira, menor a exposição do corpo técnico, e menores os riscos de contaminação e perda de viabilidade do microrganismo. Além disso, de maneira geral, quanto menor o tempo e a distância entre a punção e a sementeira do líquido nos meios de cultura, maior o índice de detecção exata do microrganismo causador. Por isso, atualmente, os laboratórios de meningites estão sendo montados anexos ao Hospital Central de cada município que atendem todos ou quase todos os pacientes com suspeita clínica de meningite.

Vale destacar também a importância da qualificação e capacitação da equipe técnica e da padronização dos protocolos para garantir a detecção rápida presuntiva e diferencial do

agente etiológico pelas técnicas de coloração, já que o cultivo desses agentes leva de 24 a 72 horas (exceção do *Mycobacterium tuberculosis* que necessita de aproximadamente 45 dias para o seu crescimento). Outro ponto crítico é a ocorrência generalizada de terapia antibacteriana ou antifúngica instituída nos pacientes antes da realização da punção o que dificulta e até inviabiliza o cultivo microbiano comprometendo, conseqüentemente, a precisão e acuidade do diagnóstico definitivo como preconiza o Ministério da Saúde.

Devido a esses fatores citados, o levantamento realizado sobre os resultados disponibilizados pelo LACEN-SE entre 1999 e 2003, referentes ao diagnóstico dos agentes etiológicos causadores da meningite infecciosa, apresentaram diferenças nos três métodos investigados: cultura, exame direto e imunobiológico.

A Tabela 1 apresenta os dados obtidos. Pode-se observar que dos 510 casos clínicos registrados no LACEN-SE com suspeita clínica de meningite, todos foram confirmados pelo exame direto (100%), 467 por cultura, o que representa 91,5% e 496 pelo exame imunobiológico (97,2%). Os dados revelam que, no período, houve um aumento de 10% na confirmação de casos pela bacterioscopia, utilizando-se a coloração de Gram, e que todos os casos confirmados pelo exame direto foram, em última análise, confirmados pela cultura ou pelo teste imunobiológico. Foi registrado também, no período, uma queda (de 118 em 1997 a 16 em 2003) na confirmação do diagnóstico por cultura.

**Tabela 1.** Frequência de agentes etiológicos diagnosticados pelo exame direto, cultura e exame imunobiológico em pacientes com meningite infecciosa, no Estado de Sergipe, no período de outubro de 1997 a junho de 2003, no LACEN/SE – IPH.

Agente Etiológico	Sorogrupo/ Sorotipo	1997			1998			1999			2000			2001			2002			2003		
		ED	C	IB	ED	C	IB	ED	C	IB	ED	C	IB	ED	C	IB	ED	C	IB	ED	C	IB
<i>N. meningitidis</i>		52	66		22	39		30	40	32	31	26	31	21	16	21	14	11	17	2	2	4
	A			1			1			2			2			2						2
	B			40			26			29			28			21			14			4
	C			4			1			1			3			0			3			0
<i>S. pneumoniae</i>	-	14	10	13	28	14	25	38	22	31	36	18	26	16	10	1	14	7	14	3	4	7
<i>H. influenzae</i>	B	46	33	26	28	19	21	42	42	28	18	14	11	4	2	1	2	2	2	2	2	2
BGN não fermentador	-	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	1	z	z	4	z
<i>S. aureus</i>	-	z	2	z	z	2	z	1	2	z	z	1	z	2	z	z	z	4	z	z	z	z
Enterobactérias	-	z	z	z	z	1	z	2	6	2	1	3	z	6	12	z	z	3	z	3	4	z
<i>M. tuberculosis</i>	-	z	z	z	1	1	1	z	z	z	1	1	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z
<i>C. neoformans</i>	-	3	3	3	z	1	z	3	1	z	2	1	z	6	6	z	7	2	z	2	1	z
<i>Candida</i> sp.	-	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	z	1	z	z	z	z
Outros agentes etiológicos	-	z	4	z	1	1	z	z	z	z	8	1	1	z	3	z	z	z	z	z	z	z
<b>Total</b>		<b>115</b>	<b>118</b>	<b>87</b>	<b>80</b>	<b>78</b>	<b>75</b>	<b>116</b>	<b>113</b>	<b>125</b>	<b>97</b>	<b>65</b>	<b>100</b>	<b>55</b>	<b>49</b>	<b>44</b>	<b>37</b>	<b>29</b>	<b>50</b>	<b>10</b>	<b>15</b>	<b>15</b>

ED: exame direto; C: cultura; IB: exame imunobiológico; BGN: bacilo gram negativo; z: dados ausentes

Este fato que pode ser observado em pesquisas realizadas em outros laboratórios do Brasil<sup>1</sup>. É possível que esses resultados estejam relacionados com a melhora da qualidade do serviço, no que diz respeito a otimização da comunicação entre o atendimento, ambulatorial ou de urgência e o laboratório, diminuindo os casos de administração de antimicrobianos previamente a punção, melhor assepsia durante a punção lombar e a implantação de cuidados como sementeira imediata, qualidade dos meios de cultura dentre outros, fruto da qualificação do corpo técnico do Laboratório Central de Saúde Pública de Sergipe realizado em 1999. Outro fato com o qual se pode relacionar a melhor disponibilização dos dados a partir de 1999 é a implantação da ficha de exame do LCR. Os dados foram, desde então, organizados e padronizados, o que nos permite tabulá-los e compará-los. A melhor performance do exame direto, obtida nesse levantamento, no entanto, discorda da literatura, que não só o cita como menos sensível como revela que o índice de erros de leitura é elevado, devendo-se esperar melhores resultados da cultura<sup>2,6</sup>.

É possível ainda que a menor sensibilidade da cultura esteja atrelada à administração de antimicrobianos antes da punção líquórica do paciente, pois apesar da melhor comunicação entre os diferentes serviços, isto ainda acontece em função da precariedade de algumas unidades básicas de saúde instaladas em cidades pequenas, longe dos laboratórios de referência ou sem disponibilidade de neurocirurgiões de plantão para realizar a punção líquórica. No caso específico dos portadores do vírus HIV, os antimicrobianos estão inseridos nos coquetéis administrados quando o número de linfócitos TCD4 atinge níveis muito baixos, independente da presença de sintomas. Tal conduta clínica pode levar à baixa positividade da cultura (padrão ouro) por inviabilizar o crescimento microbiano<sup>7,8</sup>.

