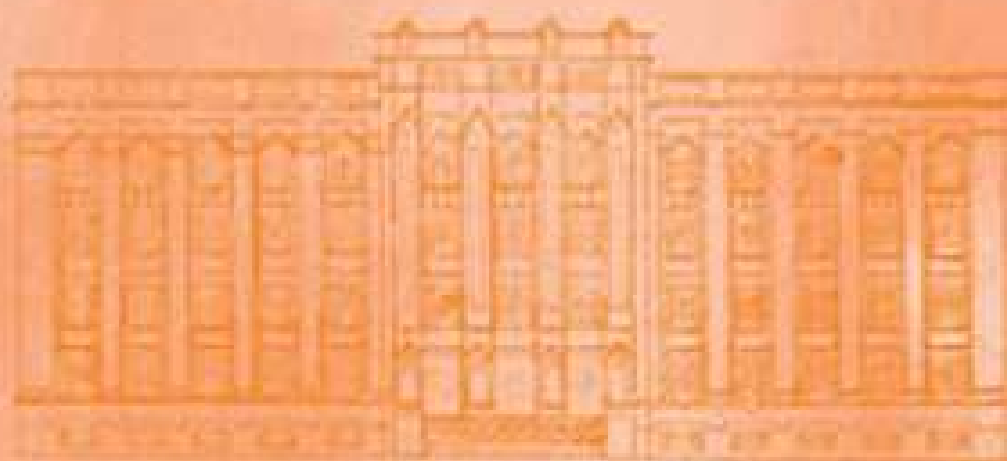


REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ

ISSN 0073-9855
RIALA6



GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE

Volume 72 número 1, 2013



Coordenadoria de Controle de Doenças
Instituto Adolfo Lutz

REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ

Volume 72 número 1, 2013
janeiro - março 2013

Publicação trimestral/Quarterly publication
Solicita-se permuta/Exchange desired

INSTITUTO ADOLFO LUTZ

Diretor Geral do Instituto Adolfo Lutz

Alberto José da Silva Duarte

Editor Chefe

Pedro Luiz Silva Pinto

Editor Adjunto

Adriana Bugno

Editores Assistentes

Neuza Kasumi Shirata Iso
Aurea Silveira da Cruz Garçon
Christiane Asturiano Ristori Costa
Gisele Letícia Alves
Iracema de Albuquerque Kimura
Jacqueline Tanury Macruz Peresi
Lucile Tiemi Abe Matsumoto
Márcia Liane Buzzo
Raquel dos Anjos Fazioli
Sérgio Dovidauskas
Virginia Bodelão Richini Pereira
Thales de Brito
Lílian Nunes Schiavon
Sylia Rehder

Núcleo de Acervo

Rocely Aparecida Bueno Moita

Conselho Editorial / Editorial Board

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

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

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

1941
2013, 72(1)

ISSN 0073-9855 CDD₁₆ 614.07205

RIALA 6
ISSN 1983-3814 versão *on line*
ISSN 2176-3844 CD-ROM

(*) ASSOCIAÇÃO PAULISTA DE BIBLIOTECÁRIOS. Grupo de Bibliotecários Biomédicos.

Normas para catalogação de publicações seriadas especializadas, São Paulo, Ed. Polígono, 1.072.

Os artigos publicados na Revista do Instituto Adolfo Lutz são indexados por: Abstracts on Hygiene and Communicable Diseases; 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; e Virology Abstracts.

Acesso on line / on line access. Texto integral / full text.

<http://revista.ial.sp.gov.br>

Portal de Revistas Saúde SP

<http://periodicos.ses.sp.bvs.br>

Cartas ao editor:

Endereço / Address

Núcleo de Acervo

Av. Dr. Arnaldo, 355, 01246-902 São Paulo/ SP – Brasil

Tel/ Fax. + 55 11 3068-2869

E-mail: rial@saude.sp.gov.br

Rev Inst Adolfo Lutz. 2013; 72 (1)

■ ARTIGO DE REVISÃO/ REVIEW ARTICLE

- 1536 Benefícios e perigos do aproveitamento da casca de maracujá (*Passiflora edulis*) como ingrediente na produção de alimentos**
Benefits and risks of using passion fruit peel (*Passiflora edulis*) as an ingredient in food production
Elisabete Maria da Graça Costa do NASCIMENTO, José Luis Ramirez ASCHERI, Carlos Wanderlei Piler de CARVALHO, Melicia Cintia GALDEANO 1-9

■ ARTIGO ORIGINAL/ORIGINAL ARTICLE

- 1537 Emprego de planilhas eletrônicas, baseadas nas normas ISO e recomendações IUPAC, em curvas analíticas da análise de água**
Use of electronic spreadsheets, based on ISO standards and IUPAC guidelines, for assessing the quality of water analytical curves
Sérgio DOVIDAUSKAS, Isaura Akemi OKADA, Alice Momoyo SAKUMA, Maria Cristina DURAN, Camila Cardoso de OLIVEIRA 10-20
- 1538 Avaliação do residual de bifenilos policlorados em músculo congelado e lombo cozido congelado de atum (*Katsuwonus pelamis*)**
Occurrence of polychlorinated biphenyl residues in frozen muscle and frozen cooked loin of tuna (*Katsuwonus pelamis*)
Amara da Silva LIMA, Milton Luiz Pinho ESPÍRITO SANTO, Caroline Irizaga GONÇALVES, Gilberto FILLMANN..... 21-27
- 1539 Verificação do método Monier-Williams otimizado na determinação de dióxido de enxofre em sucos de frutas, água de coco e cogumelo em conserva**
Verification of the optimized Monier-Williams method for determining sulfur dioxide in fruit juices, coconut water and mushroom in conserve
Letícia Araújo Farah NAGATO, Emy TAKEMOTO, Jussara Carvalho Moura DELLA TORRE, Jaim LICHTIG..... 28-40
- 1540 Determinação de vitamina E na castanha de caju e sua relação com a recomendação nutricional em humanos**
Determination of vitamin E in cashew and its relation to the nutritional recommendations in humans
Evellyn Câmara GRILO, Priscila Nunes COSTA, Mayara Santa Rosa LIMA, Penha Patrícia Cabral RIBEIRO, Andressa Fernanda de Lima BESERRA, Roberto DIMENSTEIN 41-46
- 1541 Parâmetros de qualidade da anchoita (*Engraulis anchoita*) enlatada**
Quality parameters of canned anchovy (*Engraulis anchoita*)
Aline Porto de Oliveira CARVALHO, Diego CORTEZIA, Milton Luiz Pinho ESPIRITO SANTO 47-52
- 1542 Avaliação da qualidade da água de poço**
Assessment the quality of well-water
Claudio Fernández ARAUJO, Janayna Roriz HIPÓLITO, Andrea Viviana WAICHMAN 53-58
- 1543 Perfumes e colônias no comércio ilegal**
Perfumes and colognes in the illegal trade
Lígia Luriko MIYAMARU, Maria Cristina SANTA BÁRBARA, Tatiana Caldas PEREIRA, Adriana Aparecida Buzzo ALMODOVAR, Viviane Emi NAKANO, Tamiko Ichikawa IKEDA, Christiane Guedes LAMBERT, Vinicius Dalben RODRIGUES5, Adriana BUGNO..... 59-64

1544	False-negative results in Real-Time PCR (RT-PCR) for meningococcal disease diagnosis Ocorrência de resultados falso-negativos na reação de PCR em Tempo Real (PCR-TR) no diagnóstico da doença meningocócica Lucila Okuyama FUKASAWA, Maria Gisele GONÇALVES, Fabio Takenori HIGA, Maristela Marques SALGADO, Ana Paula Silva de LEMOS, Claudio Tavares SACCHI	65-71
1545	Avaliação parasitológica da água de abastecimento e do solo peridomiciliar de Aldeias Guarani Parasitological assessment of the water supply and the domiciliary surrounding area soil in Guarani Villages Alyne da Silva BARBOSA, Claudia Maria Antunes UCHÔA, Valmir Laurentino da SILVA, Antônio Nascimento DUARTE, Newton Francisco da CONCEIÇÃO, Myriam Bandeira VIANNA, Ana Beatriz Monteiro FONSECA, Marcus Vinicius Maia RIBEIRO, Otilio Machado Pereira BASTOS.....	72-80
■ COMUNICAÇÃO BREVE/BRIEF COMMUNICATION		
1546	Qualidade físico-química da água de abastecimento da região do Vale do Ribeira-SP, Brasil Physicol-chemical characteristics of the public drinking water of the region of Vale do Ribeira, SP, Brazil Maria Anita SCORSARFAVA, Arlete de SOUZA, Monica STOFER, Claudete Azevedo NUNES, Thaís Valéria MILANEZ	81-86
1547	Elaboração tecnológica e aceitação sensorial de bebida isotônica orgânica de tangerina (<i>Citrus reticulata</i> Blanco) Development of an isotonic organic tangerine beverage (<i>Citrus reticulata</i> Blanco) and its sensorial acceptance Eliana de Souza Marques dos SANTOS, Rômulo Manoel ALVES, Carla de Souza LIMA	87-92
1548	Microbiota contaminante em bebidas lácteas fermentadas comerciais Contaminant microbiota in commercial fermented dairy beverages Janaína Alves dos REIS, Ana Lúcia Barretto PENNA, Fernando Leite HOFFMANN.....	93-98
1549	<i>Listeria monocytogenes</i> em hortaliças: isolamento e sorotipagem <i>Listeria monocytogenes</i> in green vegetables: isolation and serotyping Marcelo Luiz Lima BRANDÃO, Fernanda Corredeira da Paixão BISPO, Davi de Oliveira ALMEIDA, Carla de Oliveira ROSAS, Silvia Maria Lopes BRICIO, Victor Augustus MARIN	99-103
1550	<i>Listeria</i> spp., coliformes, bactérias mesófilas e psicrotróficas no leite <i>in natura</i> e pasteurizado tipo C <i>Listeria</i> spp, coliforms, mesophilic and psychrotrophic bacteria in raw and type C pasteurized milks Viramy Marques de ALMEIDA, Lidiane Soares PEREIRA, Francisca Neide COSTA	104-109
■ RESUMOS DE TESES E DISSERTAÇÕES		
	Resíduos de bifenilos policlorados em arroz e feijão do estado do Rio Grande do Sul Residues of polychlorinated biphenyl in rice and beans in the state of Rio Grande do Sul.	110
■ INSTRUÇÕES AOS AUTORES.....		
		111-116

Benefícios e perigos do aproveitamento da casca de maracujá (*Passiflora edulis*) como ingrediente na produção de alimentos

Benefits and risks of using passion fruit peel (*Passiflora edulis*) as an ingredient in food production

RIALA6/1536

Elisabete Maria da Graça Costa do NASCIMENTO¹, José Luis Ramirez ASCHERI², Carlos Wanderlei Piler de CARVALHO², Melicia Cintia GALDEANO²

*Endereço para correspondência: ¹Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rua Coaraci Gentil Nunes, 113, Guaratiba, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, CEP 23032-180. Tel.: (21) 3401-4120. E-mail: betecostanascimento@gmail.com

²Embrapa Agroindústria de Alimentos, Guaratiba, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Recebido: 10.12.2012 - Aceito para publicação: 27.03.2013

Agência financiadora: CAPES-EMBRAPA e UFRRJ

RESUMO

A produção do maracujá amarelo cresce no Brasil e o descarte inadequado das cascas representa tanto um problema para o meio ambiente, como a perda de ingrediente rico em fibras. O seu uso é fonte de renda para o produtor rural. Esta revisão traz os estudos que têm sido realizados sobre o aproveitamento da casca do maracujá, considerando-se os aspectos nutricionais e, também, uma alternativa segura, em termos toxicológicos, para o aproveitamento desse resíduo. Muitos autores avaliaram a casca do maracujá e detectaram teores de fibra alimentar de 35 a 90 %; e os benefícios do seu consumo foram identificados por meio de testes *in vivo* em ratos e em humanos. Em função de interesse, incentivou-se o desenvolvimento de produtos enriquecidos em fibra alimentar utilizando esse resíduo como componente da formulação. Há muito tempo foram identificados glicosídeos cianogênicos no maracujá, exceto nas sementes. Os efeitos tóxicos de alimentos com cianogênicos são observados em países africanos, onde é comum o consumo da mandioca brava sem o tratamento adequado. O processo de extrusão termoplástica tem sido estudado como ferramenta útil na redução de substâncias tóxicas e sua utilização será importante para processar as cascas e reduzir cianogênicos aos níveis aceitáveis pela legislação.

Palavras-chave. fibra alimentar, extrusão termoplástica, glicosídeos cianogênicos.

ABSTRACT

The production of yellow passion fruit has increased in Brazil, and the inadequate disposal of peels has resulted in environment issue, and also a loss of fibers-rich ingredients. Its use contributes to increase the farmer income. This review analyzes the studies which have been performed on the use of passion fruit peel, considering the nutritional aspects, and to propose safe alternatives for employing this residue. Several investigators have assessed the dietary fiber contents in passion fruit peel which ranged from 35 to 90 %, and the *in vivo* tests in mice and humans have identified the benefits of its consumption. Owing to this concern, it has strengthen the development of products enriched with dietary fiber as an ingredient in the formulation. A long time ago, the cyanogenic glycosides have been identified in passion fruit, except in the seeds. The toxic effects of foods containing cyanogenic compounds have been observed in African countries, where the cassava without adequate treatment has commonly been consumed. The thermoplastic extrusion procedure has been considered as a useful tool for reducing toxic components, and its use will be important for processing peels and to reduce cyanogens to the acceptable levels in accordance with the food regulation.

Keywords. dietary fiber, thermoplastic extrusion, cyanogenic glycosides.

INTRODUÇÃO

O Brasil produz, diariamente, toneladas de resíduos sólidos orgânicos resultantes da indústria de alimentos, que comprometem o ecossistema, uma vez que são materiais altamente poluentes. Boa parte desses resíduos é gerada pelas indústrias extratoras de sucos, que ao processarem as frutas, descartam cascas, albedos, sementes, aparas e vesículas. No entanto, esse material possui grande potencial econômico e nutricional, pois é, em sua maioria, fonte de fibra alimentar¹.

O maracujá (*Passiflora edulis*) sofre muita perda durante o processamento, pois somente 30 % de todo o peso do fruto é aproveitado, que é a polpa utilizada para a extração do suco². Nos últimos anos, é tema de pesquisa a busca do aproveitamento desses resíduos no desenvolvimento de produtos de maior valor agregado como, por exemplo, farinhas com alto teor de fibras³⁻⁹.

Por outro lado, a casca do maracujá possui compostos considerados altamente tóxicos, que são os glicosídeos cianogênicos, presentes também no albedo e na polpa do fruto^{10,11}.

O aproveitamento de resíduos vegetais como fonte de fibra alimentar por meio de sua incorporação como ingrediente em produtos alimentícios tem grande potencial de viabilidade do ponto de vista nutricional, econômico e também ecológico. Porém, o produto final deve proporcionar segurança toxicológica para o consumidor. Portanto, o objetivo desta revisão bibliográfica é avaliar a utilização do epicarpo e do albedo do maracujá (chamado simplesmente de “casca”) como ingrediente, visto que muitos produtos têm sido desenvolvidos sem a avaliação da toxicidade da casca deste fruto e, assim, fomentar a pesquisa desse material com critérios de segurança. Esta pesquisa avaliou os dados levantados no período de 1983 a 2012.

Produção do maracujá

O maracujá vem da palavra “maraú-va” que, para os indígenas, significa “fruto de sorver”, que expressa “beber vagarosamente”, ou ainda, “polpa que se toma de sorvo”. O tipo amarelo (*Passiflora edulis* flavicarpa Degener) é formado de pedúnculo, epicarpo (a casca amarela externa), mesocarpo (a parte branca da casca, também denominada albedo), endocarpo ou polpa (que contém o arilo carnoso) e as sementes. Nas indústrias de sucos, ocorre o aproveitamento apenas do arilo carnoso, sendo as sementes, o albedo

e o epicarpo dispensados, tornando-se importante problema ambiental¹.

Apesar de o gênero *Passiflora* possuir um grande número de espécies (mais de 400), o cultivo comercial do Brasil está baseado em uma única – maracujá amarelo (*Passiflora edulis*) – devido ao maior rendimento do seu fruto em suco¹⁰.

A aceitação sensorial do suco e a valorização do preço da fruta fresca fizeram com que a produção de maracujá tivesse um crescimento exponencial (Figura 1), mesmo depois de enfrentar dificuldades cíclicas de comercialização e problemas fitopatológicos entre os anos de 1996 e 2009¹⁰.

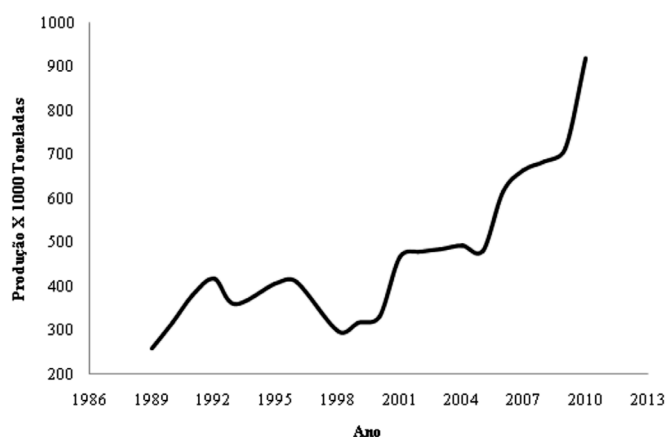


Figura 1. Produção de maracujá no Brasil entre os anos de 1989 a 2010 (Adaptado de Meletti, 2011)¹⁰

Em 2010, a produção brasileira de maracujá foi de 920.158 toneladas, sendo seu cultivo realizado em pequenas propriedades, com necessidade de fixação da mão de obra rural e emprego de cerca de quatro pessoas por hectare¹⁰.

Na indústria de processamento do suco do maracujá, o descarte ou o destino dos resíduos vegetais representam um crescente problema, devido ao aumento da produção a cada ano, uma vez que esses resíduos constituem a maior parte do peso do fruto, cerca de 60 a 70 % total¹⁰.

As fibras e os compostos bioativos da casca do maracujá e seus efeitos sobre a saúde

O albedo do maracujá já foi caracterizado por vários autores como rico em fibras^{3,4,9,11-13}. Conforme a Tabela 1, o teor de fibra alimentar da casca do maracujá varia de 57,32 a 90,32 %, sendo que essa diferença pode estar relacionada às diferentes metodologias analíticas empregadas.

Segundo posicionamento da *American Dietetic Association*, em 2002¹⁴, o consumo de fibras alimentares é de aproximadamente 20 a 35 g por dia, ou 10 a 13 g de fibras/1000 kcal. Na prática, essa quantidade não é alcançada pela maioria dos brasileiros¹⁵. O Guia Alimentar para a População Brasileira, elaborado pelo Ministério da Saúde¹⁶, também segue a recomendação de 25 g de fibras alimentares ao dia para adultos, e acrescenta que, se a alimentação contiver quantidades adequadas de cereais, tubérculos, raízes, frutas, hortaliças, leguminosas, essa quantidade de fibras será atingida.

A fibra alimentar apresenta efeitos benéficos à saúde, sendo responsável por auxiliar na redução do risco de certas patologias crônicas como, as doenças cardiovasculares, diabetes, obesidade, câncer do cólon, entre outras¹⁵. Esses efeitos levantam especial interesse em pesquisa por vegetais ricos em fibras, principalmente nas sociedades ocidentais, nas quais a alta prevalência dessas doenças é observada, devido ao grande consumo de alimentos à base de produtos processados refinados¹¹.

As fibras alimentares dos vegetais podem ser consideradas como a parte resistente à hidrólise enzimática no trato gastrointestinal humano e são classificadas de acordo com sua hidrossolubilidade. A parte insolúvel da fibra (celulose, alguns tipos de

Matsuura⁹, que encontrou 30,7 % de celulose; 27,8 % de pectina; 1,6 % de hemicelulose e 1,1 % de lignina (todos em base seca).

Janebro et al¹⁷, estudando a farinha da casca do maracujá, mostraram que os níveis glicêmicos apresentados pelos pacientes após o uso de 30 g diárias durante 60 dias, são compatíveis com uma ação positiva no controle da glicemia. Foi verificado também um aumento do colesterol HDL nos mesmos 43 pacientes estudados.

A pectina – abundante no maracujá – abaixa efetivamente o colesterol sem afetar o nível de HDL¹⁸. Silva et al¹⁹ mostraram que, além do efeito hipocolesterolêmico, a pectina da casca de maracujá quando administrada em doses adequadas, apresentou ação antiinflamatória e propriedade hipoglicemiante em ratos diabéticos. Além disso, a pectina contém um composto bioativo, a luteolina^{20,21}, com potencial para uso em tratamento alternativo do Diabetes tipo 2.

A ação vasodilatadora dos polifenóis na *Passiflora edulis* foi observada no estudo de Ichimura et al²⁰. Uma análise quantitativa mostrou que o extrato da casca da *Passiflora edulis* contém 20 µg/g de peso seco de luteolina e 41 µg/g de peso fresco de luteolina-6-C-glicosídeo. Segundo os autores, esses compostos mostraram ter efeito anti-hipertensivo em ratos.