Pode-se verificar também que de 2001 a 2003 não houve confirmação de casos de meningite por *H. influenzae* em Sergipe, o que pode ser atribuído à vacinação em massa realizada em 1999. Paralelamente, ocorreu um aumento na detecção de outros agentes etiológicos, principalmente *S. aureus* e *C. neoformans*. Das 467 culturas positivas do período, 200 (43,2%) foram identificadas como *N. meningitidis*, 110 (21%) como *H. influenzae*, 85 (18%), *S. pneumoniae*, 29 (6,2%) Enterobactérias e 14 (3,2%) *C. neoformans*. Somente dois casos de meningite tuberculosa foram registrados, sendo confirmado pela cultura do bacilo álcool ácido resistente.

Tais resultados apresentam-se em concordância com dados mundiais em relação à prevalência de *N. meningitidis* (43,2%). Isolados de *N. meningitidis* dos sorogrupos A, B e C, são responsáveis por mais de 90% dos casos de meningites bacterianas associados a surtos, endemias e epidemias<sup>7</sup>. O sorogrupo A predomina na África, sendo responsável por ondas epidêmicas, enquanto B e C prevalecem em países desenvolvidos ou em desenvolvimento, estando assim, associados, principalmente, a surtos esporádicos e epidemias<sup>8</sup>. Alguns autores relatam a predominância do sorogrupo A<sup>9,10</sup>.

Outro aspecto relevante foi a prevalência de Bacilos Gram Negativos (BGN). Apesar do bom nível de detecção apresentado pelo serviço do Laboratório Central de Sergipe, esse dado reforça a necessidade de melhora na qualidade e rapidez das informações, cruciais para a qualidade do diagnóstico clínico e laboratorial, principalmente, para doenças de notificação compulsória.

A Tabela 1 apresenta também os resultados dos exames realizados através de testes imunológicos. Das 510 fichas analisadas no período, 496 informaram os dados da pesquisa de sorogrupos e sorotipos. Foi observada a prevalência do sorogrupo B de *N. meningitidis* e sorotipo B de *H. influenzae*, nesse caso o único sorotipo registrado. Nos últimos anos tais pesquisas continuam sendo realizadas nos casos onde há suspeita de *N. meningitidis*, *S. pneumoniae* e *H. influenzae*. Para *C. neoformans* deixou-se de realizar devido ao alto custo dos reagentes. Mesmo assim, o LACEN-SE rotineiramente faz apenas o teste do Látex para *N. meningitidis*. Os demais são encaminhados para o Laboratório Central de Referência em meningites de Recife, PE.

Vale ressaltar a importância da aliança entre a capacitação e a atualização dos profissionais envolvidos (tanto do ponto de vista clínico como laboratorial), na busca constante da melhora na acuidade e rapidez dos exames microbiológicos. Nesse particular, as técnicas que utilizam a biologia molecular disponibilizam mais rápida e especificamente os dados utilizados para o diagnóstico, como também informações epidemiológicas fundamentais sobre os agentes etiológicos que causam a meningite infecciosa, o que em última análise leva ao conhecimento da dinâmica da doença.

Dentre as técnicas moleculares disponíveis, as mais difundidas são as que fazem uso da amplificação dos genes alvo através da reação em cadeia da DNA polimerase – PCR. Desenvolvida em 1987 por Mullins e Faloona<sup>11</sup> a PCR vem sendo otimizada por vários pesquisadores de modo que atualmente tem-se uma variedade e propostas que vão desde reações *multiplex* com capacidade de amplificar, em uma única reação genes-alvo presentes nos principais agentes da meningite bacteriana<sup>12,13,14</sup>, até as reações que podem ser acompanhadas através de gráficos que disponibilizam, em tempo real a amplificação dos genes alvo sem a necessidade da eletroforese, em equipamentos e técnicas conhecidas como *real time PCR*<sup>15,16</sup>. No entanto, apesar dos resultados promissores no campo da pesquisa, e da realidade de outros países, ainda não se tem uma técnica molecular padronizada no Brasil para ser utilizada como rotina laboratorial pelo programa nacional de controle das meningites.

Neste sentido, reitera-se a importância da padronização das técnicas, treinamento do pessoal e centralização do controle, assim como se acredita na validade do investimento na implantação de técnicas moleculares como complementação ao diagnóstico tradicional.

Finalizando, um diagnóstico preciso oferece vantagens clínicas significativas para o direcionamento da terapia

antimicrobiana e para a evolução da doença, como também pode ser o primeiro passo na elucidação da sua dinâmica em determinada região, informação esta que, por sua vez, pode ser utilizada como base para as discussões que envolvem propostas de programas de controle.

### CONCLUSÃO

Este trabalho mostrou que o serviço realizado no LACEN-SE apresentou resultados compatíveis com aqueles disponibilizados pelos demais laboratórios de referência do país e que, no período e localidade investigados o exame direto por bacterioscopia foi o recurso laboratorial que apresentou maior correspondência com o diagnóstico clínico (100%/510), seguido de perto pelo exame imunológico (97,2%/496) e pela cultura (91,5%/467), padrão-ouro do diagnóstico laboratorial. Pode-se assim concluir ressaltando a importância da associação de métodos, do controle no transporte e recebimento do material clínico e do processamento imediato, bem como da necessidade de se buscar aumentar a acurácia da cultura e a padronização de técnicas mais precisas e rápidas como as moleculares, para assim, melhorar a precisão e a rapidez do diagnóstico das meningites infecciosas, disponibilizando assim, informações seguras para as investigações epidemiológicas.

### AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

Aos funcionários dos Laboratórios de Bacteriologia e de Micologia do Laboratório Central de Saúde Pública do Estado de Sergipe.

### REFERÊNCIAS

1. Ministério da Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica: meningites. Brasília/DF, 2002. 579-632.
2. Hyslop NE, Swartz MN. Bacterial meningitis. *Postgrad Med* 1975; 58(3):120-8, 1975.
3. Lennette EH, Ballows A, Hausler WJ, Shadomy HJ. Manual of clinical microbiology. American Microbiology Society, 4<sup>th</sup> edition, Washington DC, 1985. 1149p.
4. Geiseler PJ, Nelson KE, Levin S, Reddi KT, Moses VK. Community acquired purulent meningitis: a review of 1.316 cases during the antibiotic era, 1954-1976. *Rev Infect Dis* 1980; 2(5): 725-44.
5. La Scolea LJ Jr., Dryja D. Quantitation of bacteria in cerebrospinal fluid and blood of children with meningitis and its diagnostic significance. *J Clin Microbiol* 1984;19(2): 187-90.
6. Jones RG. Bacterial meningitis. Part I Incidence and diagnosis. *S Afr Med J*. 1967; 41: 75-9.
7. Peltola H. Meningococcal disease: still with us. *Rev Inst Dis* 1994; 5: 71-91.
8. Virgi M. Meningococcal disease: epidemiology and pathogenesis trends. *Microbiol* 1983; 4: 466-70.
9. Kumar P, Verma IC. Antibiotic therapy for bacterial meningitis in children in developing countries. *Bul of the WHO* 1993; 71: 183-8.
10. Stocco JM, Porfírio FMV, Carvalho VO, Nunes FF, Santos NNQ. Campos CEOP, Schimal MR, Kuschnaroff TM. Septicemia com púrpura por *Haemophilus influenzae* e sua semelhança com meningococcemia. In: XXVI Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Natal. p. 196, 1990.
11. Mullis KB, Faloona FA, Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase – catalysed. *Meth Enzymol* 1987; 155: 335-50.
12. Baethgen LF, Morales C, Weidlich L, Rios S, Knetzsch CI, Silva MS, Rossetti MLR, Zaha A. Direct-test PCR for detection of meningococcal DNA and its serogroup characterization: standardization and adaptation for use in a public health laboratory. *J Med Microbiol* 2003; 52: 793-9.
13. Bryant PA, Li HY, Zaia A, Griffith J, Hoog G, Curtis N, Carrapetis JR. Prospective study of a real-time PCR that is highly sensitive, specific, and clinically useful for diagnosis of meningococcal disease in children. *J Clin Microbiol* 2004; 42(7): 2219-26.
14. Pinner RW, Hassen RA, Powderly WG. Propescts for preveling cryptococosis in person infectedwith human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis* 1995; 21:103-7.
15. Powderly,WG. Recent advances in management of cryptococcal meningitis in patients with AIDS. *Clin Infect Dis* 1996; 22(2): 119-23.
16. Kaczmariski EB, Fox AJ, Edwards-Jones V, Borrow, R, Guiver, M, Corless, CE. Simultaneous detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae* in suspected cases of meningitis and septicemia using real time PCR. *J Clin Microbiol* 2001; 39(4): 1553-8.

# Cabine de segurança biológica: efeito da luz ultravioleta nas micobactérias

## Biological safety cabinet: ultraviolet radiation effect on mycobacteria

RIALA6/1094

Suely Yoko Mizuka UEKI<sup>1\*</sup>; Ana Livia GEREMIAS<sup>1</sup>; Letícia Lisboa MONIZ<sup>1</sup>; Fábio Oliveira LATRILHA<sup>1</sup>; Artemir Coelho de BRITO<sup>1</sup>; Carmen Maria Saraiva GIAMPAGLIA<sup>1</sup>; Fernanda Cristina dos Santos SIMEÃO<sup>1</sup>; Maria Alice Silva TELLES<sup>1</sup>.

\* Endereço para correspondência: <sup>1</sup> Instituto Adolfo Lutz, Divisão de Biologia Médica, Seção de Bacteriologia, Setor de Micobactérias. Av. Dr. Arnaldo, 351 9º andar CEP 01246-902, Cerqueira César, São Paulo, SP. E-mail: syueki@ial.sp.gov.br ou [satie@osite.com.br](mailto:satie@osite.com.br)

Recebido: 24/07/2006 – Aceito para publicação: 16/10/2006

### RESUMO

A cabine de segurança biológica (CSB) é o principal equipamento para efetuar a contenção de aerossóis produzidos nos procedimentos laboratoriais e a descontaminação com lâmpada UV, 15 minutos antes do início das atividades e 15 minutos após utilização da cabine é parte das boas práticas de laboratório. O objetivo deste estudo foi avaliar a ação da lâmpada UV da CSB classe II B2, em diversas espécies de micobactérias e correlacionar com o tempo de exposição. Cepas de referência foram subcultivadas, semeadas e incubadas a 37°C até produzir turvação compatível com o tubo 1 da escala de MacFarland. Foram semeados 100µL de suspensão bacteriana em placas com meio 7H11; as placas foram cobertas parcialmente com papel alumínio e expostas à radiação UV durante 5 e 10 minutos. Após exposição, os papéis foram retirados e as placas incubadas a 37°C por 30 dias. Todas as placas apresentaram inibição de crescimento de bactérias na porção da placa em que houve exposição direta à radiação UV. Os resultados obtidos mostraram que a prática de utilização da radiação UV por 15 minutos após o uso da cabine e antes de iniciar outra atividade técnica, garante descontaminação adequada da CSB. Esta prática de biossegurança é recomendável para descontaminar a própria CSB e os materiais que são retirados da cabine.

**Palavras-chaves.** cabine de segurança biológica, luz ultravioleta, micobactérias.

### ABSTRACT

Biological safety cabinet (BSC) is the major equipment which is the primary means of containment of infectious microorganisms aerosols generated from laboratory procedures, and the decontamination using ultraviolet radiation ; constitute a stage of Good Laboratory Practices. The objective of this study was to evaluate the effect of UV lamp of class II B2 cabinet on varied mycobacteria species and to correlate them with UV exposition time. Reference strains were subcultivated and incubated at 37°C until getting a turbidity equivalent to that of MacFarland 1 standard. From this bacterial suspension, 100µL were plated into 7H11 medium; the plates were partially covered with aluminium paper and exposed to UV radiation for 5 and 10 minutes. After UV exposition, the paper was removed and the plates were incubated at 37°C for 30 days. All plates showed no bacterial growth at the side exposed to the UV radiation, while a regular and abundant bacteria growth was observed at the other half part that was covered with paper. Switching on the UV lamp for 15 minutes after using the cabinet and for 15 minutes before starting any activity inside the cabinet guarantees proper decontamination. This biosafety practice is recommended to decontaminate the BSC and also materials that need to be withdrawn from the cabinet.

**Key words.** biological safety cabinet, UV radiation, mycobacteria.

## INTRODUÇÃO

Em biossegurança, a contenção diz respeito aos métodos de segurança utilizados na manipulação de materiais infecciosos dentro de um laboratório, com o objetivo de eliminar ou reduzir a exposição dos trabalhadores e do ambiente aos agentes potencialmente perigosos. Três elementos de contenção são importantes: as boas práticas de laboratório, a escolha do equipamento de segurança adequado e o projeto de instalação. A combinação desses três elementos vai depender da avaliação de risco do trabalho a ser desenvolvido. O elemento de contenção mais importante são as boas práticas de laboratório, com a conscientização sobre os riscos potenciais que o material oferece ao manipulador. Quanto aos equipamentos, a cabine de segurança biológica (CSB) é o principal, capaz de proporcionar a contenção de aerossóis e borrifos gerados nos procedimentos laboratoriais. As CSB são classificadas em I, II (tipos A, B1, B2 e B3) e III. A escolha dependerá dos procedimentos necessários à classe de risco dos agentes biológicos a serem manipulados<sup>1,2</sup>.