Também foi encontrado nesse extrato da casca, o ácido gama-aminobutírico (GABA), que é o principal neurotransmissor inibidor da transmissão pré-sináptica no sistema nervoso central (SNC); a falta da síntese do GABA ou o bloqueio de seus neurotransmissores no SNC, resulta em estimulação intensa, manifestada por convulsões generalizadas²².

Outro estudo²¹, de 2005, já havia elucidado que a luteolina inibiu a expressão de genes de secreção endotelial (ET-1, Endothelin-1) responsáveis pela secreção de várias substâncias vasoativas. O ET-1 é um potente vasoconstritor regulador da pressão arterial e, Kozakai²¹ demonstrou que a luteolina pode inibir a secreção e expressão gênica de ET-1 em células endoteliais aórticas de suínos.

Watson et al²³ demonstraram atividade antioxidante e antiinflamatória dos extratos das cascas do maracujá após administração oral, sendo que os resultados sugerem por estudos estatísticos o potencial uso em outros tipos de terapia. Com a administração deste extrato, observou-se melhora dos sintomas clínicos em pacientes com asma, diminuição do chiado

Tabela 1. Teores de fibra alimentar da casca do maracujá amarelo

Teor de fibra na casca do maracujá (g/100 g)	Referência
57,32	Córdova et al (2005) ¹²
71,10	Matsuura (2005) ⁹
90,32	Santana e Silva (2007) ⁴
64,11	Leoro (2007) ³
73,50	Yapo e Koffi (2008) ¹¹
64,71	Gilciléia (2011) ¹³

hemicelulose e lignina) permanece intacta em todo o trato gastrointestinal humano e atua aumentando a necessidade de mastigação, o bolo fecal e o estímulo da motilidade intestinal¹⁵. Pectinase, algumas hemiceluloses, gomas e mucilagens são partes hidrossolúveis da fibra, e que tendem a formar géis quando em contato com a água. Elas apresentam atividade hipocolesterolêmica, reduzem os níveis de triglicerídeos sanguíneos e são parcialmente metabolizadas por bactérias presentes na flora intestinal¹⁵.

Os componentes da fibra alimentar do maracujá (*Passiflora edulis*) foram quantificados por

no peito, da tosse e da falta de ar, além da ausência de possíveis efeitos colaterais.

Em outro estudo, trinta e três pacientes com osteoartrite no joelho receberam um preparado de extrato de casca de maracujá, sendo observada melhora significativa nas funções físicas após 30 dias; após 60 dias de administração, percebeu-se melhora na rigidez e na dor. Os autores concluíram que os efeitos benéficos podem ser atribuídos às propriedades antioxidantes e antiinflamatórias das cascas de maracujá²⁴.

Toxicidade da casca do maracujá

Embora os produtos à base de plantas sejam geralmente considerados seguros, sua toxicidade não deve ser descartada devido aos constituintes cianogênicos de diversas espécies, como por exemplo, das passifloras.

A casca do maracujá possui glicosídeos cianogênicos, substâncias de defesa próprias dos vegetais, contra seus predadores. Quando o tecido vegetal é rompido, uma reação enzimática que desdobra os glicosídeos até ácido cianídrico é desencadeada. Na circulação sanguínea, o cianidreto libera o íon cianeto, que é transportado pela hemoglobina. Nas células, o cianeto liga-se fortemente ao citocromo mitocondrial, responsável pelo transporte de elétrons na respiração celular. Por essa razão, o intoxicado passa por um processo de asfixia celular que, dependendo da quantidade de cianeto no sangue, pode levar à morte²⁵.

Glicosídeos cianogênicos estão presentes em uma vasta quantidade de vegetais, sendo muito comuns em mandioca brava. Diversos estudos vêm identificando e quantificando os compostos cianogênicos presentes na casca de maracujá. Um resumo deles pode ser visto na Tabela 2.

Rosenthaler, foi o primeiro a investigar e relatar a presença desses compostos em *P. edulis*, em 1991. Spencer e Seigler²⁶ encontraram níveis significativos presentes em todas as partes, exceto nas sementes. Eles utilizaram a metodologia de Lambert²⁷ que consiste na hidrólise enzimática, e o método de colometria para determinar ácido cianídrico²⁸.

Existem vários métodos para quantificar analiticamente o ácido cianídrico (HCN) em alimentos: o método colorimétrico, utilizando a mistura piridina pirazolona ou o ácido pícrico com pH 7,8 a 10,2; o volumétrico, utilizando AgNO₃; o espectrofotométrico, que utiliza a piridina/ácido barbitúrico; o enzimático; o voltamétrico; a técnica polarográfica e a potenciométrica. Entre todos esses métodos acima citados, o argentimétrico – método oficial da AOAC-915.03²⁸ – é o mais seguro (por não precisar manusear CN⁻) e com menor custo em relação aos reagentes.

Para estudar a degradação, a remoção de cianogênicos e para monitorar os níveis residuais na obtenção de produtos, é necessário separar e quantificar os glicosídeos cianogênicos e o ácido cianídrico. Os métodos analíticos conhecidos mostravam-se inconvenientes, sem precisão e repletos de erros sistemáticos. Em 1995, o método mais promissor era o enzimático para quantificação de cianogênicos, cianohidrininas e ácido cianídrico. Porém, esse método não foi comparado com o oficial AOAC, de 1984²⁸.

Chassagne et al²⁹ identificaram e quantificaram, por CG/MS (cromatografia gasosa com espectrometria de massa), os compostos cianogênicos em *P. edulis* Flavicarpa e verificaram que o mais importante composto presente é a prunasina, que representa 80 % dos glicosídeos cianogênicos encontrados nas cascas.

Matsuura⁹ quantificou os compostos cianogênicos pelo método da hidrólise ácida com ácido sulfúrico e reação de cor usando os ácidos isonicotínico e barbitúrico segundo Bradbury et al³⁰. Foram encontrados níveis de 117 mg/kg de casca de maracujá fresco. Este trabalho avaliou os teores de compostos cianogênicos em diferentes formas de processamento de albedo de maracujá amarelo envolvendo cozimento, sendo observado que o cozimento sob pressão reduziu de forma rápida, porém com teores acima de 10 ppm; o cozimento em água, em pressão atmosférica e por tempo prolongado (120 minutos), reduziu os teores a níveis inferiores a 10 ppm; e o processo em que o albedo foi branqueado imerso em salmoura,

Tabela 2. Teores de cianogênicos na casca do maracujá (*in natura*)

Teor de cianogênicos (mg/kg)	Referências	Metodologia de análise de cianogênicos
65,00 – 594,00	Spencer e Seigler (1983) ²⁶	Hidrólise enzimática e colorimetria
286,00	Chassagne et al (1996) ²⁹	Cromatografia gasosa com espectrometria de massa
117,00	Matsuura (2005) ⁹	Hidrólise ácida e colorimetria
784,30*	Leoro (2007) ³	Colorimetria
74,67 – 231,67	Gilciléia (2011) ¹³	Hidrólise ácida e colorimetria

*Farinha de casca de maracujá

seguido de cozimento em água em pressão atmosférica foi mais eficaz.

Bradbury et al³⁰ desenvolveram um método simples, rápido e de baixo custo, com papel reativo para determinar os níveis totais de cianogênicos em mandioca e seus produtos. Este método consiste na reação da enzima linamarase, presente na casca da mandioca, em contato com a solução de ácido pícrico impregnado em papel. Após a eluição em água, procede-se a determinação colorimétrica em espectrofotômetro a 510 nm.

A Organização Mundial da Saúde estabeleceu um limite máxima de 10 ppm de cianeto total, que segundo Burns et al³¹, tem sido adotado na Austrália pela “Food Standards Austrália e Nova Zelândia”, enquanto 40 ppm é o limite permitido na Indonésia.

No Brasil, a Resolução RDC nº 53, de 15 junho de 2000³², estabeleceu e determinou o limite máximo de ácido cianídrico de 4 ppm para produtos de mistura à base de farelo de cereais.

O efeito tóxico de cianeto em humanos depende do peso corporal, do estado de saúde, da dose ingerida e do tempo de ingestão. A dose letal aguda de cianeto para humanos é de 0,5 a 3,5 mg/kg de peso corpóreo³³. Para uma criança de 20 kg, 40 a 270 g de produtos com altos teores de cianeto já podem ser consideradas letais.

Vários autores quantificaram derivados dos compostos glicosídicos comestíveis de várias espécies de *Passiflora*: segundo Leoro³, o farelo de maracujá, após processamento (lavagem, corte, retirada da polpa, trituração das cascas, secagem, moagem e obtenção do farelo), apresentou 748,3 mg/kg de compostos cianogênicos totais pelo método colorimétrico, utilizando reagente de cor de ácidos isonicotínico e barbitúrico; Spencer e Seigler²⁶ encontraram teores de compostos cianogênicos na faixa de 65 a 594 mg/kg de fruto fresco pelo método da hidrólise enzimática para separação do ácido cianídrico do glicosídeo e quantificação por colorimetria; Chassagne et al²⁹ reportaram teores de aproximadamente 286 mg/kg em casca de maracujá “in natura” por cromatografia gasosa com espectrometria de massa.

Entre os vegetais que apresentam compostos cianogênicos, a mandioca brava é a mais estudada, sendo sua toxicidade bem estabelecida por estudos epidemiológicos. Assim, uma correlação com outros vegetais, ainda não amplamente estudados, pode ser interessante.

A exposição aguda a alimentos com alto teor de glicosídeos cianogênicos pode causar náuseas,

vômitos, diarreia, vertigem, fraqueza e, por vezes, pode levar à morte³¹. Ocorrência de Cliff et al³⁴ relacionou a intoxicação crônica com cianeto em pacientes de paraparesia espástica que consumiam produtos de mandioca processados de forma inadequada. A falta de alimentos ricos em aminoácidos sulfurados, na dieta, os quais atuam na desintoxicação dos efeitos do cianeto no organismo, aliada à dependência quase total da mandioca como alimento nos períodos de seca contribuíram para desencadeamento da paraparesia espástica no norte de Moçambique em 1981, conforme investigação do Ministério da Saúde de Moçambique³⁵, que concluiu que a ocorrência da doença está relacionada ao consumo de mandioca ou produtos da mandioca como principal fonte de energia, ou em países tropicais, cujos se expõem de maneira mais acentuada ao risco de intoxicação alimentar por cianeto.

A síndrome de Konzo, nome da paralisia espástica simétrica que ocorre principalmente em crianças e mulheres jovens, está invariavelmente associada ao consumo de alimentos contendo glicosídeos cianogênicos processados inadequadamente. Segundo Adamolekun³⁶, numerosos estudos epidemiológicos, clínicos e bioquímicos não conseguiram elucidar os mecanismos etiológicos desta doença, para qual ainda não há tratamento conhecido.

Essa doença continua a ser predominante em áreas endêmicas, provocando incapacidade significativa e aumento da mortalidade. Segundo os estudiosos, a síndrome de Konzo continuará a ser um grave problema de saúde nos países da África caso nenhuma atitude seja tomada³⁷.

Para a casca de maracujá, existem poucos estudos relacionados à sua toxicidade *in vivo*. Medeiros et al³⁸, em ensaio clínico, concluíram que a farinha do albedo da *Passiflora edulis* pode ser usada com segurança em pacientes portadores de dislipidemias. No entanto, esses resultados referem-se à dose utilizada no estudo (10 g três vezes ao dia, por 8 semanas, adicionados a suco, refresco, sopa ou outro alimento). Nessas condições, não foram observadas alterações que pudessem comprometer seu uso como alimento, porém o uso além do relatado, deve ser minuciosamente investigado.

Maluf et al³⁹, estudando as folhas de *Passiflora edulis* destacaram que, apesar dessa espécie ser utilizada na medicina popular como tratamento hipnótico e sedativo, foi verificado significativo efeito depressor não específico do sistema nervoso central. Além disso,

as toxicidades hepatobiliar e pancreática em animais e humanos foram detectadas.

Sena⁴⁰ fez um levantamento de 31 trabalhos disponíveis na literatura sobre possíveis propriedades neurofarmacológicas de espécies de *Passiflora*. Desses, apenas 6 trabalhos foram realizados entre a década de 70 e 90 e os 25 artigos restantes foram publicados após 2000. A maioria das investigações dizem respeito às espécies *P. incarnata* (17 artigos) e *P. edulis* (10 artigos). Com relação à parte da planta usada, 14 artigos relatam os efeitos neurofarmacológicos de extratos obtidos a partir das folhas. Existem poucos estudos sobre as propriedades neurofarmacológicas de outras partes da espécie *P. edulis*, segundo a autora.

Produtos elaborados com a casca do maracujá

Seguindo a tendência mundial de desenvolvimento de produtos com ingredientes que apresentam benefícios à saúde, a casca de maracujá torna-se uma alternativa interessante para ser explorada como um melhorador do índice glicêmico de produtos industrializados. Segundo alguns autores, alimentos com baixo índice glicêmico promovem menor elevação da glicemia pós-prandial devido à lenta taxa de digestão e absorção, enquanto os alimentos com alto índice glicêmico proporcionam aumento da glicemia por serem absorvidos mais rapidamente⁴¹.

A fim de avaliar o índice glicêmico de um cereal matinal elaborado com casca do maracujá como ingrediente rico em fibras, Leoro³ estudou a influência de alguns parâmetros do processo de extrusão. Os extrudados produzidos mostraram uma redução de 50 % no índice glicêmico *in vitro* comparado ao pão branco. Apesar de ter verificado a importância da adição da casca do maracujá na diminuição do índice glicêmico do produto, a autora ressaltou que a diminuição dos níveis de cianeto não foi considerada adequada, por não alcançar os níveis aceitáveis pela legislação.

O uso de extrato seco da casca de maracujá com intuito de proporcionar uma melhora na tolerância à glicose em dietas de indivíduos diabéticos também tem sido estudado. Ando et al⁴² elaboraram *cookie diet* a base de farinha de casca de maracujá-amarelo e analisaram a aceitação por parte dos consumidores. As melhores amostras, na opinião dos provadores, foram as que apresentaram menor teor de casca. Porém, a mais adequada para lanches especificamente dietéticos seria a que apresentou cinco vezes mais a quantidade de fibras; não foram analisados os níveis de cianogênicos no produto elaborado.

Com o objetivo de utilizar a casca do maracujá como ingrediente rico em fibras, Santana e Silva⁴ elaboraram biscoitos doces com farinha de albedo de maracujá. Para 1kg de biscoito, foram utilizados 35 % de trigo, 9 % de farinha de maracujá e outros ingredientes convencionais para formulação de biscoitos, como açúcar, gordura e água. A avaliação físico-química dos biscoitos mostrou que, em cada 100 g de produto, haviam 4,67 % de fibra e 4,97 % de proteína. Os autores também não avaliaram os níveis de cianogênicos nos biscoitos.

Silva et al⁵ investigaram a incorporação deste co-produto do maracujá amarelo como ingrediente em barras de cereais. Além de casca de maracujá, foram adicionados aveia em flocos, flocos de arroz e de milho, lecitina de soja e outros ingredientes coadjuvantes. As barras apresentaram teores de fibra alimentar total variando de 6,6 a 10,4 %. Foi verificada a presença de polifenóis totais tanto no resíduo de maracujá como nas barras. A barra de cereal que apresentou maior quantidade de polifenóis foi a formulação de maior teor de casca adicionada. Os autores também não testaram os níveis de cianogênicos finais presentes nas barrinhas.

Santos et al⁶ elaboraram biscoitos a partir de mandioca, casca de maracujá e farinha de trigo, buscando obter um produto com elevado valor nutritivo, características sensoriais aceitáveis e de custo acessível. Com a adição de 17 % de farinha de casca de maracujá foi possível obter um biscoito considerado como fonte de fibra, segundo o descrito na Portaria n. 27/1998 da ANVISA⁴³, e com aceitação por parte dos provadores na análise sensorial. No entanto, também não foi estudado o teor dos cianogênicos no biscoito elaborado.

Oliveira et al⁷ estudaram o aproveitamento da casca do maracujá amarelo para produção de doces em calda e sua aceitabilidade entre consumidores de diferentes faixas etárias. Foi constatado que a casca do maracujá constitui adequada matéria-prima para produção de doce em calda, é aceitável por várias faixas etárias de consumidores, além de ser um alimento alternativo de baixo custo para a população de baixa renda e se constituir em uma interessante complementação financeira aos pequenos empreendedores. Não foram testados teores de cianogênicos no produto.

Spanholi e Oliveira⁸ elaboraram um produto com propriedades funcionais a partir do albedo de maracujá. As dextrinas resistentes contidas nas fibras do albedo estão

em conformidade com as alegações da ANVISA com relação às propriedades funcionais. Os autores avaliaram a viabilidade de utilização de diferentes concentrações da farinha de albedo de maracujá na elaboração de massa alimentícia. Segundo eles, a massa adicionada de 10 % de farinha de albedo de maracujá teve melhor aceitação. Nesse estudo, também não foram testados níveis de cianogênicos nos produtos.

Matsuura⁹ desenvolveu barras de cereais adicionadas de casca de maracujá. A adição de até 7,8 % de albedo de maracujá na formulação das barras não alterou a aceitação sensorial do produto. O autor tratou o albedo do maracujá por imersão em salmoura, seguido de cozimento em pressão atmosférica, por 10 minutos, para eliminar os compostos cianogênicos. Foi alcançada uma redução dos cianogênicos a níveis inferiores a 10 ppm.

Nesta revisão, percebe-se que, entre os vários produtos que estão sendo desenvolvidos com a casca de maracujá, poucos estudos consideraram a quantificação dos cianogênicos residuais, item a ser avaliado como importante parte do estudo.

Diminuição de substâncias antinutricionais e tóxicas por meio do processamento por extrusão termoplástica

A extrusão termoplástica para processar alimentos é uma excelente forma de modificar coprodutos da indústria alimentícia e transformá-los em ingredientes para serem adicionados em uma ampla variedade de produtos. Nascimento et al⁴⁴ utilizaram o resíduo da extração do óleo de gergelim para elaborar biscoitinhos extrudados, obtendo produto final enriquecido com fibras, proteína, cálcio e com boa aceitação pelos consumidores.

Alguns trabalhos mostraram que o processo de extrusão termoplástica também é muito eficaz em diminuir e inativar fatores antinutricionais e outras substâncias tóxicas. Mukhopadhyay et al⁴⁵ mostraram diminuição de até 61 % dos taninos do gergelim, mesmo trabalhando em temperaturas não muito altas (97 °C), em extrusora de parafuso único e com umidades altas (32-48 %), que para o processo de extrusão termoplástica, não são considerados como tratamento severo.

Kelkar et al⁴⁶, com o objetivo de reduzir a presença de lecitinas tóxicas e oligossacarídeos causadores de flatulências, utilizaram extrusão termoplástica para reduzir os efeitos desses compostos em farinha de feijão. Segundo os autores, houve uma significativa redução comparada ao cozimento tradicional por vapor. Eles

ainda acrescentaram que os resultados poderiam ser melhores se a razão feijão-água fosse maior.

Por meio do processamento por extrusão termoplástica também é possível acrescentar aditivos para diminuir as substâncias tóxicas presentes. Mulla et al⁴⁷ acrescentaram diferentes aditivos (ácido cítrico, glicina, L-lisina, cloreto de cálcio, lactato de cálcio, biotina, tiamina) e verificaram a redução de 65 % na formação de acrilamida em salgadinhos extrudados sem, no entanto, alterar as propriedades sensoriais dos salgadinhos.

Ascheri et al⁴⁸ processaram pinhão manso por extrusão termoplástica e observaram redução de 55 % em relação ao teor inicial de ésteres de forbol, que são os principais compostos tóxicos presentes.

Leoro³ processou casca de maracujá por extrusão termoplástica para elaborar cereal matinal a base de milho. O material foi processado em extrusora monorroscas de laboratório (Brabender). Os parâmetros de extrusão foram: parafuso com taxa de compressão de 3:1, rotação de 130 rpm, temperatura da última zona de extrusão variando de 120 a 160 °C, umidade entre 18 e 28 % e adição de farelo de maracujá de 0 a 30 %. Os resultados para os teores de compostos cianogênicos totais ficaram entre 0 e 254 mg/kg, sendo influenciado pelos teores de farelo adicionado e umidade de processamento. O autor mencionou que, em baixo teor de umidade, possivelmente ocorreu um rompimento da molécula de glicosídeo devido ao alto cisalhamento e alta pressão dentro da extrusora, liberando o HCN.

Pequenas modificações no equipamento (tipo da extrusora, matriz, rosca, entre outras) e na matéria-prima podem levar a diferentes resultados finais da qualidade, conforme descreve El-Dash⁴⁹. A umidade de processamento é um dos parâmetros que mais influencia a modificação dos materiais. Desta forma, poderão ser obtidos produtos completamente diferentes, apenas variando a umidade inicial da matéria-prima. Se a umidade for alta, o produto final terá um menor cozimento, exercerá menor pressão sobre a matriz, reduzirá a geração de calor e a transformação do produto também será diminuída.

Assim, o processo de extrusão termoplástica parece ser bastante eficaz na redução de compostos antinutricionais e na inativação de substâncias tóxicas presentes. Com a combinação de calor, força mecânica, pressão e teor de umidade é possível transformar os materiais e obter a redução total da parte tóxica do produto preservando seus nutrientes, conferindo qualidade e segurança ao produto final.