As instalações laboratoriais devem estar de acordo com as normas de biossegurança vigentes, contemplando a escolha da correta localização e a sinalização da área física destinada a tais atividades<sup>1</sup>.

Por isso, o planejamento, a correta construção das instalações e o conhecimento do risco de transmissão do agente a ser manipulado, contribuem para a proteção da amostra em relação a contaminantes, da equipe do laboratório e do meio ambiente.

*Mycobacterium tuberculosis* e outras espécies do gênero *Mycobacterium* são os principais agentes infecciosos manipulados no laboratório de micobactérias. Estes bacilos podem ser encontrados em amostras de escarro, lavado gástrico, secreção brônquica, líquido cefalorraquidiano, urina, tecidos, sangue, medula óssea e outros. As micobactérias são classificadas como agentes biológicos de classes de risco 2 e 3, conforme a espécie. O *M. tuberculosis* e o *M. bovis* (exceto BCG vacinal) pertencem à classe 3 e as outras micobactérias não tuberculosas à classe 2. A exposição no laboratório aos aerossóis contendo estes bacilos é o risco de maior grau<sup>1,3</sup>.

As boas práticas, os equipamentos de contenção e as instalações do nível de biossegurança 2 e 3 são indicados para a manipulação desses agentes e todas as atividades que formem aerossóis devem ser conduzidas em CSB classe II. As cabines de classe II (fluxo laminar vertical) possuem características especiais de fluxo de ar que proporcionam níveis de contenção que protegem o material sob análise, os funcionários do laboratório e o meio ambiente. A classe III oferece uma proteção máxima para os trabalhadores do laboratório, para a comunidade e para o meio. Atualmente, as cabines de classe I, estão sendo substituídas pela classe II<sup>4</sup>.

A maioria das CSB, além dos filtros HEPA e um sistema de direcionamento de ar, possuem uma lâmpada ultravioleta (UV) germicida. A constituição das lâmpadas germicidas é simples.

São lâmpadas fluorescentes comuns, sem a deposição de pó de vidro como cobertura interna, que seria responsável por transformar a radiação ultravioleta gerada pela lâmpada em luz visível. Sem essa cobertura a lâmpada emite apenas a radiação ultravioleta, capaz de matar microrganismos a ela expostos. Esta emite raios no comprimento de onda de 253,7nm, que é o comprimento com efeito bactericida<sup>5</sup>.

Os microrganismos atingidos pela radiação UV sofrem modificação no DNA ou RNA, pela formação de dímeros de pirimidina, que formados entre moléculas adjacentes, podem interromper a replicação ou a transcrição levando à morte da bactéria. Porém, a eficiência do uso da UV como um meio de descontaminação ainda é motivo de controvérsia já que a UV além de não penetrar em partículas, está limitada à distância entre a luz e o material exposto a ela, e ao tempo de exposição. Além disso, a exposição à UV é carcinogênica causando ceratoconjuntivite quando inadequadamente utilizada. Desta forma, a UV é frequentemente instalada em ambientes fechados, como por exemplo, dentro de CSB.

Este estudo foi realizado com o objetivo de avaliar a ação germicida da lâmpada de luz UV da CSB classe II B2 utilizada no Setor de Micobactérias do Instituto Adolfo Lutz, sobre culturas de oito espécies de micobactérias expostas a luz por 5 e 10 minutos.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram testadas cepas de referência de micobactérias patogênicas e aquelas potencialmente ou raramente patogênicas, identificadas na rotina laboratorial por métodos moleculares e fenotípicos: *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv ATCC 25618, *Mycobacterium chelonae* ATCC 35752, *Mycobacterium kansasii* ATCC 12478, *Mycobacterium gordonae* ATCC 14470, *Mycobacterium abscessus* ATCC 19977, *Mycobacterium flavescens* ATCC 14474, *Mycobacterium fortuitum* e *Mycobacterium avium*.

As cepas de micobactérias foram subcultivadas em 5ml de meio Middlebrook 7H9 e incubadas durante 7 a 10 dias a 37°C. Havendo crescimento após este tempo, cada suspensão foi diluída com água destilada estéril e a turvação comparada à escala de MacFarland 1. Foram semeados, 100µl da diluição 10<sup>-4</sup>, em placas de Petri com meio Middlebrook 7H11. A suspensão foi espalhada homogeneamente sobre o meio, com uma alça descartável de 10µl. As placas foram cobertas parcialmente (1/2) com papel de alumínio estéril e colocadas nos 4 cantos e no centro da área de trabalho da CSB e expostas à luz UV. As placas foram semeadas em duplicata e expostas na luz UV, sendo que uma série ficou durante 5 minutos e a outra série, durante 10 minutos. Concomitantemente, foram preparadas mais três placas da mesma cepa, sendo uma totalmente fechada com a própria tampa e duas abertas sendo estas também expostas à luz UV durante 5 e 10 minutos e colocadas no centro da área de trabalho da CSB. Foram

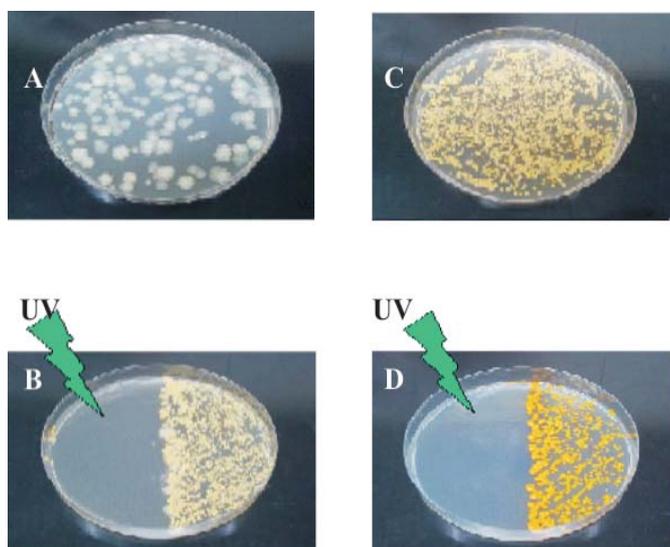
realizados esfregaços de todas as cepas e corados pela técnica de Ziehl-Neelsen para confirmar micobactérias ou contaminação.

Após a exposição à luz UV, os papéis de alumínio foram retirados das placas parcialmente cobertas e todas (exceto a que estava coberta com a própria tampa) foram tampadas e incubadas a 37°C. O crescimento das colônias nas placas foi observado durante 5 a 20 dias de incubação. Uma nova leitura foi realizada após 30 dias.

**Lâmpada germicida utilizada na CSB classe II B2:** lâmpada de ultravioleta de baixa pressão de vapor de mercúrio com potência nominal de 30W (marca Phillips) de aproximadamente 2000 horas/uso e colocada na parte posterior da CSB numa altura de  $\pm 50$  cm das placas.

## RESULTADOS

Todas as cepas semeadas nas placas com meio de Middlebrook 7H11 e expostas por 5 e 10 minutos, independente da localização em que foram colocadas dentro da CSB, tiveram o crescimento de micobactérias inibido pela luz UV (Figura 1). Ficou nitidamente visível o crescimento das colônias nas placas no lado em que as mesmas foram protegidas pelo papel de alumínio e a inibição total do crescimento no lado em que a mesma ficou exposta à luz UV. As placas totalmente expostas não apresentaram nenhum crescimento e as cobertas com a própria tampa apresentaram crescimento confluyente em toda superfície do meio em que foram semeadas.



**Figura 1.** Efeito da exposição à luz ultravioleta sobre a sementeira de micobactérias. Placas tampadas (A e C) e semi-cobertas (B e D) expostas por 10 minutos. A e B: *M. chelonae*; C e D: *M. kansasii*.

Todas as placas foram observadas a partir de 5 dias de incubação e mantidas até 30 dias, para garantir ausência de crescimento tardio das colônias de micobactérias de crescimento lento

## CONCLUSÃO E DISCUSSÃO

Pelos resultados obtidos nas condições do experimento, concluímos que a ação germicida da luz UV da CSB utilizada no Setor de Micobactérias do Instituto Adolfo Lutz sobre as micobactérias foi efetiva mesmo quando a exposição foi no mínimo de 5 minutos. A prática laboratorial do Setor é ligar a lâmpada UV por 15 minutos após utilização da cabine e 15 minutos antes de iniciar outra atividade, o que garante uma descontaminação adequada da área de trabalho da CSB, desde que se realize uma manutenção periódica e a vida média da lâmpada seja bem controlada.

Embora essa prática seja rotineira nos laboratórios que trabalham em condições de risco biológico devido à aerossóis foi desaprovada pela Portaria nº 930/92 do Ministério da Saúde<sup>6</sup>. Entretanto, os resultados sugerem que o uso da lâmpada UV deveria ser um requisito importante, juntamente com as boas práticas e descontaminação química nas atividades laboratoriais, pois seu custo é baixo e de fácil manutenção.

Portanto, os resultados obtidos neste estudo mostraram que após uma descontaminação química da CSB, com hipoclorito de sódio ou álcool etílico, para evitar contaminação cruzada ao manipular amostras contendo BAAR e cepas de diversas espécies de micobactérias, a utilização da lâmpada UV é uma prática recomendável visando:

- descontaminar a CSB no início e final das atividades laboratoriais.
- descontaminar a superfície dos materiais utilizados nestas atividades e que precisam ser retirados da CSB.

## REFERÊNCIAS

1. Brasil. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Biossegurança em laboratórios biomédicos e de microbiologia. Brasília, 2005.
2. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Diretrizes gerais para o trabalho em contenção com material biológico. Brasília, 2004.
3. Organización Panamericano de la Salud. Oficina Sanitária Panamericana, Oficina Regional de la Organización Mundial de la Salud. Cabinas de seguridad biológica: uso, desinfección y mantenimiento. 2002.
4. Ferreiros M. Cabines de segurança biológica. ([www.sbcc.com.br](http://www.sbcc.com.br)). *Rev Elet SBCC* 2001; 14: 16-225.
5. Mastroeni M.F. Biossegurança aplicada a laboratórios e serviços de saúde. São Paulo, Editora Atheneu, 2004.
6. Brasil. Leis, etc. Portaria nº 930, de 27 de agosto de 1992. Dispõe sobre normas para controle das infecções hospitalares. *Diário Oficial [da] União*, Brasília, Seção 1, pp. 12279-81, 04 de setembro de 1992.

---

## Frequência de anticorpos de *Leishmania* sp em *Rattus norvegicus* no município de Belo Horizonte, Minas Gerais

---

Neiva HM. **Frequency of *Leishmania* sp antibodies in *Rattus norvegicus* in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.** Belo Horizonte, MG 2005 [Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária - UFMG]. Orientador: Jenner Karlisson Pimenta dos Reis

---

A leishmaniose visceral americana (LVA) é uma doença parasitária transmitida por um protozoário denominado *Leishmania chagasi* através da picada da fêmea do mosquito hematófago dos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia*, tendo como principais reservatórios o cão e a raposa. Com objetivo de verificar a frequência de anticorpos de *Leishmania* sp em *Rattus norvegicus*, nos Distritos Sanitários (DS) da Pampulha, Venda Nova e Norte no Município de Belo Horizonte, Minas Gerais, utilizando técnicas sorológicas; foram coletadas amostras de sangue de 98 animais. Verificou-se uma reatividade de 27,6 % naquelas analisadas nos testes ELISA e RIFI e identificou-se o protozoário *Leishmania* em uma amostra analisada pela técnica Reação Cadeia de Polimerase (PCR). Os resultados obtidos, considerando os Distritos Sanitários, separadamente, foram de 29,3% para amostras referentes ao Distrito Sanitário Pampulha nos testes ELISA e RIFI, 21,0% no DS Venda Nova e 25,0 % na regional Norte. Estes resultados sugerem que os *R. norvegicus* podem ser um importante reservatório da LVA na Município de Belo Horizonte, Minas Gerais.