CONCLUSÃO

Os estudos mostraram que a casca do maracujá apresenta alto teor de fibras, que o torna um ingrediente promissor para o enriquecimento de formulações. Apesar dos benefícios à saúde atribuídos ao consumo de fibras, a utilização segura deste co-produto deve ser melhor investigada, devido a presença dos compostos cianogênicos, com potencial tóxico. Não há pesquisa suficiente para comprovar sua inocuidade após diferentes tipos de processamento, inclusive por extrusão termoplástica.

Com o desenvolvimento de novas pesquisas e a aplicação de tecnologia adequada poderá ser possível o aproveitamento deste co-produto para gerar produtos seguros e com alto valor agregado e, ao mesmo tempo, diminuir os danos ao meio ambiente.

REFERÊNCIAS

1. Santos AAO, Santos AJAO, Alves AR, Santana FC, Silva JV, Marcellini PS, et al. Utilização de resíduos agroindustriais em processos biotecnológicos como perspectiva de redução do impacto ambiental. *J Tech Manag Innov*.2011;7(8):1-7.
2. ITAL. Instituto de Tecnologia de Alimentos. Maracujá: cultura, matéria-prima, processamento e aspectos econômicos. Campinas; 1994.
3. Leoro MG. Desenvolvimento de cereal matinal extrusado [dissertação de mestrado]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2007.
4. Santana MFS, Silva EFL. Elaboração de biscoitos com farinha de albedo de maracujá. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental. Embrapa Amazônia Oriental. (Comunicado Técnico, 194). CPATU (FL 10768 UMT); 2007.
5. Silva IQ, Oliveira BCF, Lopes AS, Pena RS. Obtenção de barra de cereais adicionada do resíduo industrial de maracujá. *Alim Nutr*.2009;20(2):321-9.
6. Santos AAO, Santos AJAO, Alves AR, Santana FC, Silva JV, Marcellini PS. Elaboração de biscoitos a partir da incorporação de produtos da mandioca e casca de maracujá (*Passiflora edulis* Flavicarpa) na farinha de trigo. *Scient Plen*.2011;7(8):1-7.
7. Oliveira LF, Nascimento MRF, Borges SV, Ribeiro PCN, Ruback VR. Aproveitamento alternativo da casca do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* Flavicarpa) para produção de doce em calda. *Ciênc Tecnol Alim*.2002; 22(3):259-62.
8. Spanholi L, Oliveira VR. Utilização de farinha de albedo de maracujá (*Passiflora edulis* Flavicarpa Degener) no preparo de massa alimentícia. *Alim Nutr*.2009;20(4):599-603.
9. Matsuura FU. Estudo do albedo de maracujá e de seu aproveitamento em barra de cereais [tese de doutorado]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2005.
10. Meletti LMM. Avanços na cultura do maracujá no Brasil. *Rev Bras Frutic*.2011;Vol Esp:83-91.
11. Yapo BM, Koffi KL. Dietary fiber components in yellow passion fruit rind - a potential fiber source. *J Agric Food Chem*.2008;56:5880-3.
12. Córdova KRV, Gama TMMTB, Winter CMG, Neto GK, Freitas RJS. Características físico-químicas da casca do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* Flavicarpa Degener) obtida por secagem. *Bol CEPPA*.2005;23(2):221-30.
13. Gilcília ID. Efeitos da temperatura de secagem nos teores de compostos cianogênicos totais e fibra alimentar de casca de maracujá [dissertação de mestrado]. Goiânia (GO): Universidade Federal de Goiás; 2011.
14. Marlett JA, Michael IM, Joanne LS. Position of the American Dietetic Association: health implications of dietary fiber. *J Am Diet Assoc*.2002;102.7: 93-1000.
15. Shils ME, Shike ROSS, Caballero B. Tratado de nutrição moderna na saúde e na doença. 10ª ed. São Paulo: Manole; 2009.
16. Ministério da Saúde. Guia Alimentar para a População Brasileira. 2001. Disponível em: [http://dtr2001.saude.gov.br/editora/produtos/livros/pdf/05_1109_M.pdf].
17. Janebro DI, Queiroz MSR, Ramos AT, Sabaa-Sru AVO, Cunha MAL, Diniz MFFM. Efeito de farinha da casca do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis* Flavicarpa Deg.) nos níveis glicêmicos e lipídicos de pacientes diabéticos tipo 2. *Rev Bras Farmacogn*. 2008;18 (Supl.): 724-32.
18. Theuwissen E, Mensink RP. Water-soluble dietary fibers and cardiovascular disease. *Physiol Behav*.2008;94:285-92.
19. Silva DC, Freitas ALP, Pessoa CLOS, Paula RCM, Mesquita JX, Leal LKAM, et al. Pectin from *Passiflora edulis* shows anti-inflammatory actions well as hypoglycemic and hypotriglyceridemic properties in diabetic rats. *J Med Food*.2011;14(10):1118-26.
20. Ichimura T, Yamanaka A, Ichiba T, Toyokawa T, Kamada Y, Tamamura T, et al. Antihypertensive effect of an extract of *Passiflora edulis* rind in spontaneously hypertensive rats. *Biosci Biotech Biochem*.2006;70:718-21.
21. Kozakai T, Yamanaka A, Ichiba T, Toyokawa T, Kamada Y, Tamamura T, et al. Luteolin inhibits endothelin-1 secretion in cultured endothelial cells. *Biosci Biotech Biochem*.2005;69(8):1613-5.
22. Margis R, Cosner AF, Silveira RDO. Relação entre estressores, estresse e ansiedade. *Rev Psiquiat*.2003;65-74.
23. Watson RR, Zibadi S, Rafatpanah, Jabbari F, Ghasemi R, Ghafari J, et al. Oral administration of the purple passion fruit peel extract reduces wheeze and cough and improves shortness of breath in adults with asthma. *Nutr Res*.2008;28:166-71.
24. Farid R, Rezaieyadzi Z, Mirfeizi Z, Mirheidari M, Mansouri H, Esmaili H, et al. Oral intake of purple passion fruit peel extract reduces pain and stiffness and improves physical function in adult patients with knee osteoarthritis. *Nutr Res*.2010;30:601-6.
25. Instituto de Biotecnologia. Ensino de Botânica - Curso de atualização de professores de Educação Básica: A Botânica No Cotidiano. São Paulo: USP; 2008.
26. Spencer KC, Seigler DS. Cyanogenesis of *Passiflora*. *J Agric Food Chem*.1983;31(4):794-6.
27. Lambert JL, Ramasamy J, Paukstelis JV. Stable reagents for the colorimetric determination of cyanide by modified König reactions. *Anal Chem*.1975;47(6).

28. AOAC (1984): Hydrocyanic acid in beans, alkaline titration method. *In: Official Methods of Analysis of the Association of Analytical Chemists*. Williams S (Ed) AOAC Inc., Arlington, VA, USA.
29. Chassagne D, Crouzet JC, Bayonove CL, Barimes RL, et al. Identification and quantification of passion fruit cyanogenic glycosides. *J Agric Food Chem*.1996;44(12):3817-20.
30. Bradbury MG, Egan SV, Bradbury JH. Picrate paper kits for determination of total cyanogens in cassava roots and all forms of cyanogens in cassava products. *J Sci Food Agric*.1999;79:593-601.
31. Burns AE, Bradbury JH, Cavagnaro TR, Gleadow RM. Analysis total cyanide content of cassava food products in Australia. *J Food Composit Anal*.2012;25(1):79-82.
32. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 53, 15 de junho de 2000. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para fixação de identidade e qualidade de mistura à base de farelo de cereais. Brasília, 2000. 12p.
33. Halstrom F, Moller KD. The content of cyanide in human organs from cases of poisoning with cyanide taken by mouth with a contribution to the toxicology of cyanides. *Acta Pharmacol Toxicol*.1945;1:18-28.
34. Cliff JA, Marti A, Molin HR. Mantakassa: An epidemic of spastic paraparesis associated with chronic cyanide intoxication in a cassava staple area of Mozambique. Part I: Epidemiological and clinical and laboratory findings in patients. *WHO Bull*.1984;62:477-84.
35. Ministry of Health. Mantakassa: An epidemic of spastic paraparesis associated with chronic cyanide intoxication in a cassava staple area of Mozambique. Part II: Nutritional factors and hydrocyanic acid content of cassava products. *WHO Bull*.1984;62:485.
36. Adamolekun B. Neurological disorders associated with cassava diet: a review of putative etiological mechanisms. *Metab Brain Dis*.2011; 79-85.
37. Hipólito N, Cliff J. Konzo: from poverty, cassava, and cyanogen intake to toxico-nutritional neurological disease. *PLoS Negl Trop Dis*.2011;5(6):1-8.
38. Medeiros JS, Diniz MFFM, Sabaa-Srur AVO, Pessoa MB, Cardoso MAA, Carvalho DF et al. Ensaio toxicológicos clínicos da casca do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis*, F. Flavicarpa), como alimento com propriedade de saúde. *Rev Bras Farmacogn*.2009; 19(2A):394-9.
39. Maluf E, Barros HMT, Frochtengartin ML, Benti R, Leite JR. Assessment of the hypnotic/sedative effects and toxicity of *Passiflora edulis* aqueous extract in rodents and humans. *Phytother Res*.1991;5(6):262-6.
40. Sena LM. Atividade neurofarmacológica do pericarpo dos frutos de *Passiflora edulis* variedade Flavicarpa Degener (maracujá) em camundongos: envolvimento de flavonóides C-glicosídeos [tese de doutorado]. Florianópolis (SC): Universidade Federal de Santa Catarina; 2009.
41. Carvalho GQ, Alfenas RCG. Índice glicêmico: uma abordagem crítica acerca de sua utilização na prevenção e no tratamento de fatores de risco cardiovasculares. *Rev Nutr*.2008; 21(5):577-87.
42. Ando N, Postau C, Zambrano F, Rigo M, Wagner AS, Coutinho MR et al. Elaboração de *cookie diet* com farinha de casca de maracujá-amarelo. XVI Encontro Anual de Iniciação Científica (PIBIC/CNPq), Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava, PR. 2007.
43. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº. 27, de 13 janeiro de 1998. Aprova o Regulamento Técnico referente à Informação Nutricional Complementar. *Diário Oficial [da] República Federativa [do] Brasil*. Brasília, DF, 16 de janeiro de 1998.
44. Nascimento EMGC, Carvalho CWP, Takeiti CV, Freitas DGC, Ascheri JLR et al. Use of sesame oil cake (*Sesamum indicum* L.) on corn expanded extrudates. *Food Res Int*.2012;45:434-44.
45. Mukhopadhyay N, Bandyopadhyay S. Extrusion cooking technology employed to reduce the anti-nutritional factor tannin in sesame (*Sesamum indicum*) meal. *J Food Eng*.2003;56:201-2.
46. Kelkar S, Siddig M, Harti JB, Dolan KD, Nyombaire G, Suniaga H. Use of low-temperature extrusion for reducing phytohemagglutininactivity(PHA) and oligosaccharides in beans (*Phaseolus vulgaris* L.) cv. Navy and Pinto. *Food Chem*.2012;133:1636-9.
47. Mulla MZ, Bharadwaj VR, Annapure US, Singhal RS. Effect of formulation and processing parameters on acrylamide formation: A case study on extrusion of blends of potato flour and semolina. *LWT Food Sci Technol*.2011;44:1643-8.
48. Ascheri JLR, Carvalho CWP, Machado AFF, Antonia SSIR, Mendonça S, Juan ARR, et al. Efeito de CaO (cálcio) no processamento da torta de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) por extrusão. *In: 2º Congresso Brasileiro de Pesquisas de Pinhão-Manso*. Brasília, 2011.
49. El-Dash AA. Application and control of thermoplastic extrusion of cereals for food and industrial uses. *In: Pomeranz Y, Munich L. Cereals: a renewable resource, theory and practice*. Saint Paul: Am Assoc Cereal Chem. 1981.

Emprego de planilhas eletrônicas, baseadas nas normas ISO e recomendações IUPAC, em curvas analíticas da análise de água

Use of electronic spreadsheets, based on ISO standards and IUPAC guidelines, for assessing the quality of water analytical curves

RIALA6/1537

Sérgio DOVIDAUSKAS^{1*}, Isaura Akemi OKADA¹, Alice Momoyo SAKUMA², Maria Cristina DURAN², Camila Cardoso de OLIVEIRA³

*Endereço para correspondência: ¹Núcleo de Ciências Químicas e Bromatológicas, Centro de Laboratórios Regional de Ribeirão Preto, Instituto Adolfo Lutz. R. Minas, 877, Ribeirão Preto, SP, Brasil, CEP 14085-410. E-mail: sergio2794@terra.com.br, sdovidauskas@ial.sp.gov.br

²Centro de Materiais de Referência, Instituto Adolfo Lutz

³Núcleo de Análise e Tratamento de Dados, Centro de Materiais de Referência, Instituto Adolfo Lutz Recebido: 22.11.2012 - Aceito para publicação: 19.02.2013

RESUMO

Este trabalho descreve o desenvolvimento, a validação e a aplicação de planilhas eletrônicas no software Microsoft Excel® para avaliar a qualidade analítica de gráficos de calibração de funções lineares e homoscedásticas, que são usados em análises físico-químicas de águas por espectrofotometria UV-Vis, e obtidos segundo as normas ISO e recomendações IUPAC. Por meio da inserção dos valores de absorbância, as planilhas apresentam os gráficos de calibração e de resíduos e calculam desvio-padrão residual, desvio-padrão para coeficiente angular, desvio-padrão para intercepto e coeficiente de determinação. Em termos de predições, as planilhas calculam, com 95 % de confiança, o intervalo de predição (apresentado com a respectiva curva com limites superior e inferior), o valor crítico da absorbância, o valor crítico da concentração (x_c), o valor mínimo detectável da concentração (x_D) ou limite de detecção, o limite de quantificação e os intervalos de confiança para amostras. De uma planilha inicial, simplificações foram introduzidas e as planilhas resultantes foram usadas nas análises de nitrato, nitrito e ferro. A influência das simplificações no cálculo dos parâmetros, nas relações entre os parâmetros x_c/x_D da ISO 11843-1,2 e nos parâmetros da Comissão Europeia CC α (limite de decisão)/CC β (capacidade de detecção), são discutidas. **Palavras-chave.** controle de qualidade analítica, curvas analíticas, análise da água, planilhas eletrônicas.

ABSTRACT

This paper describes the development and validation of the electronic spreadsheet in Microsoft Excel® software for evaluating the analytical quality of calibration graphs of linear and homoscedastic functions, used in water physical-chemical analysis by UV-Vis spectrophotometry, and obtained according to ISO standards and IUPAC guidelines. By introducing the absorbance data, the spreadsheet shows the calibration (with respective function) and the residues graphs, and also computes the residual standard deviation, angular coefficient standard deviation, interception standard deviation, and coefficient of determination R^2 . On prediction terms, the spreadsheets calculate (confidence level at 95 %): the prediction interval (showing the respective curve with upper and lower limits), the absorbance critical value, the concentration critical value (x_c), the minimum detectable value of concentration (x_D) or detection limit, the quantification limit, and the confidence intervals for samples. From the initial spreadsheet, simplifications were introduced and the new spreadsheets were used for analyzing nitrate, nitrite and iron. The effect of the simplifications on the parameters calculation, and the correlations between x_c/x_D ISO 11843-1,2 parameters and the CC α (decision limit)/CC β (detection capability) European Commission parameters, were discussed.

Keywords. analytical quality control, analytical curves, water analysis, electronic spreadsheets.

INTRODUÇÃO

Entende-se a Quimiometria como a aplicação da estatística à análise de dados químicos (da química orgânica, analítica ou medicinal) e ao planejamento de simulações químicas e experimentos químicos. Na prática, isto significa planejar ou selecionar as melhores condições para experiências e medidas experimentais, e obter o maior volume de informações a partir da análise dos dados químicos¹⁻³. Com esta abordagem estatística, fica claro que os recursos computacionais são úteis porque reduzem o tempo demandado para os cálculos e proporcionam informações de interpretação direta por meio de gráficos.

Dentro da Quimiometria, os gráficos de calibração ocupam lugar de destaque devido ao seu uso extensivo em Química Analítica, principalmente em técnicas como cromatografia, potenciometria e as espectrofotometrias UV-Visível e de absorção/emissão atômicas, em que sinais analíticos (áreas de picos cromatográficos, diferenças de potencial, absorvâncias ou emissões de radiações) são grafados em função da concentração de um analito de interesse. Deste modo, a relação matemática “sinal = função_(concentração)” pode ser obtida por operações como a regressão linear por mínimos quadrados ordinários, regressão linear por mínimos quadrados ponderados e regressão polinomial⁴⁻⁶. Contudo, não é comum na atividade rotineira de um laboratório expressar ou avaliar a precisão de um gráfico de calibração por meio dos

chamados limites de confiança e de predição (ou intervalos de confiança e predição), devido ao volume de cálculos a serem realizados. Esta situação pode ser visualizada pela Figura 1. A parte A desta figura mostra um gráfico de calibração simples, em que um sinal analítico de absorvância Y^S de uma amostra é associado por interpolação à concentração X^S do analito à que a curva se refere. Já a parte B apresenta o mesmo gráfico em que foram adicionados os limites inferior e superior de predição (ou previsão), expressos como curvas que possuem como eixo de simetria a reta obtida pela regressão linear⁷. Neste segundo caso, podemos associar a incerteza $\pm s$ ao valor de X^S , obtida pela intersecção do sinal Y^S com os limites superior e inferior de predição. Em adição, parâmetros importantes, como os limites de decisão e de detecção são, geralmente, estimados somente no momento da validação do método analítico⁸, não sendo comum um acompanhamento rotineiro do desempenho do método quanto a estes parâmetros, utilizando a precisão de curvas analíticas.

No intuito de colaborar com a melhoria da qualidade nos laboratórios de Saúde Pública, nos quais a obtenção de resultados não tendenciosos, exatos e precisos é imprescindível, este trabalho apresenta planilhas eletrônicas desenvolvidas no software *Microsoft Excel* que avaliam a qualidade analítica de gráficos de calibração de funções lineares e homoscedásticas, rotineiramente utilizados nas análises físico-químicas de águas para consumo humano por métodos validados e baseados em espectrofotometria

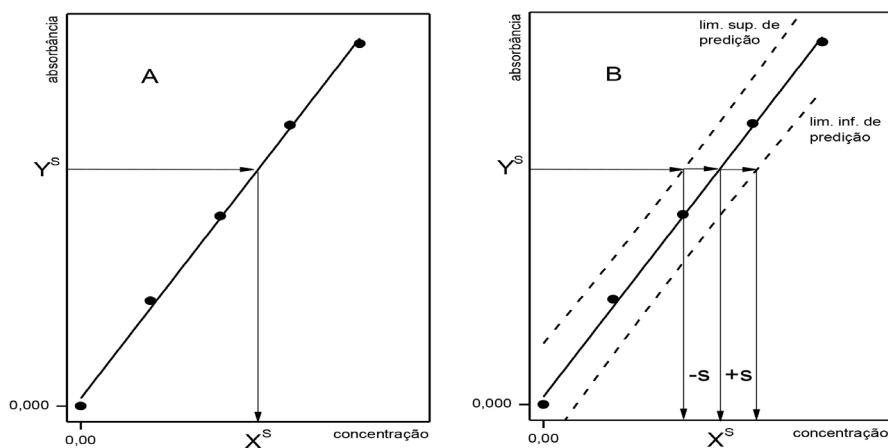


Figura 1. (A) Curva de calibração simples. (B) Curva de calibração acrescida dos limites superior e inferior de predição

UV-Visível. Como exemplos, apresentamos a aplicação dessas planilhas para as determinações de nitrito, ferro e nitrato, que estimam parâmetros das curvas (desvio padrão residual $\hat{\sigma}$, coeficiente angular e \hat{b} respectivo desvio padrão s_b , intercepto \hat{a} e respectivo desvio padrão s_a , coeficiente de determinação R^2), além de apresentar os gráficos de calibração e de resíduos. Na etapa preditiva, é apresentado o gráfico de calibração com os limites superior e inferior de predição, sendo calculados o valor crítico de concentração (limite de decisão para uma probabilidade α de um erro tipo I para o branco do ensaio), o valor mínimo detectável de concentração (capacidade de detecção ou limite de detecção para uma probabilidade β de um erro tipo II) e o valor do limite de quantificação, além de fornecer a predição para a amostra (resultado da função de avaliação analítica para a amostra ou, simplesmente, concentração do analito na amostra) e seu respectivo intervalo de confiança (95 %). Os cálculos envolvidos nas planilhas são baseados nas normas ISO 8466-1⁹, ISO 11095¹⁰, ISO 11843-1,2¹¹ e em recomendações da International Union of Pure and Applied Chemistry, IUPAC^{7,12}. O uso dessas planilhas eletrônicas na rotina permite a avaliação dos resultados obtidos sempre que uma curva de calibração é construída, ou seja, sempre que o método é utilizado.

MATERIAL E MÉTODOS

Os dados experimentais utilizados na elaboração das planilhas são provenientes da análise físico-química de águas, rotineiramente realizadas no Instituto Adolfo Lutz (Regional de Ribeirão Preto) por métodos espectrofotométricos normalizados: nitrito (por espectrofotometria na região Visível, após desenvolvimento de cor com sulfanilamida e N-1-naftil-etilenodiamina, em duas séries diferentes de níveis de concentração), ferro (por espectrofotometria na região Visível, após complexação do íon Fe^{2+} com 1,10-fenantrolina) e nitrato (por espectrofotometria na região UV). Estas determinações estão descritas em literatura pertinente.^{13,14} Os cálculos efetuados pelas planilhas foram validados por comparação dos resultados gerados pelas planilhas com aqueles resultantes do processamento manual dos dados e pela reprodução do tratamento de dados de exemplos de análises que fazem parte das normas ISO 11843-2 e ISO 8466-1.