Dissertação disponível na Escola de Veterinária da UFMG  
referência e localização T636.089 69 N417f 2005  
Escola de Veterinária 619 N417f 2005BU- Memória  
E-mail: [jenner@coltec.ufmg.br](mailto:jenner@coltec.ufmg.br)

## Determinação de isoflavonas em formulações farmacêuticas

---

Yano HM. **Determination of isoflavones in pharmaceutical formulations** São Paulo, SP 2006. [Tese de Doutorado - Área de Produção e Controle Farmacêutico Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo –USP]. Orientadora: Erika Rosa Maria Kedor-Hackmann

---

Phytoestrogens are natural compounds of plants with estrogenic activity. They are being widely investigated in the prevention of chronic coronary diseases, in prostate and breast cancer, in the reduction of osteoporosis risk and relief of menopause symptoms. Among phytoestrogens already in use are daidzein, genistein and glycitein and they are present in complex matrix such as phytopharmaceuticals, plant extracts, capsules and tablets. These preparations require development and validation of methodologies for quantitative determination of isoflavones. The proposed methodologies include high performance thin layer chromatography (HPTLC) and high performance liquid chromatography (HPLC). The HPTLC coupled with densitometry can be used for quantitative analysis. The mobile phase constituted of ethyl acetate:hexane (8:2 v/v) was used to determine chromatographic profiles of isoflavone aglycones, daidzein, glycitein and genistein. The mobile phase constituted of ethyl acetate:toluene:formic acid (8:1:1 v/v/v) was used for determination of isoflavones glycosides and non-glycosides. For the quantitative determination of isoflavone glycosides with HPLC, an acid hydrolysis with 3M HCl and heating in water-bath for an hour was proposed as sample pretreatment step. The analytic determination of isoflavones daidzein, genistein, formononetin and biochanin A using HPLC was accomplished. The chromatography was carried out in isocratic mode with Chromolith<sup>®</sup>, a monolithic RP-18 column, (100x4.6mm) with mobile phase constituted of water:acetonitrile (6:4 v/v) operated at a flow rate of 0.6mL/min and detection was made at 260nm. The results showed method linearity with correlation coefficient of 0.9995 to daidzein, 0.9996 for genistein, 0.9997 for formononetin and 0.9999 for biochanin A. The precision and accuracy data presented satisfactory results. Good resolution and faster separation of compounds in pharmaceutical formulations were also obtained. The proposed method can be used in the routine analyses of phytopharmaceuticals in quality control laboratories.

Tese disponível na Biblioteca do  
Instituto Adolfo Lutz e  
na Biblioteca do Conjunto das Químicas  
E-mail [heleyano@ial.sp.gov.br](mailto:heleyano@ial.sp.gov.br)

# Interaction between poly (ethyleneglycol) and dioctadecyldimethylammonium and diododecyldimethylammonium bromide in aqueous solution

---

Santos CCM. **Interação de poli(etileno glicol) com brometo de dioctadecildimetilamônio e didodecildimetilamônio em dispersões aquosas.** São José do Rio Preto – SP, 2006. [ Tese de Doutorado – Área: Biofísica Molecular – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – Universidade Estadual Paulista ] Orientador: Dr. Eloi da Silva Feitosa

---

Poly (ethyleneglycol) (PEG) is a water soluble neutral polymer, and dioctadecyldimethylammonium (DODAB) and diododecyldimethylammonium (DDAB) bromide are double chain cationic surfactants derived from the quaternary ammonium that have been widely investigated due to their high application potential in different areas of the science and technology. The physical properties of PEG, DODAB and DDAB in aqueous solution are well-known. However, the properties of mixtures of the polymer with those surfactants are not. We investigated the interaction of PEG with DODAB and DDAB in aqueous solution, within a range of total concentration of the components of 0-1 wt%, and the phase diagrams built up, with special interest for the vesicular phases. We used PEG with molecular mass between 200Da and 2 MDa and the phase diagrams were built up at 25°C, that is, above the melting temperature ( $T_m$ ) of DDAB ( $T_m = 16^\circ\text{C}$ ) and below  $T_m$  of DODAB ( $T_m = 45^\circ\text{C}$ ). DODAB and DDAB have the common characteristic of forming unilamellar vesicles at low surfactant concentrations and multilamellar vesicles at higher concentrations; at intermediate concentrations, uni- and multilamellar vesicles coexist in solution. The borders of these different vesicle phases are not well defined. We observed in this Thesis that the effect of PEG on the structures of DODAB and DDAB aggregates in water depends on the molecular mass of the polymer. Besides, PEG stabilizes the unilamellar vesicles at high concentrations of DODAB, where the multilamellar vesicles are the dominant structures present in solution, thus allowing the formation of mixed DODAB/PEG and DDAB/PEG vesicles in water at relatively high concentrations of these surfactants. The experimental methods used in this investigation include turbidimetry, steady-state fluorescence, differential scanning calorimetry (DSC), isothermal titration calorimetry (ITC), and visual analysis by crossed polaroids. It was also performed bactericidal activity tests for reference microorganisms of 1 mM DODAB in sonicated and non-sonicated aqueous dispersions, in the presence and absence of PEG<sub>200Da</sub> and PEG<sub>2MDa</sub>. The effect was made using the method of the cart road cylinders. It revealed no bactericidal activity in the pure form within 10 minutes (or longer time) of contact, meaning that DODAB or DODAB/PEG is not efficient as bactericidal agent for hospitable use.

Tese disponível na Biblioteca do  
Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, UNESP (São José do Rio Preto)  
Biblioteca do Instituto Adolfo Lutz (São Paulo - SP)  
E-mail: ccmsantos@ial.sp.gov.br

## Performance of quality control strategies in cytopathological diagnosis in a reference laboratory

---

Utagawa ML. **Desempenho das Estratégias de Controle de Qualidade em Diagnóstico Citopatológico em Laboratório de Referência.** São Paulo – SP 2006 [Dissertação de Mestrado – Área de Concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública – Programa de Pós-graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado de São Paulo]. Orientador: Adhemar Longatto Filho

---

Cervical cancer is the third most common cancer among women in Brazil, after breast and skin cancer. The exam of Papanicolaou is well-recognized method to safety and efficiently option to recognize pre-malignant alterations of the uterine cervix. This study focused the comparison of three methodologies of internal quality control (QC) of cytologic diagnoses: 1) morphological guide-list to be revised (MGLR); 2) the rapid-rescreening (RR); 3) the revision of 10%. The objective was to evaluate the performance and the viability of the internal QC strategies in a Health Public Laboratory of the State of São Paulo. The uterine-cervix samples were examined at the Adolfo Lutz Institute during the period from 2002 to 2004. Of the 4184 samples, 1117 were submitted to MGLR revision, and with the lasting ones, were held revised by 10% method and RR. The RR was made by two trained professionals, who had adopted the *turret* method to the rescreening, for 60 seconds. The histopathology was used as *gold standard*. The final diagnosis of the cases without biopsy, were evaluated by diagnostic consensus of two pathologists. MGLR samples, 20.7% of cases showed alterations; the revision of 10% found 6.0% and RR, 2.5%. The kappa index between both observes in the RR was  $\kappa = 0.98$ . Cases prepared with liquid based cytology method presented better performance than conventional smear. The diagnosis concordance between initial diagnosis with the biopsy was of 57.4%; the false-negative (FN) rate of LSIL was 34.9% and HSIL 12.2%; and the diagnosis concordance of the final diagnosis was 97.2%. We conclude that to optimize the internal QC of cytology diagnosis it is important to judge a system which contemplates the association of more than one internal QC methodology, in order to identify the non-conformities and consider possible corrective actions. The RR seems to contribute to the reduce the rates of the false-negative results and also, allows to evaluate the individual performance of the professional, the revision of 10% seems to be important to increase the attention level of the group and the revision of samples selected by MGLR permits us to evaluate the points to be discussed in relation to the cytomorphological criteria.