Cálculo dos parâmetros da função

Uma vez que as planilhas referem-se a quatro métodos analíticos já validados, assumem-se como verdadeiras duas características destes métodos, determinadas durante as respectivas validações: a homoscedasticidade e a linearidade da função de calibração, ou seja, considera-se que os erros estão essencialmente nos valores medidos de absorbância (y), distribuindo-se com desvio padrão constante e independente da concentração (x). Não obstante, os dados de cada método foram submetidos a testes de homoscedasticidade (teste F em que as variâncias foram testadas para diferenças significativas nos limites da faixa de trabalho, ou seja, branco e solução-padrão de maior concentração) e linearidade (teste F em que a diferença entre as variâncias do modelo linear e do modelo não linear, considerado polinômio de grau 2, é comparada com a variância do modelo não linear), conforme norma ISO 8466-1 e recomendação IUPAC^{7,9}. Todos os resultados confirmaram as duas características. Deste modo, uma função linear foi ajustada aos valores experimentais por regressão linear (mínimos quadrados ordinários), resultando na estimativa:

$$\hat{y} = \hat{a} + \hat{b}x \quad (1)$$

em que

$$\hat{b} = \frac{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J (x_i - \bar{x})(\bar{y}_{ij} - \bar{y})}{J \cdot \sum_{i=1}^I (x_i - \bar{x})^2} \quad (2)$$

e

$$\hat{a} = \bar{y} - \hat{b}\bar{x} \quad (3)$$

Os somatórios na equação 2 referem-se a I soluções-padrão de concentrações diferentes usadas no gráfico de calibração, cada uma delas preparadas em J repetições. Assim, por exemplo, um gráfico construído com 5 soluções-padrão (incluindo o branco), cada uma das soluções preparadas em duplicata apresentará $I = 5$ e $J = 2$. Se para cada preparação, de cada solução-padrão, forem efetuadas L medidas de absorbância, temos:

$$\bar{y}_{ij} = \frac{\sum_{l=1}^L y_{ijl}}{L} \quad (4)$$

$$\bar{y} = \frac{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J \sum_{l=1}^L y_{ijl}}{I \cdot J \cdot L} \quad (5)$$

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^I x_i}{I} \quad (6)$$

A precisão na calibração foi caracterizada pelo desvio-padrão residual estimado ($\hat{\sigma}$), pelo desvio-padrão estimado de \hat{b} ($s_{\hat{b}}$) e pelo desvio-padrão estimado de \hat{a} ($s_{\hat{a}}$):

$$\hat{\sigma} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J (\bar{y}_{ij} - \hat{a} - \hat{b}x_i)^2}{(I \cdot J) - 2}} \quad (7)$$

$$s_{\hat{b}} = \frac{\hat{\sigma}}{\sqrt{J \cdot \sum_{i=1}^I (x_i - \bar{x})^2}} \quad (8)$$

$$s_{\hat{a}} = \hat{\sigma} \cdot \sqrt{\frac{1}{I \cdot J} + \frac{\bar{x}^2}{J \sum_{i=1}^I (x_i - \bar{x})^2}} = \hat{\sigma} \cdot \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^I x_i^2}{I \cdot J \sum_{i=1}^I (x_i - \bar{x})^2}} \quad (9)$$

A qualidade do ajuste pôde ser avaliada comparando a variância devida à regressão (SSR) com a variância observada (SST), pelo cálculo do coeficiente de determinação R^2 :

$$R^2 = \frac{SSR}{SST} = \frac{\sum_{i=1}^I (\hat{y}_i - \bar{y})^2}{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J (\bar{y}_{ij} - \bar{y})^2} \quad (10)$$

Cálculos preditivos

As curvas correspondentes ao intervalo de predição foram calculadas pela equação 11, que conduz ao intervalo de confiança de uma média de concentrações \bar{x} obtida a partir de K repetições, expressa pela equação 12:

$$pred_{(\hat{y})} = \hat{y} \pm t_{1-\alpha/2(v)} \cdot \hat{\sigma} \sqrt{\frac{1}{K} + \frac{1}{I \cdot J} + \frac{(x_i - \bar{x})^2}{J \sum_{i=1}^I (x_i - \bar{x})^2}} \quad (11)$$

$$pred_{(\hat{x}_i)} = \hat{x}_i \pm t_{1-\alpha/2(v)} \cdot \frac{\hat{\sigma}}{\hat{b}} \sqrt{\frac{1}{K} + \frac{1}{I \cdot J} + \frac{(\bar{y}_i - \bar{y})^2}{\hat{b}^2 \cdot J \sum_{i=1}^I (x_i - \bar{x})^2}} \quad (12)$$

Em particular, o valor crítico da absorbância (y_c) acima do qual existe a probabilidade α de um erro tipo I para o branco do ensaio foi calculado pela equação 13, em que K é o número de repetições preparadas para as amostras (se, por exemplo, as amostras são analisadas em triplicata, K = 3).

$$y_c = \hat{a} + t_{1-\alpha(v)} \cdot \hat{\sigma} \sqrt{\frac{1}{K} + \frac{1}{I \cdot J} + \frac{\bar{x}^2}{J \sum_{i=1}^I (x_i - \bar{x})^2}} \quad (13)$$

O valor de t Student depende do intervalo de confiança ($1 - \alpha/2$ ou $1 - \alpha$) e do número de graus de liberdade v ($I \cdot J \cdot L - 2$). Se a curva for construída, por exemplo, com 6 soluções-padrão ($I = 6$) em triplicata ($J = 3$), com medida única de absorbância ($L = 1$), então $v = (I \cdot J \cdot L) - 2 = 16$. Observe que, enquanto o intervalo de predição das equações (11) e (12) implica em intervalo de confiança de nível ($1 - \alpha/2$) exigindo, portanto, um valor de t bilateral (ou bicaudal, com teste de hipóteses $H_0: \mu = \mu_0$; $H_a: \mu \neq \mu_0$), o valor de y_c na equação 13 utiliza um valor de t unilateral porque se trata de um teste de hipóteses unilateral ($H_0: \mu = \mu_0$; $H_a: \mu > \mu_0$), como pode ser visualizado na Figura 2A.

y_c é o valor da variável resposta Y (no caso deste trabalho, a absorbância) acima do qual conduz, para uma dada probabilidade α de erro tipo I, à decisão de que o sistema em observação (amostra) não está em seu estado básico (o analito está presente). Ao valor crítico da absorbância (y_c) corresponde o valor crítico da concentração (x_c), acima do qual existe a probabilidade de um erro tipo I para o branco do ensaio.

A partir de $y_c = \hat{a} + \hat{b} \cdot x_c$, x_c pode ser calculado pela equação 14, em que δ representa o parâmetro não-centralidade da distribuição t não-central. O valor mínimo detectável de concentração (x_D) ou limite de detecção (L_D) pode ser calculado pela equação 15; porém, quando $\alpha = \beta$ (β é a probabilidade de um erro tipo II) e $v > 3$, uma aproximação é dada por assim, a equação 16, o que torna possível estimar x_D pela equação 17.

$$x_c = t_{1-\alpha(v)} \frac{\hat{\sigma}}{\hat{b}} \sqrt{\frac{1}{K} + \frac{1}{I \cdot J} + \frac{\bar{x}^2}{J \sum_{i=1}^I (x_i - \bar{x})^2}} \quad (14)$$

$$x_D = \delta \frac{\hat{\sigma}}{\hat{b}} \sqrt{\frac{1}{K} + \frac{1}{I \cdot J} + \frac{\bar{x}^2}{J \sum_{i=1}^I (x_i - \bar{x})^2}} \quad (15)$$

$$\delta_{(v;\alpha;\beta)} \approx 2 \cdot t_{1-\alpha(v)} \quad (16)$$

$$x_D \approx 2 \cdot t_{1-\alpha(v)} \frac{\hat{\sigma}}{\hat{b}} \sqrt{\frac{1}{K} + \frac{1}{I \cdot J} + \frac{\bar{x}^2}{J \sum_{i=1}^I (x_i - \bar{x})^2}} = 2 \cdot x_c \quad (17)$$

Com relação ao limite de quantificação (L_Q), são necessárias algumas observações: (i) a IUPAC não recomenda o seu uso em validação de métodos, afirmando que é preferível expressar a incerteza da medida como uma função da concentração, verificando se esta função cumpre os requisitos do método ou exigências do usuário final dos resultados (cliente)¹²; (ii) o Inmetro (Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia), por sua vez, estabelece algumas maneiras de se calcular o L_Q como, por exemplo, somar 10 desvios-padrão amostrais dos brancos à média dos valores dos brancos da amostra ($L_Q = X_{\text{branco}} + 10s$)¹⁵. Assim, para contornar estas dificuldades em se definir o cálculo de L_Q e tendo em mente que a proposta da planilha não é a validação de um método, mas o controle rotineiro da qualidade analítica da função (ou curva) de calibração de métodos já validados, incluiu-se na planilha o intervalo de predição (incertezas das medidas como funções das concentrações) compreendendo todo o intervalo de concentrações do gráfico de calibração (desde o branco até a maior concentração do analito presente nas soluções-

padrão). Em adição, para fornecer uma concentração maior, que pudesse ser claramente diferenciada do limite de detecção L_D (x_D) e cujo cálculo fosse também baseado na função de calibração, pela experiência dos analistas, optou-se por estimá-lo como o dobro do valor de x_D (equação 18).

$$L_Q = 2 \cdot x_D \quad (18)$$

Consequentemente, para se avaliar a precisão do L_Q , o respectivo desvio-padrão $s_{(L_Q)}$ foi calculado pela equação 19:

$$s_{(L_Q)} = \frac{\hat{\sigma}}{\hat{b}} \sqrt{\frac{1}{K} + \frac{1}{I \cdot J} + \frac{(y_{L_Q} - \bar{y})^2}{\hat{b}^2 \cdot J \sum_{i=1}^I (x_i - \bar{x})^2}} \quad (19)$$

Quando $\alpha = \beta$ e $v > 3$, a aproximação, realizada na obtenção da equação 16, conduz, nesse caso, a

$$L_Q = 2 \cdot x_D \approx 4 \cdot x_c \quad (20)$$

e

$$y_{L_Q} = \hat{a} + \hat{b} x_{L_Q} \approx \hat{a} + \hat{b} \cdot 4 \cdot x_c \quad (21)$$

Finalmente, a dispersão em torno do L_Q foi também expressa pelo cálculo do coeficiente de variação ($CV_{\%}$):

$$CV_{(L_Q)\%} = \frac{s_{(L_Q)}}{L_Q} \cdot 100 \quad (22)$$

Uma visualização gráfica dos cálculos de y_c , x_c , x_D (ou L_D) e L_Q é exibida na Figura 2.

RESULTADOS

Validação das planilhas

Assim como é necessário validar um método analítico para que se comprove a sua adequação à finalidade a que se propõe (em termos de exatidão, precisão, seletividade, robustez etc.), em planilhas como as que foram desenvolvidas neste trabalho, criadas em

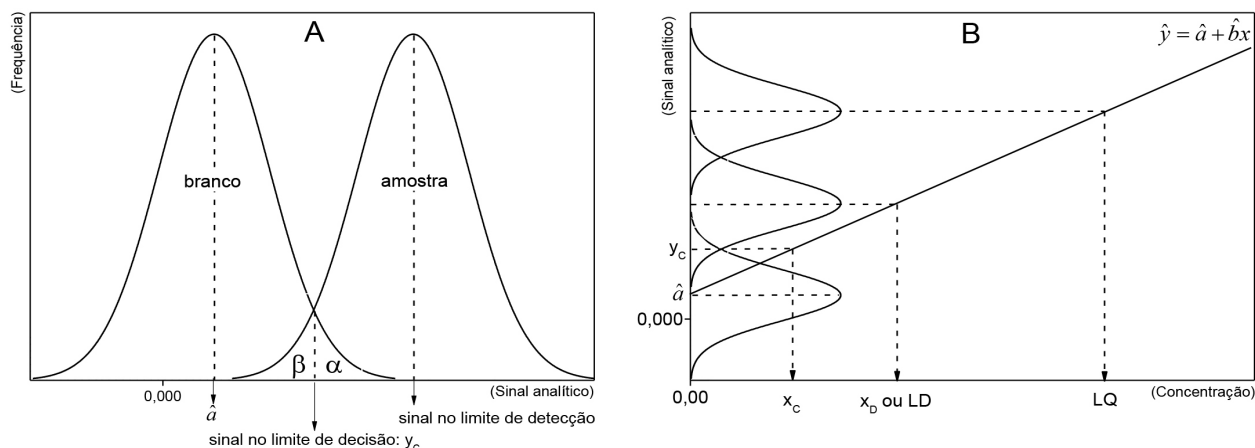


Figura 2. Visualização gráfica: (A) das distribuições amostrais das médias dos sinais analíticos para o branco e para a amostra nos limites de decisão e de detecção – α é a probabilidade de um erro tipo I e β é a probabilidade de um erro tipo II; (B) das determinações de y_c , x_c , x_D (ou LD) e LQ para a função de calibração $\hat{y} = \hat{a} + \hat{b}x$

software comercial (*Excel*), deve-se ter um cuidado especial em demonstrar que os cálculos nelas inseridos estejam corretos. As planilhas foram validadas de duas maneiras: (i) pela reprodução de exemplos de cálculos que fazem parte das normas ISO 11843-2 e ISO 8466-1 e (ii) pela comparação dos resultados gerados pelas planilhas com os resultantes do processamento manual dos dados.

Quando dados constantes em exemplos de duas normas ISO (dados de entrada) foram inseridos nos campos a eles designados em duas planilhas diferentes, foi observada concordância entre os resultados apresentados pelas normas e aqueles calculados pelas respectivas planilhas (Tabela 1). Posteriormente, simplificações foram introduzidas nas planilhas de modo a contemplar o seu uso em rotina laboratorial e, na comparação com o processamento manual dos dados, todas as planilhas, simplificadas ou não, mostraram resultados em concordância.

Aplicação das planilhas

O conceito inicial que norteou o desenvolvimento das planilhas era possibilitar que a simples introdução de dados obtidos experimentalmente (dados de entrada ou dados brutos como valores de absorbância, por exemplo), e que são frequentemente grafados em cadernos específicos durante a realização de uma análise, pudesse

obter como dados de saída (resultados) não somente as concentrações dos analitos nas amostras, mas também os respectivos intervalos de confiança. Posteriormente, constatou-se que seria também interessante ter uma visão geral da qualidade analítica da curva de calibração construída (tendo em mente que o erro analítico é uma combinação da incerteza na determinação do valor medido e da incerteza na estimativa dos coeficientes da regressão), bem como acessar alguns parâmetros de relevância, como o L_D e o L_Q . Assim, a Figura 3 apresenta uma vista geral de uma planilha desenvolvida, na forma simplificada, para a análise de nitrito em águas para consumo humano por espectrofotometria. Contudo, deve ser ressaltado que as planilhas aqui apresentadas continuarão a ser aperfeiçoadas, seja na sua apresentação, seja na inclusão de cálculos adicionais, ou, ainda, na sua adaptação a outras situações (como na análise de alimentos, por exemplo), em sintonia com a filosofia da qualidade em termos da melhoria contínua.

Na Figura 3 podemos observar a demarcação de 6 regiões: na região A estão os campos (células no software *Excel*) para identificação geral da análise (analito, data, analista e responsável pelo preenchimento da planilha); na região B estão os campos para os dados iniciais de entrada (6 concentrações em mg/L das soluções-padrão, e respectivas absorbâncias a 543 nm); uma vez introduzidos estes dados, são produzidos resultados nas regiões C, D e E. Na região C

Tabela 1. Validação de planilhas desenvolvidas por comparação com exemplos em normas ISO

Parâmetro	Comparação com ISO 11843-2 (I = 6; J = 3; L = 1; K = 3)		Comparação com ISO 8466-1 (I = 10; J = 1; L = 1; K = 3)	
	Resultados da norma	Resultados da planilha ^a	Resultados da norma	Resultados da planilha ^a
\bar{x}	1,1167	1,11667	0,275	0,275
$S_{xx} = J \cdot \sum(x_i - \bar{x})^2$	20,425	20,425	Não calculado	Não calculado
\hat{a}	$9,9959 \times 10^{-5}$	$9,99592 \times 10^{-5}$	0,018	0,018
\hat{b}	0,02374	0,023741	2,5752	2,57527 ^b
$\hat{\sigma}$	$1,1099 \times 10^{-3}$	$1,10993 \times 10^{-3}$	0,0052	0,00517
y_c	0,00140	0,001399	Não calculado	Não calculado
x_c	0,055	0,0548	Não calculado	Não calculado
x_D	0,110	0,1095	Não calculado	Não calculado
\hat{x}	Não calculado	Não calculado	$0,240 \pm 0,003$	$0,2396 \pm 0,0031$

^aResultados fornecidos com uma casa decimal adicional em relação àqueles constantes nas respectivas normas

^bEste resultado foi confirmado pelas regressões realizadas nos softwares *Excel*® 2010 e *Origin* 8.1, assim como por processamento manual dos dados

estão indicados parâmetros da regressão linear (\hat{a} , \hat{b} , $s_{\hat{a}}$, $s_{\hat{b}}$, $\hat{\sigma}$, R^2); na região D estão informados os 3 gráficos resultantes: curva de calibração, gráfico de resíduos e limites de predição. Este último gráfico é resultado do processamento de dados da região E que indica também: y_c , x_c , y_{LQ} , x_{LQ} , x_D (L_D), L_Q , s_{LQ} e CV_{LQ} . Em adição, os resultados para x_D (L_D), L_Q , s_{LQ} e CV_{LQ} são convertidos para a sua expressão em termos de concentração de nitrito (NO_2^-), uma vez que os dados de concentração das soluções-padrão são introduzidos na planilha em termos de concentração de nitrogênio (N-NO_2^-) – tal conversão foi introduzida em vista da diferença no estabelecimento dos Valores Máximos Permitidos (VMP) entre a legislação da água destinada ao consumo humano proveniente de sistema e solução alternativa de abastecimento (Portaria 2914/11¹⁶, concentração em N-NO_2^-) e a legislação para águas envasadas e gelo (Resolução RDC n° 274/05¹⁷, concentração em NO_2^-). Finalmente, na região F, estão as células para a introdução de dados sobre as amostras: identificação, valores de absorbância e fatores de diluição – como resultados, aparecem as concentrações (mg/L), em N-NO_2^- e em NO_2^- , acompanhadas dos respectivos intervalos de confiança (95 %).

De estrutura similar à da Figura 3 são as planilhas adaptadas para as determinações de nitrato, ferro e nitrito (a concentrações maiores) em águas para consumo humano. A Tabela 2 exhibe valores típicos dos parâmetros calculados pelas planilhas. A planilha desenvolvida para nitrito a concentrações mais elevadas foi adaptada da constante na Figura 3, simplesmente pelo aumento dos níveis de concentração das soluções-padrão, uma vez que

o VMP estabelecido para águas provenientes de sistema e solução alternativa de abastecimento é aproximadamente 160 vezes maior que o VMP para águas envasadas e gelo, considerando a comparação dos VMPs em uma expressão comum: ou concentração em N-NO_2^- , ou concentração em NO_2^- . Após serem submetidas à validação por processamento manual dos dados, as quatro planilhas vêm sendo utilizadas rotineiramente no IAL de Ribeirão Preto. Em adição, na Tabela 2 estão indicadas as concentrações das soluções-padrão utilizadas nas respectivas curvas de calibração.