Dissertação disponível na Biblioteca do Instituto Adolfo Lutz  
E-mail: mutagawa@ial.sp.gov.br

## AGRADECIMENTOS AOS COLABORADORES

O Corpo Editorial agradece a todos os pareceristas abaixo relacionados que, com seu trabalho voluntário e anônimo ao longo de 2006 contribuíram para esta Revista

**Adelaide José Vaz**, Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, São Paulo/SP

**Adriana Palma de Almeida** Instituto Adolfo Lutz, Divisão de Bromatologia e Química, Seção de Química Biológica, São Paulo/SP

**Ana Lúcia Sampaio Sgambatti de Andrade** Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Departamento de Saúde Coletiva. Goiás/GO

**Ana Paula Silva de Lemos** Instituto Adolfo Lutz, Divisão de Biologia Médica, Seção de Bacteriologia, São Paulo/SP

**Antonio Ruffino Netto** Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Departamento de Medicina Social, Ribeirão Preto/SP

**Benedito Correa** Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Microbiologia, São Paulo/SP

**Bernadette Dora Gombossy de Melo Franco** Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo/SP

**Carla Roberta de Oliveira Carvalho** Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Fisiologia e Biofísica, São Paulo/SP

**Carlos Alberto Rodrigues Anjos** Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas/SP

**Carlos Alberto da Rocha Rosa** Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Veterinária, Departamento de Microbiologia e Imunologia, Seropédica/RJ

**Célia Regina Whitaker Carneiro** Universidade Federal de São Paulo, Departamento de Microbiologia Imunobiologia e Parasitologia, São Paulo/SP

**Christiane Asturiano Ristori** Instituto Adolfo Lutz, Divisão de Bromatologia e Química, Seção de Microbiologia Alimentar, São Paulo/SP

**Clarice Queico Fujimura Leite** Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Departamento de Ciências Biológicas, Araraquara/SP

**Cristina Adelaide Figueiredo** Instituto Adolfo Lutz, Divisão de Biologia Médica, Seção de Vírus Produtores de Exantemas, São Paulo/SP

**Deborah Helena Markowicz Bastos** Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública, Departamento de Nutrição, São Paulo/SP

**Deborah Ines Teixeira Favaro** IPEN, São Paulo/SP

**Denise Maria Elisabeth Formaggia** Secretaria Estadual de São Paulo/Vigilância Sanitária/Núcleo Regional de Saúde do Litoral Norte, Caraguatatuba/SP

**Dennis Armando Bertolini** Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Análises Clínicas, Maringá/PR

**Elaine Cristina Pinto Moreschi** Companhia Industrial Nestlé do Brasil Ltda, São Paulo/SP

**Elenice Deffune** Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Medicina de Botucatu, Departamento de Urologia, Botucatu/SP

**Eliana Badiale Furlong** Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Departamento de Química, Laboratório de Micotoxinas, Rio Grande/RS

**Elizabeth Aparecida Ferraz da Silva Torres** Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública, Departamento de Nutrição, São Paulo/SP

**Elizabeth Natal De Gaspari** Instituto Adolfo Lutz, Divisão de Biologia Médica, Seção de Imunologia, São Paulo/SP

**Elizabeth Wenzel de Menezes** Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, São Paulo/SP

**Elizeu Trabuço** Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, Departamento de Química e Ciências Ambientais, São José do Rio Preto/SP

**Flavia Saldanha Kubrusly** Instituto Butantã, Centro de Biotecnologia, São Paulo/SP

**Flávio Antonio Lazzari** Universidade Federal do Paraná, Departamento de Zoologia, Curitiba/PR

**Giselle Ibetete Silva Lopez Lopes** Instituto Adolfo Lutz, Divisão de Bromatologia e Química, Seção de Microbiologia Alimentar, São Paulo/SP

**Glavur Rogerio Matté** Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública, Departamento de Prática de Saúde Pública, São Paulo/SP

**Harumi Sakuma** Instituto Adolfo Lutz, Divisão de Bromatologia e Química, Seção de Microbiologia Alimentar, São Paulo/SP

**Helena Cristina da Silva de Assis** Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas, Departamento de Farmacologia Centro Politécnico, Curitiba/PR

**Irma Nelly Gutierrez Rivera** Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas, São Paulo/SP

**Izildinha Moreno** Instituto de Tecnologia de Alimentos, Centro de Tecnologia de Laticínios, Campinas/SP

**Janete Alaburda** Instituto Adolfo Lutz, Divisão de Bromatologia e Química, Seção de Química Biológica, São Paulo/SP

**Jorge Cesar Masini** Universidade de São Paulo, Instituto de Química, Departamento de Química Fundamental, São Paulo/SP

**Jorge Mancini Filho** Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, São Paulo/SP

**Jorge Timenetsky** Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Microbiologia, Campinas/SP

**José Luiz Pereira** Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Departamento de Ciências de Alimentos, Campinas/SP

**Jovita Eugênia Gazzinelli Cruz Madeira** Fundação Ezequiel Dias, Instituto Octávio Magalhães, Núcleo de Micologia e Micotoxinas, Belo Horizonte/MG

**Leticia Araujo Farah Nagato** Instituto Adolfo Lutz, Divisão de Bromatologia e Química, Seção de Bebidas, São Paulo/SP

**Lígia Bicudo de Almeida Muradian** Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo/SP

**Lina Yamachita Oliveras**, Fundação de Ciência e Tecnologia, Superintendência de Produção, Departamento de Alimentos, Porto Alegre/RS

**Lúcia Maria Valente Soares** Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Departamento de Ciência de Alimentos, Campinas/SP