DISCUSSÃO

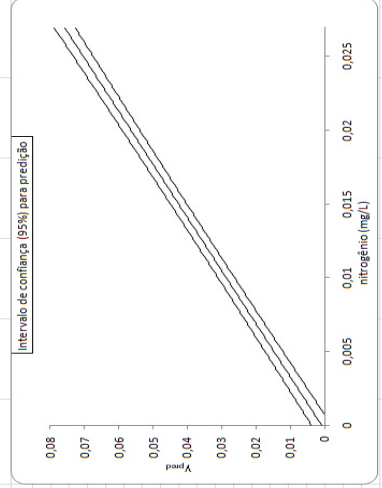
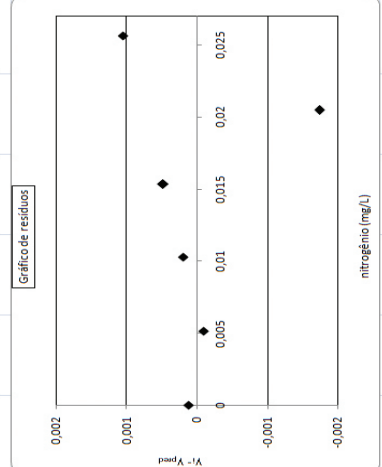
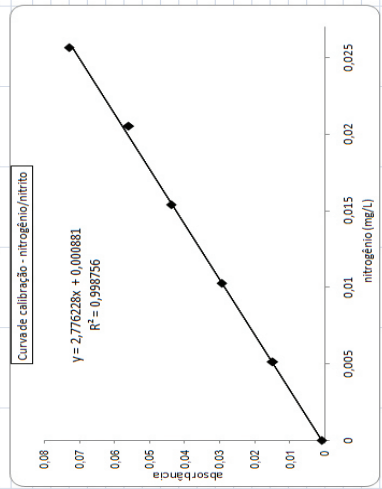
Uma primeira demonstração da versatilidade da planilha pode ser extraída das duas primeiras colunas da Tabela 2: a simples mudança dos níveis de concentração das soluções-padrão empregadas pode ajustar a curva aos níveis de detecção e quantificação desejados. Assim, enquanto o primeiro método (primeira planilha, primeira coluna da Tabela 2) para nitrito apresenta $L_D = 0,0016 \text{ mgN-NO}_2^-/\text{L}$ (= $0,0054 \text{ mgNO}_2^-/\text{L}$) e $L_Q = 0,0033 \text{ mgN-NO}_2^-/\text{L}$ (= $0,011 \text{ mgNO}_2^-/\text{L}$), o segundo método (segunda coluna da Tabela 2) apresenta $L_D = 0,0027 \text{ mgN-NO}_2^-/\text{L}$ (= $0,0090 \text{ mgNO}_2^-/\text{L}$) e $L_Q = 0,0054 \text{ mgN-NO}_2^-/\text{L}$ (= $0,018 \text{ mgNO}_2^-/\text{L}$). Como este último limite de quantificação está muito próximo do VMP pela Resolução RDC n° 274/05 ($0,02 \text{ mgNO}_2^-/\text{L}$), seria justificada a utilização da primeira planilha na análise de águas envasadas e gelo.

Com algumas modificações, a planilha também pode ser adaptada a situações diferentes das apresentadas

A	ANÁLISE DE NITRITO	Data: 06/12/2011
Análise:	NONOMO	Planilha preenchida por: SÉRGIO

CURVA DE CALIBRAÇÃO

Identificação padrão	Concentração mg/L, xi		Absorbância 543 nm		Média, Yi	xi - xi_m	(xi - xi_m) ²	Yi - Yi_m	(Yi - Yi_m) ²	(xi - xi_m)(Yi - Yi_m)	Ymes	Yi - Ymes	Ymes - Yi_m	(Ymes - Yi_m) ²	(Yi - Ymes) ²	(xi) ²	C			
	Abs 1	Abs 2	Abs 1	Abs 2													$\hat{y} = \hat{a} + \hat{b}x$	$\hat{\sigma}(S_{y x})$	desv. padr. residual, (G _i -a)	desv. padr. =
padrão 1 (lco)	0	0,002	0,001	0,002	0,001	-0,0128	0,00016384	-0,035416867	0,00125434	0,000453333	0,00080852	0,000119048	-0,035535714	0,001262787	1,41723E-08	0	$\hat{\sigma}(S_{y x})$	desv. padr. residual, (G _i -a)	desv. padr. =	
padrão 2	0,00512	0,015	0,035	0,015	0,035	-0,00768	5,89824E-05	-0,021416667	0,000458674	0,00016448	0,015095238	-9,52381E-05	-0,021321429	0,000454603	9,0729E-09	2,62144E-05	b =	2,776228	desv. padr. =	0,04899
padrão 3	0,01024	0,03	0,0295	0,029	0,0295	-0,00256	6,5536E-06	-0,008916667	4,79403E-05	1,71067E-05	0,029309524	0,000190476	-0,007107143	5,05119E-05	3,62812E-08	0,000104858	a =	0,000881	desv. padr. =	0,00076
padrão 4	0,01536	0,043	0,044	0,043	0,044	0,00256	6,5536E-06	0,007583333	5,75069E-05	0,04352381	0,00047619	0,000710743	0,007107143	5,05119E-05	2,26757E-07	0,00023593	R ² =	0,998756		
padrão 5	0,02048	0,055	0,056	0,057	0,056	0,00768	5,89824E-05	0,019583333	0,000393007	0,0001504	0,057738095	-0,001738095	0,021321429	0,000454603	3,02098E-06	0,00041943	t _{0,95;sig} , unil. =	2,132		
padrão 6	0,0256	0,073	0,073	0,073	0,073	0,0128	0,00016384	0,036583333	0,00133834	0,00048267	0,071952381	0,001047619	0,036535714	0,001262787	1,09751E-06	0,00065536	t _{0,95;sig} , bil. =	2,776		
Média/Soma	0,0128	0,073	0,036416667	0,073	0,036416667				0,000540208	0,0012736				0,000535604	4,40478E-06	0,001447792				



PREDIÇÃO

Y crítico =	0,003144737	ua	X crítico =	0,000815417	mg/L
Y _{lq} =	0,00953609	ua	X _{lq} =	0,00326167	mg/L
NITROGÊNIO					
LD, [N] =	0,001630835	mg/L	LD, [N _{ox}] =	0,005358457	mg/L
LQ, [N] =	0,00326167	mg/L	LQ, [N _{ox}] =	0,010716915	mg/L
DP (LQ) =	0,000315029	mg/L	DP (LQ) =	0,00035095	mg/L
CV (LQ) =	9,658514824	%	CV (LQ) =	9,658514824	%

Intervalo de predição, amostra em duplicata, C = 0,95			
X	Y _{predito}	Lim. superior	Lim. inferior
0	0,00080952	0,003282544	-0,002066639
0,0001	0,001168675	0,004981155	-0,001781004
0,0002	0,001436198	0,004367806	-0,00149541
0,0003	0,001713821	0,0046375	-0,001209859
0,0004	0,001991443	0,004907293	-0,000924348

AMOSTRAS

Amostra	Abs 1	Abs 2	Abs média	Conc N-NO ₂	95% conf. +/-	Fator diluição	Nitrogênio, N-N _{ox}	95% conf. +/-	Nitrito, N _{ox}	95% conf. +/-
XXXX-2012	0,3	0,31	0,305	0,1095	0,0054	1	0,1095	0,0054	0,360	0,018
XXXX-2012	0,005	0,005	0,005	0,0015	0,0009	1	0,0015	0,0009	0,005	0,003
XXXX-2012	0,009	0,01	0,0095	0,0031	0,0009	1	0,0031	0,0009	0,010	0,003
XXXX-2012	0,018	0,019	0,0185	0,0063	0,0009	1	0,0063	0,0009	0,021	0,003

Figura 3. Visualização geral de uma das planilhas desenvolvidas (análise de nitrito), com a demarcação de 6 regiões A-F (veja texto para a discussão destas regiões)

neste trabalho. Por exemplo, ao passarmos de uma curva com 6 soluções-padrão (como as indicadas na Tabela 2) para 5 soluções (incluindo o branco), as seguintes modificações são necessárias: σ deve ser recalculado para 3 graus de liberdade (equação 7); na expressão de s_a (equação 9), o denominador na raiz deve incluir agora $I = 5$) e modificações semelhantes devem ser realizadas nas equações 11-15 e 19; como na planilha existem duas células específicas para valores de t , cada uma delas designada para os casos unilateral e bilateral, a substituição destes valores de t pelos correspondentes à nova situação (3 graus de liberdade) promoverá a modificação automática das células que fazem uso destes valores (equações 11-15 e 19).

O exposto no parágrafo anterior conduz a outra consideração: a simplificação das planilhas, refletindo a simplificação dos métodos rotineiros quando comparados aos respectivos métodos nas condições de validação. Por exemplo: em uma validação, uma série de, no mínimo, 5 soluções-padrão são preparadas ($I \geq 5$) em, no mínimo, 3 replicatas ($J \geq 3$), e em cada solução preparada são

realizadas, no mínimo, duas medidas do sinal analítico ($L \geq 2$); em uma típica análise de rotina, uma série única de 5 soluções-padrão é preparada ($I = 5, J = 1$) e a medida do sinal analítico de cada solução-padrão é realizada no início e no final da análise ($L = 2$). O impacto dessa simplificação do método, essencialmente sobre os parâmetros envolvendo precisão ($\sigma, s_a, s_b, \text{pred}_{(y)}, \text{pred}_{(xi)}, y_c, x_c, x_d, L_Q, s_{(LQ)}, CV_{(LQ)}$) é controlado pela planilha, permitindo avaliar se o método, quando usado em rotina, não perde significativamente sua qualidade analítica, retendo satisfatoriamente suas características definidas na validação.

Além de controlar a qualidade analítica da curva de calibração entre as análises (ao longo do tempo, desde a validação do método), a planilha permite também o diagnóstico gráfico de ocorrências não usuais na construção da curva de calibração da análise sendo realizada como, por exemplo, a preparação inadequada de uma das soluções-padrão: esta solução poderá ser identificada pelo gráfico de resíduos, enquanto as curvas de intervalos de predição apresentarão um afastamento anormal da reta de calibração. Estes recursos visuais

Tabela 2. Resultados típicos de cálculos das planilhas desenvolvidas neste trabalho

Parâmetro	Resultados das planilhas ^a			
	Nitrito (0 a 0,025 mgN/L) ^b	Nitrito (0 a 0,20 mgN/L) ^b	Nitrato (0 a 2,0 mgN/L) ^b	Ferro (0 a 0,80 mgFe/L) ^b
\bar{x} (mg/L)	0,0128	0,0887	0,867	0,35
$S_{xx} = J \cdot \sum(x_i - \bar{x})^2$	0,000459	0,0318	3,033	0,475
\hat{a}	0,0009	0,00036	0,013	0,008
s_a	0,0008	0,0012	0,004	0,002
\hat{b}	2,776	2,865	0,258	0,200
s_b	0,049	0,011	0,003	0,003
σ	0,00105	0,00192	0,00577	0,00232
R^2	0,99876	0,99994	0,99934	0,99887
y_c	0,0031	0,0043	0,025	0,013
x_c (mg/L)	0,0008	0,00137	0,046	0,024
x_d (mg/L)	0,0016	0,0027	0,091	0,048
L_Q (mg/L)	0,0033	0,0054	0,18	0,095
$s_{(LQ)}$ (mg/L)	0,0003	0,0005	0,02	0,010
$CV_{(LQ)}$ (%)	9,7	10,0	11,1	10,2

^aCálculos baseados em: $K = 2$ (amostras em duplicata); $I = 6$ (6 soluções-padrão); $J = 1$ (uma preparação para cada solução-padrão); $L = 2$ (duas medidas de absorbância em cada solução-padrão). ^bFaixa de concentrações das soluções-padrão

permitem a tomada de decisão para uma ação corretiva imediata, como substituir a solução-padrão inadequadamente preparada, antes que as amostras sejam analisadas. Resumindo, além da análise da qualidade analítica da curva de calibração por meio de parâmetros numéricos, o analista dispõe de informações gráficas facilmente interpretáveis.

Para finalizar esta discussão, tornam-se necessárias algumas considerações sobre os parâmetros $CC\alpha$ (limite de decisão) e $CC\beta$ (capacidade de detecção), definidos pela Comissão das Comunidades Europeias (CCE) em 2002¹⁸ e utilizados pelo Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes – Animal (PNCRC-Animal) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento¹⁹. Por definição, $CC\alpha$ significa o limite a partir do qual pode ser concluído, com uma probabilidade de erro α , que uma amostra é não conforme, enquanto $CC\beta$ significa o menor conteúdo da substância que pode ser detectado, identificado e/ou quantificado em uma amostra com uma probabilidade de erro β . No caso de substâncias para as quais não foram estabelecidos limites permitidos (ou seja, para substâncias proibidas), $CC\beta$ é a mais baixa concentração na qual um método é capaz de detectar amostras contaminadas com uma certeza estatística de probabilidade $1 - \beta$. No caso de substâncias com limites permitidos estabelecidos (VMPs), $CC\beta$ é a concentração na qual o método é capaz de detectar concentrações dentro do limite permitido com certeza estatística de probabilidade $1 - \beta$. Em outras palavras, nas situações envolvendo $CC\beta$, o poder do teste de hipóteses aplicado é $1 - \beta$. Portanto, primeiramente, é preciso salientar que tanto $CC\alpha$ quanto $CC\beta$ referem-se ao domínio das concentrações, e não ao domínio dos sinais analíticos. Em segundo lugar, em se tratando de concentrações, é interessante comparar as formas de cálculo propostas. Em ambos os casos, limites permitidos estabelecidos ou não estabelecidos, a CCE estabelece que uma das formas de se calcular $CC\alpha$ seria por meio do procedimento indicado pela ISO 11843-1,2 (procedimento este que foi utilizado na preparação da planilha inicial deste trabalho, e seguido nas planilhas simplificadas seguintes), mas, ao invés de utilizar a “studentização” dos dados (distribuições t, sendo t o quociente de um resíduo por uma estimativa do desvio-padrão) na previsão de $CC\alpha$ (esta “studentização” conduz à obtenção de x_c da ISO, ou do valor crítico da concentração neste trabalho), adota a abordagem de fazer a previsão considerando distribuição normal para $CC\alpha$ e, como medida de dispersão, o desvio

padrão de precisão intermediária do intercepto ($\alpha = 1\%$) ou do limite permitido ($\alpha = 5\%$), para substâncias com limites permitidos não estabelecidos ou estabelecidos, respectivamente. Observações semelhantes podem ser feitas com relação ao cálculo de $CC\beta$. Esta diferença de abordagem entre ISO e CCE (dados “studentizados” versus dados normais) já havia sido observada em 2004 por Desimoni²⁰ ao criticar algumas das propostas da CCE.

CONCLUSÃO

A proposta deste trabalho foi demonstrar que parâmetros importantes de uma curva de calibração podem ser controlados rotineiramente com facilidade, desde que planilhas de cálculo sejam criteriosamente construídas em software acessível, tendo em mente que a melhoria da qualidade analítica dos resultados gerados por laboratórios de Saúde Pública deve ser uma busca incessante, dada a importância dos laudos gerados, em consequência destes resultados, na tomada de decisão.

REFERÊNCIAS

1. Malinowski E. Factor analysis in chemistry. 3rd ed. New York: John Wiley and Sons, Inc.; 2002.
2. Miller J, Miller J. Statistics and chemometrics for analytical chemistry. 4th ed. Harlow: Pearson Education Limited; 2000.
3. Otto M. Chemometrics - Statistics and computer application in analytical chemistry. 2nd ed. Weinheim: WILEY-VCH; 2007.
4. Custodio R, Andrade J, Augusto F. O ajuste de funções matemáticas a dados experimentais. *Quim Nova*. 1997;20(2):219-25.
5. Mendham J, Denney R, Barnes J, Thomas M. Vogel - Química Analítica Quantitativa. Rio de Janeiro: LTC Livros Técnicos e Científicos Editora SA; 2002.
6. Skoog D, West D, Holler F, Crouch S. Fundamentals of Analytical Chemistry. 8th ed. Belmont: Brooks/Cole - Thomson Learning Inc.; 2004.
7. Danzer K, Currie LA. Guidelines for calibration in analytical chemistry. Part 1. Fundamentals and single component calibration. *Pure Appl Chem*. 1998;70(4):993-1014.
8. Ribeiro F, Ferreira M, Morano S, Silva L, Schneider R. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. *Quím Nova*. 2008;31(1):164-71.
9. ISO. Water quality - Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics. International Organization for Standardization. 1990:ISO 8466-1.
10. ISO. Linear calibration using reference materials. International Organization for Standardization. 1996:ISO 11095.
11. ISO. Capability of detection. International Organization for Standardization. 1997:ISO 11843-1,2.

12. Thompson M, Ellison S, Wood R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. *Pure Appl Chem*. 2002;74(5):835-55.
13. APHA, AWWA, WEF. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 19th ed. AD E, LS C, AE G, editors. Washington DC: American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation; 1995.
14. Instituto Adolfo Lutz (São Paulo - Brasil). *Métodos físico-químicos para análise de alimentos: Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz*. 4^a ed. Brasília: (DF) Anvisa; 2005.
15. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia - INMETRO. Cgcre-8 4: Orientação sobre validação de métodos analíticos - Revisão 04 [acesso 2012 Out]: Disponível em [http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8_4.pdf].
16. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº 2914, de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, 14 dez. 2011. Seção 1, p. 39-46.
17. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 274, de 22 de setembro de 2005. Aprova o Regulamento técnico para águas envasadas e gelo. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, 23 set. 2005. Seção 1, p. 376-377.
18. Commission E. Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. *Off J Eur Comm*. 2002; L221:8-36.
19. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 24 de 14 de julho de 2009. Define os requisitos e critérios específicos para funcionamento dos Laboratórios de Análises de Resíduos e Contaminantes em Alimentos integrantes da rede Nacional de Laboratórios Agropecuários. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, 22 jul. 2009. Seção 1, p. 7-15.
20. Desimoni E. About CC α and CC β as introduced by the Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC. *Accred Qual Assur*. 2004;9:724-5.

Avaliação do residual de bifenilos policlorados em músculo congelado e lombo cozido congelado de atum (*Katsuwonus pelamis*)

Occurrence of polychlorinated biphenyl residues in frozen muscle and frozen cooked loin of tuna (*Katsuwonus pelamis*)

RIALA6/1538

Amara da Silva LIMA^{1*}, Milton Luiz Pinho ESPÍRITO SANTO¹, Caroline Irizaga GONÇALVES¹, Gilberto FILLMANN²

Endereço para correspondência: ¹Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Avenida Cidade de Pelotas, 752, Rio Grande, RS, Brasil, CEP: 96211-001. Tel: 53 9113-3743. E-mail amaraslima@bol.com.br

²Instituto de Oceanografia, Universidade Federal do Rio Grande (FURG).

Recebido: 31.08.2011 - Aceito para publicação: 14.03.2013

RESUMO

A fim de identificar uma possível contaminação por bifenilos policlorados (PCBs) e avaliar a influência do processamento do pescado nos níveis residuais desses compostos, foram investigados 41 congêneres de PCBs em amostras de músculo congelado e de lombo cozido congelado de atum (*Katsuwonus pelamis*) provenientes da indústria de pescado de Rio Grande/RS. As amostras foram extraídas por Soxhlet, purificadas, fracionadas e analisadas por cromatografia de fase gasosa com detecção por captura de elétrons (CG-DCE). O somatório das concentrações dos PCBs analisados nas amostras variou de 0,58 a 95 ng.g⁻¹ (peso lipídico). Apesar de os resultados indicarem a presença de congêneres de PCBs em todas as amostras de atum (*Katsuwonus pelamis*), os valores estavam abaixo do limite estabelecido pela legislação da União Europeia para produtos de origem animal (200 ng.g⁻¹ peso lipídico). No Brasil, o limite é de 3.000 ng.g⁻¹ (peso lipídico). A comparação entre os valores detectados revelou que as amostras processadas possuíam maiores concentrações de PCBs e que o manuseio do pescado pode ser um fator que influência na concentração final do contaminante.

Palavras-chave. atunídeos, contaminantes organoclorados, pescado processado.

ABSTRACT

In order to identify a possible contamination by polychlorinated biphenyls (PCBs) and to evaluate the effect of the fish processing upon the residue contents of these compounds, 41 PCBs congeners were investigated in samples of frozen muscle and frozen cooked loin of tuna (*Katsuwonus pelamis*) from a fishery industry of Rio Grande/RS. Samples were extracted by Soxhlet, purified, fractionated and analyzed by gas chromatography with electron capture detector (GC-ECD). The PCBs concentrations in the analyzed samples ranged from 0.58 to 95 ng.g⁻¹ (lipid weight). Although the results indicated the occurrence of PCBs congeners in all of tuna (*Katsuwonus pelamis*) samples, the contents were lower than the maximum value established by the European Union legislation for products from animal origin (up to 200 ng.g⁻¹ lipid weight). In Brazil, the maximum permitted contents is 3000 ng.g⁻¹ (lipid weight). The comparison among the detected amounts evidenced that the processed samples showed higher concentrations of PCBs; thus, the fish processing might be a factor which cause effect on the final contaminant concentration.

Keywords. tuna, organochlorine contaminants, processing fish.

INTRODUÇÃO

Os poluentes orgânicos persistentes (POPs) são compostos químicos sintéticos que possuem uma grande persistência ambiental (resistentes à degradação), são lipofílicos, passíveis de bioacumulação nos organismos e biomagnificação ao longo da cadeia trófica e apresentam toxicidade, o que os tornam nocivos para a saúde e o ambiente. Além disso, os POPs podem ser transportados a longas distâncias no ar, água e espécies migratórias, podendo se acumular nos ecossistemas terrestres e aquáticos¹.

Em 2001, entrou em vigor a Convenção de Estocolmo, com o objetivo de eliminar, em nível mundial, a produção e o uso dos POPs, sendo que o Brasil adotou esta convenção em maio de 2004. A Convenção incluiu, inicialmente, doze substâncias químicas perigosas, entre elas os bifenilos policlorados (PCBs), para serem banidas².

Os PCBs são substâncias químicas que tiveram diversas aplicações industriais como, por exemplo, o uso como fluido de troca térmica em trocadores de calor e dielétrico em transformadores e capacitores. Seu amplo uso foi devido às suas propriedades de resistência a altas temperaturas, baixa volatilidade, resistência à oxidação e redução e, também, resistência à ação dos ácidos, álcalis e outros agentes químicos. Tais propriedades proporcionam aos PCBs, assim como aos organoclorados em geral, um alto grau de estabilidade e uma grande importância como contaminantes ambientais e, conseqüentemente, de todos os alimentos que formam parte da cadeia alimentar³.

Os PCBs possuem 209 congêneres contendo entre 1 e 10 átomos de cloro. Estas substâncias foram produzidas em vários países, com diferentes denominações, mas o principal produtor mundial foi a Monsanto, nos Estados Unidos, com a marca "Aroclor". No Brasil, foi comercializado com o nome de "Ascarel"⁴.

Embora a produção e uso de muitos compostos organoclorados tenha sido banida de alguns países, consideráveis quantidades de PCBs podem estar armazenadas em áreas de depósitos de resíduos. As legislações restringem o uso de novos equipamentos elétricos contendo PCBs, mas permitem o uso de equipamentos antigos que contenham PCBs até o término de sua vida útil, tornando-se assim possíveis fontes de contaminação ambiental^{4,5}.

A preocupação acerca dos PCBs está centrada no potencial toxicológico, principalmente como indutores de câncer⁶. A toxicidade dos PCBs está relacionada com a sensibilidade do indivíduo, a disposição dos átomos de

cloro e o número destes na molécula⁷. Nas exposições não ocupacionais, produzem-se quadros de intoxicações agudas devido ao consumo de alimentos contaminados com PCBs, procedentes de fontes geralmente associadas a produção ou processamento dos alimentos. Um incidente ocorrido na Bélgica, que envolveu a contaminação incidental de alimentos e contaminação de milhões de pessoas, serviu como alerta para que autoridades sanitárias aumentassem o rigor no monitoramento nos níveis de PCBs em alimento de origem animal na Comunidade Europeia⁸.

Contaminantes persistentes e lipofílicos como os PCBs podem se acumular nos organismos e atingir, graças ao processo de biomagnificação, concentrações muito elevadas nos níveis mais altos da cadeia alimentar⁹. Desta forma, os organismos bioindicadores são muito utilizados em estudos de contaminação ambiental. Segundo Ueno e colaboradores¹⁰, os atunídeos refletem os níveis de contaminação por POPs da região onde são capturados, devido ao rápido equilíbrio destes compostos entre a água do mar e a gordura corporal nessa espécie. Os PCBs são lipofílicos e se armazenam preferencialmente nos tecidos adiposo ou com elevado teor de lipídios podendo, portanto, ser encontrados em outros tecidos e fluidos corpóreos¹¹. Estes fatos fazem do atum (*Katsuwonus pelamis*) um bioindicador apropriado para o monitoramento da contaminação por PCBs. Porém, além de bioindicador ambiental, o atum também é uma importante fonte de proteína na alimentação humana.

Considerando os efeitos adversos produzidos pelos compostos clorados, torna-se importante o monitoramento dos níveis de PCBs em alimentos produzidos destinados ao consumo humano, bem como verificar uma possível alteração nestes valores devido ao processamento do alimento. Neste sentido, deve-se considerar que a contaminação dos alimentos pode também ocorrer durante sua produção, ou mesmo durante sua armazenagem, manuseio ou industrialização. Assim sendo, o presente trabalho tem por objetivo avaliar o nível de contaminação por PCBs no músculo do atum (*Katsuwonus pelamis*), assim como verificar se o processo de cozimento influencia na concentração final dos contaminantes.

MATERIAL E MÉTODOS

Matéria-prima

A matéria-prima utilizada foi o atum (*Katsuwonus pelamis*), fornecido e processado por uma indústria

pesqueira do município de Rio Grande/RS. O pescado foi capturado próximo ao Chuí, extremo sul do Rio Grande do Sul, por barco atuneiro que utiliza a técnica de “isca-viva”. Após a captura, o pescado foi congelado a bordo por imersão em salmoura saturada com temperatura inferior a -15 °C. Foram analisadas 20 amostras de músculo de pescado, sendo dez amostras pré e dez pós o processo de obtenção do lombo de atum cozido congelado. As amostras foram obtidas de um mesmo lote (conjunto de espécimes que compõe uma carga/desembarque). As amostras, devidamente identificadas e acondicionadas em papel alumínio, foram mantidas congeladas a -18 °C até o momento das análises.

Análises

A análise de PCBs seguiu metodologia descrita por Kannan et al¹² e Nakata et al¹³. Uma massa exata (~10 g) de músculo foi macerada com sulfato de sódio anidro (JT Baker; pureza mínima 99 %), fortificada com 100 µL de padrão de recuperação (PCB 103 e PCB 198) e extraída em extrator Soxhlet com mistura de *n*-hexano/diclorometano (50:50) (JT Baker; grau análise de resíduo) durante 12 h. O extrato foi concentrado a 1 mL usando evaporador rotatório (Quimis[®]) e fluxo de nitrogênio (4.5; White Martins). Em seguida, foi purificado por cromatografia de gel-permeação (GPC) em coluna de vidro preenchida com BioBeads S-X3 (BioRad), o qual foi estabilizado com o mesmo solvente usado nas eluições, *n*-hexano/diclorometano (55:45) (JT Baker; grau análise de resíduo). A primeira fração eluída (45 mL) foi descartada, a segunda (50 mL) usada para determinação gravimétrica do conteúdo lipídico e a última fração (150 mL), a qual contém os PCBs e os pesticidas organoclorados, concentrada a 1 mL. Esta última fração foi fracionada por cromatografia de adsorção em coluna utilizando 12 g de Florisil[®] (previamente ativado a 130 °C por 12 h) e 5 g de sulfato de sódio anidro. Os PCBs foram eluídos com 90 mL de *n*-hexano, sendo denominada Fase 1 (F1). A F2, contendo os demais praguicidas clorados, foi eluída com 120 mL de *n*-hexano/diclorometano (80:20). Cada fração (F1 e F2) foi concentrada a 1 mL, transferida para um frasco de vidro (1,8 mL) e fortificada com 100 µL do padrão interno (2,4,5,6-tetracloro-*m*-xileno (TCMX) e PCB 209). Os extratos da F1 foram analisados em um cromatógrafo de fase gasosa *Clarus 500* (Perkin Elmer[®]) equipado com detector de captura de elétrons ⁶³Ni (CG-DCE), injetor *split/splitless* com controle automático de fluxo e amostrador automático.

Foi utilizada uma coluna cromatográfica capilar (Elite-5 - 5 % Difenil - 95 % Dimetilsiloxane) de 60 m, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de filme. Hélio (4.5; White Martins) foi utilizado como gás carreador (1,5 mL.min⁻¹) e N₂ (5.0; White Martins) como gás de make-up (30 mL.min⁻¹).

As amostras foram analisadas para 44 congêneres de PCBs (17; 18; 28; 31; 33; 44; 49; 52; 70; 74; 82; 87; 95; 99; 101; 105/132/153; 110; 118/149; 128; 138; 151; 156; 158; 169; 170; 171; 177; 180; 183; 187; 191; 194; 195; 199/201; 205; 206 e 208), incluindo os padrões PCB 103, 198 e 209 utilizados no controle analítico. A identificação dos PCBs analisados foi baseada nos tempos de retenção de padrões autênticos e a quantificação foi realizada contra padrões externos (CQME01 Accustandard, EUA) por meio das curvas analíticas de cada analito e método de cálculo por padronização interna. O desempenho analítico foi avaliado pelos padrões de recuperação (entre 70 e 120 %), da análise de materiais de referência certificados, brancos analíticos e a participação em programa de proficiência analítica (CALA, Canadá).

Os dados foram analisados usando software Statistica 6.0 for Windows. O efeito do processamento nas concentrações de PCBs no pescado foi avaliado por ANOVA e teste complementar de Tukey ($p \leq 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliação da contaminação do atum por bifenilos policlorados

As concentrações de PCBs encontradas nas amostras de atum são apresentadas na Tabela 1, tendo valores expressos em ng.g⁻¹ (peso lipídico). O percentual médio de lipídios nas amostras de músculo congelado e lombo cozido congelado de atum foi, respectivamente, de 0,89 % e 1,38 %. Os limites de detecção e quantificação do método estiveram na faixa de 0,005 e 0,02 ng.g⁻¹, respectivamente, para os PCBs analisados. Foi observada a presença de PCBs em todas as amostras de pescado (Figura 1), assim como já havia sido observado por Ueno et al¹⁴ em sua avaliação desta espécie em águas brasileiras. Ueno et al¹⁵ detectaram estes compostos em quase todos os espécimes de atum (*Katsuwonus pelamis*) coletados em diversas regiões do mundo, indicando uma contaminação difundida destes compostos no ambiente marinho global.

O somatório de 41 PCBs nas amostras analisadas variou entre 0,58 e 95 ng.g⁻¹ (peso lipídico). Ueno et al¹⁴ detectaram níveis superiores aos do presente estudo

para o somatório dos PCBs (460 ng.g⁻¹ peso lipídico) em fígado de atum (*Katsuwonus pelamis*) capturado em águas próximas à costa sudeste brasileira durante o ano de 2000, sendo de 14 ng.g⁻¹ (peso lipídico) o somatório de 12 PCBs coplanares¹⁵.

Dentre os PCBs analisados, 25 dos 41 congêneres (PCBs 17, 31, 70, 82, 87, 95, 99, 128, 138, 151, 156, 158, 169, 170, 171, 183, 187, 191, 194, 195, 199/201, 205, 206 e 208) apresentaram valores abaixo do limite de quantificação (0,02 ng.g⁻¹). Os congêneres que apresentaram maiores concentrações médias foram PCB 74 > PCB 101 > PCB 52, sendo responsáveis por 65,6 % do ΣPCBs. A maior concentração média do congêner 74 é explicada por uma concentração muito alta em uma das amostras avaliadas (76,3 ng.g⁻¹ peso lipídico). Já o congêner encontrado com maior incidência foi o PCB 33 (87 % das amostras), seguido pelos PCBs 44, 101 e 110 (80 %) e pelos PCBs 28 e 105+153+132 (67 %). A alta incidência do PCB 33 pode ser devida a erro analítico, visto que tal PCB não é comumente encontrado em amostras ambientais. Por outro lado, os altos valores de incidência de determinados congêneres nas amostras avaliadas pode ser atribuído ao fato de estas terem sido retiradas de um mesmo lote e, possivelmente de um mesmo cardume, o qual provavelmente tenha exposição uniforme aos contaminantes.

Conforme Baars et al¹⁶, os PCBs 28, 52, 101, 118, 138, 153 e 180 são os mais representativos por estarem

predominantemente presentes em matrizes vivas e não vivas. No presente estudo, o PCB 138 não foi detectado nas amostras. Por outro lado, os PCBs 28, 52, 101 e 153 se fizeram presentes em mais da metade das amostras avaliadas.

Foram encontrados níveis maiores de tetra e pentaclorobifenilos e níveis mais baixos de heptaclorobifenilos, evidenciando uma maior concentração de congêneres menos clorados. Esta distribuição é provavelmente reflexo do hábito alimentar dos atuns, sendo os congêneres mais biodisponíveis na sua região de ocorrência, podendo variar entre grupos distintos de organismos de distintas regiões. Hermanns¹⁷ relata predominância de PCBs com elevado grau de cloração no lobo marinho (*Arctocephalus australis*) do sul do Brasil. Também Golian e Pavelka¹⁸ encontraram níveis menores de heptaclorobifenilos, porém níveis mais elevados de triclorobifenilos em produtos cárneos da República Tcheca.

As concentrações de PCB em lombo de atum capturado na região sul do Estado e processado por cozimento se mostraram menores que os limites estabelecidos pela União Europeia para produtos de origem animal (200 ng.g⁻¹ peso lipídico)¹⁹ e pelo Ministério da Agricultura (3000 ng.g⁻¹ peso lipídico)²⁰. A preocupação com tais contaminantes por parte do poder público não parece grande, visto que a Instrução Normativa MAPA nº 24/2011, que define limites de referência para o Plano

Tabela 1. Concentração média (±desvio padrão) de PCBs (ng.g⁻¹ peso lipídico) no músculo *in natura* e lombo processado de atum (*Katsuwonus pelamis*) (n=5)

Congêneres	Ocorrência (%)	Músculo		Lombo Processado	
		Concentração média	Intervalo	Concentração média	Intervalo
PCB 18	20,00	≤LQ	≤LQ- 0,05	0,13	<LQ - 1,16
PCB 28	66,67	0,32	≤LQ - 1,13	2,66	<LQ - 7,56
PCB 33	86,67	4,34	≤LQ -12,43	1,30	<LQ - 6,06
PCB 52	53,33	0,50	≤LQ - 1,30	4,04	<LQ - 38,07
PCB 49	13,33	0,16	≤LQ - 0,79	0,03	<LQ - 0,29
PCB 44	80,00	0,81	≤LQ - 2,13	1,10	<LQ - 5,09
PCB 74	60,00	4,90	≤LQ - 19,35	9,22	<LQ - 76,31
PCB 101	80,00	7,07	≤LQ - 20,94	4,17	<LQ - 19,42
PCB 110	80,00	0,29	≤LQ - 1,39	1,69	<LQ - 5,99
PCB 149/118	46,67	≤LQ	≤LQ - 0,05	0,58	<LQ - 4,11
PCB 153/105/132	66,67	0,17	≤LQ - 0,61	1,79	<LQ - 7,38
PCB 177	6,67	≤LQ	≤LQ - 0,05	≤LQ	≤LQ
PCB 180	13,33	≤LQ	≤LQ - 0,03	0,10	<LQ - 0,98
Σ44 PCB**	-	18,60	-	26,78	-

*Os congêneres não citados na tabela apresentaram concentrações menores que o limite de quantificação

**Valores para congêneres não detectados ou abaixo do limite de quantificação (LQ ≤ 0,02 ng.g⁻¹) foram considerados iguais a zero para o somatório

Nacional de Controle de Resíduos Biológicos em Produtos de Origem Animal – PNCRB, não estabelece limites para PCBs em pescado, apenas em carnes (200 ng.g^{-1})²¹.

Os resultados obtidos por Lago²² para a população do cetáceo *Tursiops truncatus* mostram que o nível de contaminação por PCBs na região do estuário da Lagoa dos Patos é baixo. Estes dados estão de acordo com os encontrados por Hermanns¹⁷, que não encontrou valores elevados de PCBs em amostras de água, sedimento e mexilhão para a mesma região. Tais autores confirmam o resultado obtido no presente trabalho de baixos níveis de contaminação na região sul do estado do Rio Grande do Sul. Por outro lado, na Argentina, Colombo et al²³ observaram que os peixes do Rio da Prata apresentaram de moderadas a altas concentrações de poluentes orgânicos, como PCBs. Foi observada uma maior contaminação na área próxima a Buenos Aires, que se tornava menor em áreas mais distantes. Com base nestes dados, pode-se salientar que a contaminação por estes compostos é maior em regiões mais industrializadas. Entretanto, conhecendo as características do atum analisado, e sabendo que estes são grandes nadadores, que podem realizar migrações ao longo do oceano, fica difícil caracterizar a dieta e, conseqüentemente, a possível fonte de contaminação para este pescado.

Dentre os compostos analisados, destacam-se os PCBs 169, 105, 118, 156. Estes são quatro dos doze PCBs semelhantes a dioxina, os quais possuem entre 4 e 8 átomos de cloro e estão entre os mais tóxicos e bioacumulativos, apresentando maior risco à saúde²⁴. Entre os PCBs semelhantes a dioxina analisados, apenas os PCBs 105 e 118 apresentaram concentrações acima do limite de quantificação. Desta forma, a toxicidade dos congêneres de PCBs semelhantes a dioxina tem sido estimada usando equivalentes tóxicos (TEQ) em relação a 2,3,7,8-tetraclorodibenzodioxina, considerada a mais tóxica das dioxinas. A TEQ é obtida pela multiplicação da concentração de cada congêneres pelo seu fator equivalente tóxico (TEF)¹⁶. A toxicidade das amostras em relação a contaminação por PCBs foi avaliada considerando os congêneres 105 e 118 para obtenção do equivalente tóxico (TEQ). Ambos os congêneres possuem fator equivalente tóxico (TEF) igual a 0,00003²⁵. Nas análises quantitativas, ambos os congêneres foram quantificados em conjunto com outros congêneres, devido à semelhança no tempo de retenção. Considerando uma situação extrema de toxicidade no cálculo do equivalente

tóxico, as concentrações encontradas para os grupos foram assumidas como sendo 100 % compostas pelos congêneres semelhantes à dioxina (Tabela 2).

Santos⁶ encontrou um equivalente tóxico total de $3,61 \times 10^{-3} \text{ ng.g}^{-1}$ (peso lipídico) em amostras de queijo em Santa Maria/RS, valor superior ao encontrado no presente estudo, que foi de $4,90 \times 10^{-5} \text{ ng.g}^{-1}$ (peso lipídico) (Tabela 2). Valores muito elevados, da ordem de $9,58 \times 10^5 \text{ ng.g}^{-1}$ (peso lipídico), foram encontrados em carne de frango contaminada, na Bélgica, por Neuberger et al²⁶. Considerando que a dose diária tolerada de dioxina, estabelecida pela Organização Mundial da Saúde ($1-4 \text{ ng TEQs.g}^{-1}$ de peso corporal), limite abaixo do qual se considera que a população humana está protegida dos efeitos tóxicos²⁷, o consumo de músculo de atum não seria um problema à saúde.

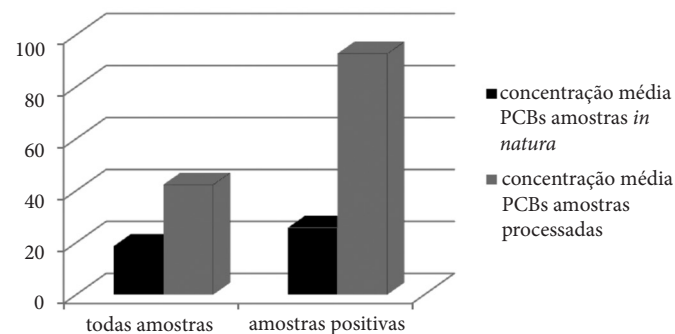


Figura 1. Concentração média de PCBs (ng.g^{-1} gordura) em atum

Influência do processamento nos níveis de PCBs

Foram encontrados níveis significativamente mais elevados de PCBs no lombo de atum processado quando comparado ao pescado congelado ($p \leq 0,05$), o que pode ser atribuído ao processamento e embalagem do produto processado. Durante o processo de cozimento, o produto sofre perda de água, o que pode explicar o aumento na concentração de contaminantes. Os resultados estão em conformidade com Bogusz Junior²⁸, que relata ter encontrado níveis mais elevados de PCBs em produtos cárneos processados (cozidos - salsicha de cachorro-quente e bolonha) quando comparados à carne in natura, afirmando que tais resultados estavam em conformidade com os dados precedentes da literatura, que sugeriam uma influência do processamento de carne nos níveis de PCBs. Esta é a única referência encontrada na literatura com respeito à influência do processo de cozimento nos níveis de PCBs. Inversamente, Bayarri²⁹ não encontrou uma

influência significativa do processamento nos níveis de PCBs e outros compostos organoclorados em produtos de carne curados não cozidos.

Todos os congêneres encontrados no presente estudo possuem ao menos um átomo de cloro em posição orto na molécula. Segundo Mackay et al³⁰, os compostos que apresentam essa característica são mais facilmente degradáveis. No caso específico de processamento de alimentos, Leães³¹ verificou que os PCBs 138, 153 e 180 (orto-substituídos) foram degradados por meio da utilização de *Staphylococcus xylosus* como iniciador na fermentação de produtos cárneos. Apesar destas afirmações, tal efeito não foi observado no processamento utilizado para o lombo cozido de atum estudado no presente trabalho.

Tabela 2. Equivalente tóxico (TEQ) relativo a média das concentrações dos congêneres coplanares analisados (n=5)

Composto	Concentração média* (ng.g ⁻¹ peso lipídico)	TEF	TEQ (ng.g ⁻¹ peso lipídico)
PCB 105	1,25	3 x 10 ⁻⁵	3,74 x 10 ⁻⁵
PCB 118	0,39	3 x 10 ⁻⁵	1,16 x 10 ⁻⁵
ΣPCB105+118	1,63	-	4,90 x 10 ⁻⁵

*média das concentrações considerando todas amostras analisadas

CONCLUSÃO

Com base nos resultados apresentados, é possível concluir que:

Tanto o músculo como o lombo cozido de atum (*Katsuwonus pelamis*) capturado na costa sul do Rio Grande do Sul não excedeu os limites de PCBs estabelecidos pela União Europeia ou legislação brasileira para consumo de pescado.

O processamento do lombo cozido congelado acarretou em um aumento significativo ($p \leq 0,05$) nas concentrações de PCBs em relação ao músculo congelado. Acredita-se que o aumento na concentração de contaminantes possa ocorrer em função do processamento, da perda de água no processo de cozimento ou por contaminação da embalagem.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro. Ao pessoal do Laboratório de Microcontaminantes Orgânicos e Ecotoxicologia Aquática (CONECO) da FURG pela disponibilidade e auxílio na realização das análises.