**Luiza Guilherme Guglielmi** INCOR, Hospital das Clínicas, FMUSP Instituto do Coração, Laboratório de Imunologia, São Paulo/SP

**Marcelo Antonio Morgano** Instituto de Tecnologia de Alimentos, Estadual, Centro de Química de Alimentos e Nutrição Aplicada, Campinas/SP

**Marcelo Lancellotti** Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia Departamento de Micronbiologia, Imunologia, Campinas/SP

**Márcia Regina Beaux** Universidade Federal do Paraná, Curitiba/PR

**Márcia Regina Franzolin** Instituto Butantan, Laboratório de Bacteriologia, São Paulo/SP

**Márcia Regina Pennacino do Amaral Mello** Instituto Adolfo Lutz, Divisão de Bromatologia e Química, Seção de Óleos e Gorduras, São Paulo/SP

**Marcos Vinicius da Silva** Instituto de Infectologia Emílio Ribas, Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Coordenadoria de Serviços de Saúde, São Paulo/SP

**Maria Aparecida Azevedo Pereira da Silva** Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Departamento de Planejamento Alimentar e Nutrição, Campinas/SP

**Maria Aparecida Nicoletti** Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo/SP

**Maria Auxiliadora de Brito Rodas** Instituto Adolfo Lutz Divisão de Bromatologia e Química, Seção de Análises Sensorial, São Paulo/SP

**Maria Beatriz Bohrer Morel** Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Laboratório de Ecotoxicologia, São Paulo/SP

**Maria de Fátima Henriques Carvalho** Instituto Adolfo Lutz, Divisão de Bromatologia e Química, Seção de Equipamentos Especializados, São Paulo/SP

**Maria Helena Matté** Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública, Departamento de Prática de Saúde Pública, São Paulo/SP

**Maria José Cavalieri** Instituto Adolfo Lutz, Divisão de Patologia, São Paulo/SP

**Maria José Gianinni** Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara/SP

**Maria Lucia Barbosa de Oliveira Racz** Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas II, Departamento de Microbiologia, São Paulo/SP

**Maria Teresa Destro** Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, São Paulo/SP

**Maria Yumiko Tominaga** Cia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, São Paulo/SP

**Marina Baquerizo Martinez** Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, São Paulo/SP

**Marisa Landgraf** Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental São Paulo/SP

**Marisa Padula** Instituto de Tecnologia de Alimentos, Secretaria da Agricultura e do Abastecimento do Estado de São Paulo, Centro de Tecnologia de Embalagem, Campinas/SP

**Marta Suely Madruga** Universidade Federal da Paraíba, Centro de Tecnologia - Campus I, Departamento de Tecnologia Química e Alimentos, João Pessoa/PB

**Martha Hiromi Taniwaki** Instituto de Tecnologia de Alimentos, Núcleo de Microbiologia, Campinas/SP

**Míria Dall'Agnol** Centro de Referência da Saúde da Mulher, São Paulo/SP

**Mitsuko Taba Ohara** Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas Departamento de Farmácia, São Paulo/SP

**Miyoko Jakabi** Instituto Adolfo Lutz, Divisão de Bromatologia e Química, Seção de Microbiologia Alimentar, São Paulo/SP

**Myrna Sabino** Instituto Adolfo Lutz, Divisão de Bromatologia e Química, Seção de Química Biológica, São Paulo/SP

**Neuza Jorge** Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos, São José do Rio Preto/SP

**Nivaldo Baccan** Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química, Campinas/SP

**Norma de Paula Cavalheiro** Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina, Departamento de Doenças Infecciosas e Parasitárias Laboratório de Hepatites, São Paulo/SP

**Paulina Sannomiya** Universidade de São Paulo, Instituto do Coração (InCor), Divisão de Experimentação, São Paulo/SP

**Paulo Pinto Joazeiro** Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Departamento de Histologia e Embriologia, Campinas/SP

**Paulo Roberto Nogueira de Carvalho** Instituto de Tecnologia de Alimentos, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Campinas/SP

**Pedro Manuel Leal Germano** Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública, São Paulo/SP

**Queenie Siu Hang Chui** Universidade de São Francisco, Engenharia e Ciências de Materiais, Itatiba/SP

**Regina Maura Cabral de Melo Abrahão** Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública, Departamento de Epidemiologia, São Paulo/SP

**Rogério Perujo Tocchini** Instituto de Tecnologia de Alimentos, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Centro de Tecnologia de Hortifrutícolas Fruthotec, Campinas/SP

**Ronaldo Zucatelli Mendonça** Instituto Butantan, Laboratório de Imunologia Viral, Seção de Imunologia Viral, São Paulo/SP

**Rosemar Antoniassi** Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisa de Tecnologia Agroindustrial de Alimentos, Rio de Janeiro/RJ

**Sabria Aued Pimentel** Instituto Adolfo Lutz, Divisão de Bromatologia e Química, Seção de Cromatografia Gasosa, São Paulo/SP

**Sidinea Cordeiro Freitas** Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisa de Tecnologia Agroindustrial de Alimentos, Rio de Janeiro/RJ

**Simone de Carvalho Balian** Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Animal, São Paulo/SP

**Soraya Sgambatti de Andrade** Universidade Federal de São Paulo, Departamento de Medicina, São Paulo/SP

**Sumie Hoshino Shimizu** Instituto Adolfo Lutz, Divisão de Biologia Médica São Paulo/SP

**Telma Mary Kaneko** Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas Departamento de Farmácia, São Paulo/SP

**Therezinha de Jesus Andreoli Pinto** Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Farmácia, São Paulo/SP

**Tomaz Henrique de Araújo** Centro Universitário Federal, Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas, Departamento de Ciências Biológicas, Alfenas/MG

**Valéria Christina Amstalden Junqueira** Instituto de Tecnologia de Alimentos, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Campinas/SP

**Victor Eduardo Arrúa Arias** Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Hospital das Clínicas, São Paulo/SP

**Waldir Pereira Elias Junior** Instituto Butantan, Laboratório de Bacteriologia, São Paulo/SP

**Zoilo Pires de Camargo** Universidade Federal de São Paulo, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, São Paulo/SP

**Agradecimento especial pela revisão do inglês**

**Mirthes Ueda** Instituto Adolfo Lutz, Divisão de Biologia Médica, Seção de Sorologia, São Paulo/SP

**Letícia Maria de Campos** Secretaria de Estado da Saúde, Coordenadoria de Controle de Doenças, São Paulo/SP

**Layout**

**Marcos Rosado - NIVE/CVE/CCD/SES-SP**

ISSN 0073-9855



9 770073 985009