G. Fillmann é bolsista PQ do CNPq (Processo n° 314335/2009-9).

REFERÊNCIAS

1. Europa. Eliminar e limitar a produção, a utilização e a libertação de poluentes orgânicos persistentes (POP). Disponível em: [http://europa.eu/scadplus/leg/pt/lvb/l21279.htm].
2. UNEP/FAO. Convenção de Estocolmo sobre POPs. Disponível em: [http://www.pops.int].
3. Robards K. The determination of polychlorinated biphenyl residues: a review with special reference to foods. *Food Addit Contam.*1990;7:143-74.
4. Penteado JCP, Vaz JM. O legado das bifenilas policloradas (PCBs). *Quím Nova.*2001;24:390-8.
5. Brasil. Ministérios do Estado do Interiores, da Indústria, do Comércio e das Minas e Energia. Portaria Interministerial n° 19, de 29 de janeiro de 1981. Proíbe em todo território nacional, a implantação de processos que tenhamos como finalidade principal a produção de bifenil policlorados - PCB's. Proíbe o seu uso e comercialização. Diário Oficial [da] República Federativa [do] Brasil. Brasília, DF, 29 jan. 1981.
6. Santos JS. Ingestão diária estimada de bifenilos policlorados a partir de queijo por universitários de Santa Maria – RS [dissertação de mestrado]. RS: Universidade Federal de Santa Maria. 2005.
7. Sawhney BL, Hankin L. Polychlorinated biphenyls in foods: a review. *J Food Protec.*1985;48:442-8.
8. Esposito M, Imparato E, Castellano V, Serpe L. Distribution of polychlorinated biphenyls in contaminated swine tissue. *Vet Hum Toxicol.*2001;43:97-8.
9. FAO - Food and Agriculture Organization. Garantia da qualidade dos produtos da pesca - Aspectos da qualidade associados ao pescado. Disponível em: [http://www.fao.org/docrep/003/t1768p/T1768P04.htm].
10. Ueno D, Kajiwaru N, Tanaka H, Subramanian A, Fillmann G, Lam PK et al. Global Pollution Monitoring of Polybrominated Diphenyl Ethers Using Skipjack Tuna as a Bioindicator. *Environm Sci Technol.*2004;38:2312-6.
11. Costabeber I. Resíduos organoclorados persistentes en grasa mamaria y su relación con los hábitos alimentarios: repercusiones sanitarias [tese de doutorado]. Espanha: Universidade de Córdoba; Espanha. 1999.
12. Kannan K, Tanabe S, Tatsukawa R. Geographical distribution and accumulation features of organochlorine residues in fish in tropical Asia and Oceania. *Environm Sci Technol.*1995;29:2673-83.
13. Nakata H, Tanabe S, Tatsukawa R, Amano M, Miyazaki N, Petrov EA. Persistent organochlorine residues and their accumulation kinetics in Baikal seal (*Phoca sibirica*) from Lake Baikal, Russia. *Environm Sci Technol.*1995;29:2877-85.
14. Ueno D, Takahashi S, Tanaka H, Subramanian AN, Fillmann G, Nakata H, et al. Global Pollution Monitoring of PCBs and Organochlorine Pesticides Using Skipjack Tuna as a Bioindicator. *Arch Environm Contam Toxicol.*2003;45:378-89.
15. Ueno D, Watanabe M, Subramanian A, Tanaka H, Fillmann G, Lam PK, et al. Global pollution monitoring of polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDDs), furans (PCDFs) and coplanar polychlorinated biphenyls (coplanar PCBs) using skipjack tuna as bioindicator. *Environm Pollut.*2005;136:303-13.
16. Baars AJ, Bakker MI, Baumann RA, Boon PE, Freijer JJ, Hoogenboom LA, et al. Dioxins, dioxin-like PCBs and non-

- dioxin-like PCBs in foodstuffs: occurrence and dietary intake in The Netherlands. *Toxicol Lett.*2004;151:51-61.
17. Hermans L. Análise da distribuição e da contaminação de compostos organoclorados no lobo-marinho sul-americano (*Arctocephalus australis*). [monografia]. Rio Grande (RS): Fundação Universidade Federal do Rio Grande. 2002.
 18. Golian J, Pavelka M. Residues of PCB in certain meat products. *Magyar Allatorvosok Lapja.*2002;24:616-19.
 19. Bester K, De Vos P, Le Guern L, Harbeck S, Hendrickx F, Kramer GN, et al. Preparation and certification of a reference material on PCBs in pig fat and its application in quality control in monitoring laboratories during de Belgian “PCB-crisis”. *Chemosphere.*2001;44:529-37.
 20. Brasil. Ministério da Agricultura e Abastecimento. Instrução Normativa nº 42, Plano Nacional de Controle de Resíduos em produtos de Origem Animal. 20 de dezembro de 1999. Altera o Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal – PNCR e os Programas de Controle de Resíduos em Carne – PCRC, Mel – PCRM, Leite – PCRL e Pescado – PCRP.
 21. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 24, Plano Nacional de Controle de Resíduos Biológicos em Produtos de Origem Animal – PNCRB. 9 de agosto de 2011.
 22. Lago CF. Organoclorados na população do cetáceo *Tursiops truncatus* (Montagu, 1821) do extremo sul do Brasil [monografia]. Rio Grande (RS): Fundação Universidade Federal do Rio Grande; 2006.
 23. Colombo JC, Bilos C, Lenicov M, Colautti D, Landoni P, Brochu C. Detritivorous fish contamination in the Rio de la Plata estuary: a critical accumulation pathway in the cycle of anthropogenic compounds. *Can J Fish Aquatic Sci.*2000;57:1139-50.
 24. Bhavsar SP, Reiner EJ, Hayton A, Fletcher R, Macpherson K. Converting Toxic Equivalents (TEQ) of dioxins and dioxin-like compounds in fish from one Toxic Equivalency Factor (TEF) scheme to another. *Environm Int.*2008;34:915-21.
 25. WHO – World Health Organization. The 2005 World Health Organization Reevaluation of Human and Mammalian Toxic Equivalency Factors for Dioxins and Dioxin-like Compounds. *Toxicological Sciences.* 2006. Disponível em [http://www.who.int/ipcs/assessment/tef_update/en/]
 26. Neuberger M, Grossgut R, Gyimothy J, Leibetseder J. Dioxin contamination of feed and food. *Lancet.*2000;355:1883.
 27. Van Leeuwen FX. Dioxins: WHO’s tolerable daily intake (TDI) revised. *Chemosphere.*2000;40:1095-101.
 28. Bogusz Junior S. Determinação de bifenilos policlorados em carne e produtos cárneos no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil [dissertação de mestrado]. Santa Maria (RS): Universidade Federal de Santa Maria;2004.
 29. Bayarri S. Degradación de residuos de contaminantes clorados en productos cárnicos por el procesado y la acción de microorganismos responsables de maduración [tese de doutorado]. Espanha:Universidade de Zaragoza; 1997.
 30. Mackay D, Shiu WY, Ma KC. Illustrated Handbook of Physical-Chemical Properties and Environmental Fate for Organic Chemicals. Volume I+II. Lewis Publishers Inc., Boca Raton, FL, USA.1992.
 31. Leães FL. Degradação de bifenilos policlorados (PCBs) por microrganismo de interesse tecnológico na indústria cárnea [dissertação de mestrado]. Santa Maria (RS): Universidade Federal de Santa Maria.2005.

Verificação do método Monier-Williams otimizado na determinação de dióxido de enxofre em sucos de frutas, água de coco e cogumelo em conserva

Verification of the optimized Monier-Williams method for determining sulfur dioxide in fruit juices, coconut water and mushroom in conserve

RIALA6/1539

Leticia Araújo Farah NAGATO^{1*}, Emy TAKEMOTO¹, Jussara Carvalho Moura DELLA TORRE¹, Jaim LICHTIG² (*in memoriam*)

*Endereço para correspondência: Núcleo de Química, Física e Sensorial, Centro de Alimentos, Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr. Arnaldo, 355, CEP: 01246-902, São Paulo, SP, Brasil. E-mail: lefarah@ig.com.br

²Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

Recebido: 23.08.2012 - Aceito para publicação: 18.03.2013

RESUMO

Neste estudo foram avaliados os parâmetros analíticos de validação, tais como limite de quantificação (LQ), faixa de trabalho, linearidade, sensibilidade, seletividade, precisão e exatidão do método oficial Monier-Williams otimizado na determinação de dióxido de enxofre (SO₂). Três amostras de suco de caju, seis de suco de maracujá, cinco de suco de uva, duas de água de coco e seis de cogumelo em conserva foram adquiridas no comércio. O estudo de recuperação foi realizado em 10 concentrações do padrão de sulfito de sódio na faixa de 5 a 2.675 mg/L e, também, adicionando-se soluções de sulfito de sódio às amostras. A metodologia mostrou-se eficiente, tendo constatado linearidade na faixa de trabalho de SO₂ (7 a 2.675 mg/L), com equação da reta $y = 1,0647x - 13,8697$ ($r^2=0,9979$), recuperação de 87 a 109 %, LQ de 7 mg/L com DPR de 7 %. Os resultados de recuperação média nas amostras variaram de 81 a 115%. Os teores de SO₂ encontrados nas amostras de sucos e água de coco estavam de acordo com a legislação brasileira. Três marcas de cogumelo em conserva revelaram teores acima do limite máximo estabelecido de 50 mg/kg.

Palavras-chave. sulfitos, destilação Monier-Williams, sucos de fruta, água de coco, cogumelo em conserva, parâmetros de desempenho.

ABSTRACT

This study aimed at assessing the validation analytical parameters of the optimized Monier-Williams method, such as: limit of quantification (LQ), concentration range, linearity, sensibility, selectivity, precision and accuracy for analyzing sulphur dioxide (SO₂). Three samples of cashew juice, six of passion fruit juice, five of grape juice, two of coconut water and six of mushroom in conserve were obtained from retail market. The recovery study was carried out on 10 concentrations of sodium sulphite standard solutions ranging from 5 to 2,675 mg/L, and also adding SO₂ solutions into the samples. The methodology was considered efficient and the linearity parameter was proved in the SO₂ applied concentration interval (from 7 to 2,675 mg/L); the curve equation was $y = 1.0647x - 13.8697$ ($r^2=0.9979$). The recovery rates ranged from 87 to 109 %, LQ of 7 mg/L, with RSD of 7 %. The mean recovery results in spiked test samples showed acceptable levels varying from 81 to 115 %. The concentrations of SO₂ found in fruit juices and coconut water complied with the Brazilian legislation. Three brands of mushroom in conserve revealed values above the established maximum limit of 50 mg/kg.

Keywords. sulphites, Monier-Williams distillation, fruit juices, coconut water, mushroom in conserve, performance parameters.

INTRODUÇÃO

Sulfitos, ou agentes sulfitantes, são aditivos conservadores eficazes, muito utilizados em alimentos e bebidas. Essas substâncias, em geral, evitam o escurecimento enzimático e não enzimático e impedem o crescimento de microrganismos indesejáveis (leveduras, fungos e bactérias), que causam a deterioração de alimentos durante o seu processamento e armazenamento. O escurecimento enzimático é uma consequência indireta da ação da polifenoloxidase, enzima encontrada em muitas frutas e hortaliças, que é liberada durante o manuseio pós-colheita e na industrialização. A enzima catalisa a oxidação de compostos fenólicos, a reação prossegue por meio de oxidações não enzimáticas, ocorrendo finalmente a polimerização das quinonas, formando complexos coloridos¹⁻⁴. Os agentes sulfitantes mais usados pela indústria de alimentos e bebidas são o sulfito de sódio, metabissulfito e bissulfito de sódio e potássio, que liberam o SO₂ nas condições de uso⁵. Existe certa preocupação acerca da segurança dos sais de sulfito, pois podem causar dificuldades respiratórias em algumas pessoas sensíveis, reações alérgicas, como irritação da pele, irritação gástrica e asma. Outras reações que têm sido reportadas, associadas à sua ingestão são reação anafilática, hipotensão, cefaleia, náusea e dor abdominal^{1,6,7}.

O JECFA, Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, na última avaliação, em 1998, estabeleceu a ingestão diária aceitável (IDA) para o homem de 0,7 mg/kg de peso corpóreo/dia, para a ingestão de sulfito (expressos como SO₂)⁶. Esses dados são usados por todos os países para propor o uso e níveis de adição de aditivos intencionais em alimentos, de forma segura e dependente da necessidade tecnológica.

A Resolução nº 04/88, do Conselho Nacional de Saúde (CNS), do Ministério da Saúde⁸, estabelece limite máximo de sais de sulfito (expresso em SO₂ residual) em cogumelos em conserva de 0,005 g/100 g (50 mg/kg ou 50 ppm) em sucos de fruta e 0,02 g/100 mL (200 mg/L ou 200 ppm) em água de coco. A Resolução RDC nº 12/02 da Anvisa/MS⁹ estabelece o limite de 0,30 g/100 mL (3.000 mg/L) para o suco de caju com alto teor de polpa e o limite de 0,033 g/100 mL (330 mg/L) para o suco de caju diluído, ou seja, no produto a ser consumido.

Alguns autores estudaram a estimativa de ingestão do conservador sulfito, combinando dados obtidos de concentração desse aditivo nos alimentos

e o consumo médio diário desses produtos na dieta. Produtos como frutas secas e vinhos levaram a uma maior ingestão de sulfito, excedendo a sua IDA¹⁰. Machado¹¹ concluiu em seu trabalho que a ingestão média de sulfitos devido ao consumo de sucos de frutas ficou bem abaixo da IDA estabelecida pelo JECFA. Quanto ao consumo de vinhos, os dados de ingestão indicaram que o consumo diário de 150 mL, pode contribuir com mais de 50 % da IDA de sulfito, caso a concentração deste seja igual ou superior a 150 mg/L.

O método utilizado neste trabalho para a quantificação de sulfitos em alimentos e bebidas foi o de Monier-Williams otimizado, preconizado pela AOAC, 2006¹². O método de Monier-Williams quantifica o SO₂ total (sulfito livre mais uma fração dos sulfitos ligados), por meio do aquecimento da amostra com ácido clorídrico, em atmosfera inerte. O SO₂ liberado é coletado em solução de peróxido de hidrogênio a 3 %, na qual é oxidado a ácido sulfúrico, sendo este estequiometricamente determinado por titulação com hidróxido de sódio. A destilação de Monier-Williams é aplicável em diversas matrizes, com exceção dos vegetais do gênero *Brassica* spp. (couve, repolho, nabo, mostarda) e *Allium* spp. (cebola, alho, alho-poró), porque possuem, como componentes do aroma, dissulfetos que podem interferir na análise. Este é, reconhecidamente, um método tradicional e adotado como oficial em muitos países.

Vários métodos de determinação de SO₂ em alimentos estão descritos na literatura, e em diversos trabalhos são comparados ao método de Monier-Williams^{5,13,14}, podendo ser citados, entre outros: o método combinado de Monier-Williams-cromatografia líquida de alta eficiência¹³; a cromatografia de íons, com separação em coluna de exclusão de ânions¹⁴; a titulação direta com iodo, após uma rápida destilação¹⁵; a titulação com iodo¹⁶; o método enzimático¹⁷; a cromatografia líquida de alta eficiência¹⁸⁻²⁰ e a análise por injeção em fluxo²¹⁻²³.

O laboratório deve assegurar suficiente qualidade e confiabilidade dos resultados obtidos nos ensaios químicos realizados. O desenvolvimento de métodos de análise deve ser acompanhado de validação. O Inmetro²⁴, em 2010, indicou as orientações a serem seguidas pelo laboratório para o processo de validação de um método analítico. A validação de um método estabelece, por meio de estudos sistemáticos, que ele é adequado à finalidade, isto é, suas características de desempenho são capazes de

produzir resultados correspondentes às necessidades do problema analítico. As características de desempenho do método devem estar explícitas, devendo incluir, quando aplicável: seletividade, linearidade, faixa de trabalho e faixa linear, sensibilidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), tendência/recuperação, precisão (repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade) e robustez.

A Anvisa²⁵, em 2003, aprovou o “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos”, cujo objetivo é auxiliar os pesquisadores dos centros analíticos na validação e no desenvolvimento de metodologias.

Uma das exigências da norma ABNT ISO/IEC 17025:2005²⁶ é a validação de métodos não normalizados, métodos criados/desenvolvidos pelo próprio laboratório, métodos normalizados ampliados, modificados ou usados fora dos escopos para os quais foram concebidos. A validação é a confirmação por exame e fornecimento de evidência objetiva de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos.

A recuperação do analito pode ser estimada pela análise de amostras fortificadas com quantidades conhecidas dessa substância (*spike*). O ensaio de recuperação analítica é um dos métodos normalmente utilizados para avaliar a tendência de um método. A exatidão é avaliada numericamente por meio da tendência²⁴.

Linearidade é a habilidade de um método em produzir resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito, em uma dada faixa de concentração. A quantificação requer que se conheça a dependência entre a resposta medida e a concentração do analito. A linearidade é formulada como expressão matemática. A equação da reta que relaciona as duas variáveis é $y=a+bx$, sendo y = resposta medida; x = concentração; a = interseção com o eixo y , quando $x = 0$ e b = inclinação da curva analítica = sensibilidade. A linearidade de um método pode ser observada pelo gráfico dos resultados dos ensaios em função da concentração do analito e verificada a partir da equação da regressão linear, determinada pelo método dos mínimos quadrados. O coeficiente de correlação linear (r) é frequentemente utilizado para indicar o quanto a reta pode ser considerada adequada como modelo matemático²⁴. Este parâmetro permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1,0, menor é a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor é a incerteza

dos coeficientes de regressão estimados. Um coeficiente de correlação (r) maior que 0,999 é considerado como evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão. A Anvisa²⁵ recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99.

Para qualquer método quantitativo, existe uma faixa de concentrações do analito ou valores da propriedade no qual o método pode ser aplicado. A faixa de trabalho deve cobrir a faixa de aplicação para a qual o ensaio vai ser usado e a concentração mais esperada da amostra deve, sempre que possível, se situar no centro da faixa de trabalho. No limite inferior da faixa de concentração, o fator limitante é o valor do limite de quantificação. No limite superior, os fatores limitantes dependem do sistema de resposta do equipamento de medição²⁴.

O limite de quantificação é também denominado “Limite de Determinação”. Na prática, corresponde normalmente ao padrão de calibração de menor concentração (excluindo o branco). Segundo o Inmetro²⁴, para a análise em nível de traços, é recomendado adotar o LQ como a concentração mais baixa da curva analítica obtida com o nível satisfatório de precisão e exatidão.

A sensibilidade é refletida na menor diferença de concentração que é mensurável por um método. É um parâmetro que demonstra a variação da resposta em função da variação da concentração do analito. A sensibilidade depende da natureza do analito e da técnica de detecção utilizada sendo determinada simultaneamente aos testes de linearidade e expressa pela inclinação da curva de regressão na faixa linear. O método é mais sensível quando pequenas variações de concentração resultam em maior variação na resposta, ou seja, maior inclinação.

Precisão é um termo geral para avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas. É normalmente determinada para circunstâncias específicas de medição e as três formas mais comuns de expressá-la são: por meio da repetitividade, precisão intermediária e da reprodutibilidade, sendo usualmente expressas pelo desvio-padrão e coeficiente de variação. O número de replicatas para cada nível de concentração deve expressar a rotina do laboratório²⁴. Uma maneira simples de melhorar a precisão é aumentar o número de replicatas.

A seletividade avalia o quanto o método é indiferente à presença de espécies que poderiam interferir na determinação do analito na amostra. A matriz da

amostra pode conter componentes que interferem no desempenho da medição. Os interferentes podem aumentar ou reduzir o sinal, e a magnitude do efeito também pode depender da concentração. Se a seletividade não for assegurada, a linearidade, a tendência e a precisão estarão seriamente comprometidas²⁴.

O presente estudo teve como objetivo verificar parâmetros analíticos de validação, tais como limite de quantificação (LQ), faixa de trabalho (aplicação) e faixa linear, linearidade, taxas de recuperação (exatidão), precisão (repetitividade), sensibilidade e seletividade do método Monier-Williams otimizado, empregando ácido clorídrico na etapa de destilação, como preconizado pela AOAC¹², para a determinação analítica de dióxido de enxofre em amostras de sucos de frutas (caju, maracujá, uva), água de coco e cogumelo em conserva. Houve também comparação da exatidão e precisão do método em baixa e alta concentração de SO₂, empregando-se ácido clorídrico ou ácido fosfórico na etapa de destilação, visto que trabalhos publicados^{5,27} citam o uso de ácido fosfórico. Fazio e Warner⁵ justificam que a substituição do ácido clorídrico pelo fosfórico representa uma redução favorável na temperatura de fervura na destilação, em aproximadamente 30°C, devendo-se, contudo, tal alteração ser mais bem avaliada, tendo em vista que o ácido fosfórico é mais fraco que o ácido clorídrico, podendo revelar resultados desfavoráveis de recuperação.

MATERIAL

Amostras

No período de março a setembro de 2008, foram avaliadas um total de 22 amostras comerciais, sendo três de suco de caju integral, seis de suco de maracujá integral, cinco de suco de uva integral, duas de água de coco e seis de cogumelo em conserva.

Equipamentos e vidraria

Balança analítica com resolução de 0,1 mg; banho de ultrassom; nitrogênio gasoso comum (pureza 98,5 %); sistema de purificação de água tipo I (ultrapura ou desionizada); buretas de 5, 10 e 25 mL; pipetas volumétricas 1, 2, 4, 5, 10, 20 e 50 mL; aparelho para a determinação de dióxido de enxofre com sistema de destilação (Figura 1) constituído por balão (de reação) de fundo chato de 500 mL com entrada (junta 24/40) para nitrogênio gasoso e saída (junta 24/40) para condensador de Liebig do tipo liso (juntas 24/40); manta aquecedora;

erlenmeyer de 500 mL com boca esmerilhada (frasco A); erlenmeyer de 125 mL comum (frasco B) e conexões.

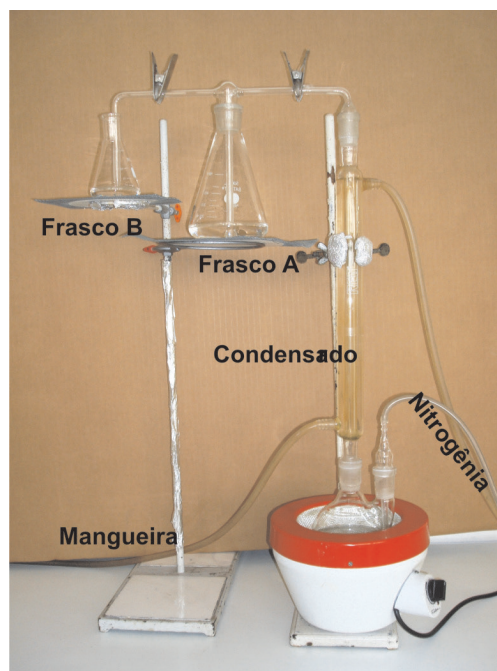


Figura 1. Aparelho para determinação de SO₂

Reagentes e soluções

Sulfito de sódio; ácido fosfórico; iodeto de potássio; ácido clorídrico concentrado; peróxido de hidrogênio a 3 % recém-preparado com água desionizada; ácido clorídrico 4 M; hidróxido de sódio 0,05 M padronizado com biftalato de potássio e fenolftaleína; sulfito de sódio 0,05 M padronizado, indicador vermelho de metila (0,2 % m/v em etanol a 95 %); dicromato de potássio 0,0167 M (= 0,1 N); tiosulfato de sódio 0,1 M e solução de amido a 1 %. Os reagentes foram de grau analítico. A água utilizada no preparo de soluções-padrão e na dissolução da amostra no balão foi do tipo I (ultrapura), fervida e colocada no banho de ultrassom.

MÉTODOS

Padronização da solução de sulfito de sódio 0,05 M

A solução de sulfito de sódio 0,05 M foi padronizada com solução de dicromato de potássio 0,0167 M (= 0,1 N), iodeto de potássio, ácido clorídrico concentrado, titulando-se o iodo liberado com a solução fatorada de tiosulfato de sódio 0,1 M. A padronização foi feita diariamente e, as concentrações obtidas foram consideradas como valor teórico de SO₂ e utilizadas nos

cálculos de comparação com os resultados obtidos pelo método Monier-Williams otimizado.

Método Monier-Williams otimizado

A análise quantitativa de dióxido de enxofre nos alimentos foi realizada pelo método de Monier-Williams otimizado, tendo como referência o descrito na AOAC¹², utilizando como preconizado o ácido clorídrico 4 M na etapa de destilação. O resultado foi expresso em SO₂ e calculado em mg/L ou mg/kg (ppm), conforme a Equação 1.

Equação 1

$$\text{SO}_2, \text{ mg/kg (ppm)} = \frac{(V_A - V_B) * M * f * 32,03 * 1.000}{m}$$

V_A = volume (mL) de NaOH de molaridade M gasto na titulação da amostra

V_B = volume (mL) de NaOH de molaridade M gasto na titulação do branco

M = molaridade da solução de hidróxido de sódio

f = fator da solução de hidróxido de sódio obtido na padronização

m = massa (g) da amostra

Foram utilizados os sucos de frutas do tipo integral, sendo homogeneizados pela agitação da embalagem fechada antes da tomada da amostra (50 g). As amostras de cogumelo em conserva foram drenadas, picadas em pequenos pedaços com faca e imediatamente pesadas (50 g) para início da análise. O método consistiu, basicamente, em: montar a aparelhagem conforme a Figura 1; adicionar nos frascos A e B, 43 mL e 7 mL de peróxido de hidrogênio a 3 %, respectivamente; acoplar os frascos no conjunto de destilação, devendo estar mergulhados em banho de gelo; adicionar 150 mL de água desionizada no balão de reação; pesar 50 g da amostra e transferência quantitativa para o balão de reação com auxílio de água; adicionar 90 mL de ácido clorídrico 4 M; vedar imediatamente a entrada do balão iniciando a passagem de gás nitrogênio a menor vazão possível para borbulhamento no frasco B; iniciar o resfriamento do condensador com água; ligar a manta aquecedora e manter a ebulição por 2 horas. Remover os frascos A e B do conjunto de destilação; transferir a solução do frasco B para o frasco A com auxílio de água; adicionar 3 gotas de indicador vermelho de metila 0,2 % e titular com solução de hidróxido de sódio 0,05 M até o ponto de viragem de coloração amarela que persista

mais que 20 segundos. Realizar a titulação diária de um branco de 50 mL de peróxido de hidrogênio a 3 %, nas mesmas condições para correção dos resultados. Preparar a amostra (homogeneização), pesar e iniciar a análise o mais rápido possível para evitar perda de sulfito lábil. Examinar também cada junta para certificação do vedamento do aparelho (Figura 1).

Modificações do método Monier-Williams otimizado

Houve poucas alterações do método, como aumento da concentração da solução titulante de hidróxido de sódio (NaOH) de 0,01 M para 0,05 M, facilitando a visualização do ponto final da titulação, utilizando o indicador vermelho de metila. O tempo total de aquecimento e destilação foi estabelecido em 2 horas, para que todo o SO₂ que estivesse na forma combinada fosse liberado e destilado (o método preconiza 1,7 h). Os frascos coletores (A e B) com solução de H₂O₂ foram colocados em béquer, acrescentando-se cubos de gelo para manter a temperatura da solução resfriada, evitando-se escape do gás SO₂ para o ar. Essas pequenas alterações não mudaram o princípio do método, mas forneceram condições adicionais para que, no procedimento de análise, houvesse menores perdas de SO₂.

Comparação entre o uso de ácido clorídrico e ácido fosfórico

Foi realizada a comparação da exatidão e precisão entre o uso de ácido clorídrico 4 M (90 mL) e o ácido fosfórico concentrado (30 mL), como reagente, na etapa de acidificação, no método Monier-Williams otimizado. Esses testes foram realizados com 8 repetições para padrões de sulfito de sódio em baixa concentração (44 - 45 mg/L) e 4 repetições para alta concentração (2.419 - 2.675 mg/L). A recuperação relativa média (%) foi calculada dividindo-se o valor analítico de SO₂ (mg/L) obtido na análise segundo o método Monier-Williams pela concentração teórica de SO₂ (mg/L) obtida na padronização da solução de sulfito de sódio utilizada na fortificação.

Parâmetros de verificação do método Monier-Williams otimizado

Recuperação

O estudo da recuperação/tendência foi realizado em 10 concentrações do padrão de sulfito de sódio 5; 7; 13; 44; 45; 285; 825; 1371; 2419; 2675 mg SO₂/L.

Foram realizadas sempre no mesmo dia, no mínimo em triplicata, as determinações de SO₂ pelo método Monier-Williams otimizado (AOAC)¹² e a padronização da solução de sulfito de sódio 0,05 M para cálculo do SO₂ teórico. O mesmo procedimento foi aplicado no estudo de recuperação de amostras adicionando-se soluções do padrão de sulfito de sódio 0,05 M, pelo menos em duas concentrações (metade e dobro do teor de SO₂ encontrado) nas diversas amostras comerciais de sucos de fruta, água de coco e cogumelo em conserva (fortificação). Para se evitar perdas de sulfito por oxidação, foi passada corrente de nitrogênio (borbulhamento do gás nos líquidos) e rápido fechamento dos frascos, tanto nas amostras como na solução-padrão de sulfito de sódio. A fortificação da amostra com a adição de solução-padrão de sulfito de sódio 0,05 M foi realizada somente no momento da análise. O cálculo de recuperação (Equação 2) seguiu as orientações do Inmetro²⁴.

Equação 2

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{(C_1 - C_2) * 100}{C_3}$$

C₁ = concentração de SO₂, determinada na amostra adicionada de solução-padrão;

C₂ = concentração de SO₂, determinada na amostra diretamente, sem adição de padrão;

C₃ = concentração de SO₂, que foi adicionada à amostra.

Linearidade

A linearidade do método Monier-Williams otimizado foi obtida do gráfico dos resultados de SO₂ determinado *versus* SO₂ teórico, e verificada a partir da equação da regressão linear, determinada pelo método dos mínimos quadrados. Os coeficientes de determinação (r²) e de correlação (r) foram utilizados para indicar evidência de um ajuste ideal dos dados para a linha de regressão.

Faixa de trabalho e faixa linear

A faixa de trabalho ou de aplicação foi obtida a partir da faixa linear de concentrações de SO₂ da reta de regressão (SO₂ determinado *versus* SO₂ teórico). O limite inferior da faixa de trabalho refere-se ao limite de quantificação e o limite superior, o valor máximo de concentração obtido com exatidão e precisão satisfatórios.

Sensibilidade

A sensibilidade foi determinada simultaneamente aos testes de linearidade e expressa pela inclinação da curva de regressão na faixa linear.

Precisão

A precisão foi expressa pela dispersão dos resultados de repetitividade entre as replicatas das amostras comerciais e nos níveis de concentração do padrão de SO₂, por meio do coeficiente de variação (CV), usualmente expresso em %, também conhecido como desvio-padrão relativo (DPR), calculado conforme a Equação 3.

Equação 3

$$CV = DPR = \frac{DP \times 100}{CMD}$$

DP = desvio padrão;

CMD = concentração média determinada

Limite de quantificação (LQ)

O LQ foi estabelecido neste trabalho como o padrão de sulfito de sódio de menor concentração medido de forma quantitativa com o nível satisfatório de precisão e exatidão.

Seletividade

Para avaliar a seletividade do método ou o efeito da matriz foram utilizados os resultados dos ensaios para as amostras comerciais fortificadas pelo menos em três níveis de concentração (cogumelo em conserva, sucos de uva e maracujá) e do padrão SO₂ utilizando o teste de comparação de inclinação de retas analíticas de recuperação das amostras fortificadas *versus* padrão de SO₂, segundo a análise estatística de Student²⁸.

Tratamento estatístico dos dados

Comparação entre o uso de ácido clorídrico e fosfórico

Para demonstrar a significância de resultados decorrentes da alteração do método original, recorreu-se ao teste F (Distribuição *Fisher-Snedecor*) e teste t (*Student*)²⁴. O teste F se baseia na comparação de variâncias F-Snedecor. Nesse teste, o F calculado é obtido por meio da divisão das variâncias, colocando-se a maior variância no numerador. Ao mesmo tempo, o valor de F tabelado é obtido, com (n₁-1) graus de liberdade no numerador e (n₂-1) graus de liberdade no denominador, para um nível de

confiança de 95 %. Os valores de F_{calc} e F_{tab} são comparados. Se o F_{calc} for menor que o F_{tab} , não há diferença estatística de variância entre os grupos estudados. Se as variâncias dos grupos forem semelhantes, os desvios-padrão dos 2 grupos de testes podem ser agrupados e a significância das diferenças das médias dos dois conjuntos de amostras pode ser testada com a distribuição t de *Student*, que verifica se há diferença estatística entre as médias encontradas. Se as variâncias forem diferentes, os desvios-padrão não são agrupados, mas também se testa as médias pelo teste t. O valor de t tabelado é obtido a partir da tabela da distribuição de *Student* para $(n_1 + n_2 - 2)$ graus de liberdade e o nível de confiança desejado. O nível de confiança estabelecido neste trabalho foi de 95 %. Se t_{calc} for menor que t_{tab} , não há diferença estatística entre as médias.

Seletividade

O efeito da matriz (seletividade) foi verificado por meio do teste de comparação de inclinação de retas analíticas, segundo a análise estatística de *Student*. As curvas analíticas de recuperação das amostras comerciais fortificadas pelo menos em três níveis de concentração (suco de uva, cogumelo em conserva e suco de maracujá) foram construídas obtendo-se a equação de reta por regressão linear, e as inclinações foram comparadas com a do padrão de SO_2 de acordo com as equações apresentadas por Rego²⁸. O valor de t tabelado foi obtido da distribuição t de *Student*, com $(GL_1 + GL_2)$ graus de liberdade e a confiança desejada que, neste caso, foi de 95 %. Se o valor de t_{calc} for menor que o de t_{tab} , pode-se concluir que as inclinações foram estatisticamente iguais e não há efeito de matriz (matriz não afeta o ensaio). Se o valor de t_{calc} for maior que o esperado, pode-se concluir que a matriz tem um efeito significativo sobre o resultado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Comparação entre o uso de ácido clorídrico e ácido fosfórico

Os resultados comparativos do uso dos reagentes ácido clorídrico ou ácido fosfórico, para acidificação no método Monier-Williams, na determinação de dióxido de enxofre (SO_2) a baixas concentrações (44 - 45 mg/L) revelaram recuperações relativas médias de 95 % (DP=3; DPR=3 %) para o ácido clorídrico e 96 % (DP=3; DPR=3 %) para o ácido fosfórico. Nas altas concentrações de SO_2 (2.419 - 2.675 mg/L) os resultados de recuperação foram de 107 % (DP=3; DPR=3 %) para o ácido clorídrico e 105 % (DP=2;

CV=2 %) para o ácido fosfórico. Nos testes estatísticos a baixas e altas concentrações de SO_2 , o teste F revelou homogeneidade entre variâncias (não houve diferença - nível de confiança de 95 %) e o teste t (presumindo variâncias equivalentes) evidenciou igualdade estatística entre as médias (nível de confiança de 95 %). Portanto, os ácidos clorídrico ou fosfórico podem ser utilizados na etapa de destilação do método Monier-Williams a baixas ou altas concentrações de SO_2 , sem alterações estatisticamente significativas dos resultados das análises. Ressalta-se, no entanto, que neste estudo de verificação da metodologia, optou-se pelo ácido clorídrico como preconizado pela AOAC¹².

Parâmetros de verificação do método Monier-Williams otimizado

Recuperação

Os resultados de recuperação relativa média e desvio-padrão relativo (DPR) das soluções-padrão de sulfito de sódio obtidos nos 10 níveis de concentração estão apresentados na Tabela 1. A recuperação relativa média variou de 87 % (5 mg/L) a 109 % (2.675 mg/L) estando de acordo com o método oficial Monier-Williams (AOAC)¹² que recomenda recuperação ≥ 80 % na concentração de SO_2 de 10 mg/L, assegurando a exatidão do resultado analítico.

Limite de quantificação (LQ)

A concentração de 5 mg/L (5 ppm), embora com recuperação satisfatória de 87 %, revelou menor precisão por apresentar maior dispersão dos resultados (DPR = 13 %) comparado ao $\text{DPR}_r \leq 8$ % para a concentração $< 10,0$ $\mu\text{g/mL}$ (ppm) estabelecido pela AOAC²⁹ como valor de desempenho para método-padrão com um único analito. Portanto, neste estudo, estabeleceu-se uma concentração acima, ou seja, 7 mg/L (7 ppm), expresso em SO_2 , como o LQ para o método, por apresentar recuperação relativa média de 96 % e DPR de 7 %, estando este valor de concentração ainda abaixo do LQ de 10 ppm estabelecido na validação do método (AOAC¹²).

Faixa de trabalho e faixa linear

Segundo a Figura 2(A), os resultados de recuperação nos 9 níveis de concentração (exceto 5 mg/L devido a dispersão), quando plotados na curva de teores de SO_2 determinado e teórico, revelaram faixa linear de trabalho ou aplicação de 7 a 2.675 mg/L, com equação da reta $y = 1,0647x - 13,8697$, coeficientes de determinação (r^2) 0,9979 e de correlação linear (r) 0,9989. No gráfico de

Tabela 1. Recuperação relativa de dióxido de enxofre das soluções-padrão de sulfito de sódio nos níveis de concentração

SO ₂ teórico (mg/L) C*	SO ₂ encontrado Variação (mg/L)	SO ₂ encontrado Média (mg/L) CMD**	DP	DPR (%)	Recuperação Média (%)	Recuperação Variação (%)
2.675	2.893 - 2.932	2.913	28	1	109	108 - 110
2.419	2.488 - 2.621	2.555	94	4	106	103 - 108
1.371	1.327 - 1.394	1.368	32	2	100	97 - 102
825	868 - 917	886	27	3	107	105 - 111
285	270 - 288	278	8	3	97	95 - 101
45	41 - 43	42	1	3	94	91 - 96
44	40 - 44	42	2	4	96	91 - 100
13	11 - 12	11	1	5	87	85 - 92
7	6 - 7	7	1	7	96	86 - 100
5	4 - 5	4	1	13	87	80 - 100

*C = Concentração de SO₂ teórico obtido na padronização da solução de sulfito de sódio 0,05 M

**CMD = Concentração média determinada de SO₂ analítico encontrado no método Monier-Williams otimizado

Recuperação (%) = (CMD/ C) x 100

DP = Desvio padrão

DPR = desvio padrão relativo = DP/CMD * 100

resíduos (concentração *versus* diferença entre a resposta e o valor calculado pela equação da reta de regressão) pode ser evidenciada a inexistência de tendência, sendo os pontos independentes e não correlacionados, distribuídos aleatoriamente em torno do zero.

Linearidade

O coeficiente de correlação linear (r) de 0,9989 da curva de regressão dos resultados de recuperação do padrão sulfito de sódio foi maior que o valor mínimo de (r) 0,99 preconizado pela Anvisa²⁵, considerando-se, portanto, evidência do ajuste ideal dos dados para a linha de regressão bem como da linearidade.

Sensibilidade

A sensibilidade foi determinada simultaneamente aos testes de linearidade e expressa pela inclinação da curva na faixa de trabalho, lembrando-se que, quanto maior a inclinação, maior é a sensibilidade. Neste estudo, a sensibilidade foi de 1,0647, correspondente ao ângulo de inclinação de 46,8°, muito próximo a 45°, indicando que variações de concentração (eixo x) resultam em variações diretamente proporcionais na resposta (eixo y), ou seja, equivalência entre o valor teórico e o valor medido, bem como ausência ou minimização de erros sistemáticos.

Precisão

A precisão no estudo de recuperação das soluções-padrão de sulfito de sódio nos 9 níveis de concentração (exceto 5 mg/L) ficou estabelecida pelo desvio-padrão relativo (DPR) que revelou variação de 1 a 7 % (Tabela 1). O valor de DPR máximo obtido neste trabalho, de 7 % para a concentração de 7 mg/L (ppm), pode ser considerado satisfatório, segundo a AOAC²⁹, que apresenta para concentração <10,0 µg/mL (ppm) um DPR_r ≤ 8 % como valor de desempenho para um único analito.

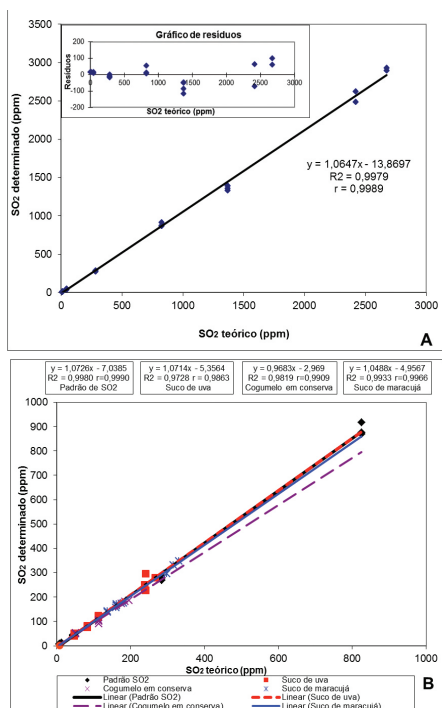


Figura 2. (A) Curva de regressão dos teores de SO₂ teórico e determinado no método Monier-Williams otimizado e Gráfico de resíduos. (B) Comparação da inclinação das curvas de regressão do padrão SO₂ e das amostras comerciais fortificadas no estudo da seletividade do método Monier-Williams otimizado

Tabela 2. Teores de dióxido de enxofre encontrados nas amostras comerciais de sucos, água de coco e cogumelo em conserva

Amostras	Marca /	SO ₂ (mg/kg)	SO ₂ (mg/kg)	DP	DPR
	Lote	Média*	Variação		
Suco de caju	A	284	276-298	12	4
	B	198	194-202	4	2
	C	194	186-201	7	4
Suco de maracujá	A - Lote 1	133	131-134	1	1
	A - Lote 2	121	119-123	2	2
	B	117	108-126	9	8
	C - Lote 1	118	111-122	6	5
	C - Lote 2	138	133-142	4	3
	D	87	76-95	7	8
Suco de uva	A	<LQ	<LQ	-	-
	B	<LQ	<LQ	-	-
	C - Lote 1	10	10-11	0,4	4
	C - Lote 2	<LQ	<LQ	-	-
	C - Lote 3	20	16-23	3	16
Água de coco	E	65	61-71	5	8
	F	48	47-49	1	2
Cogumelo em conserva	G	1130	1052-1180	69	6
	H	64	63-65	1	2
	I	70	66-75	6	9
	J	8	8	0,2	3
	K - Lote 1	35	35	0,2	0
	K - Lote 2	33	32-35	2	5

LQ = limite de quantificação (7 mg/kg) *Média de triplicata DP = Desvio-padrão DPR = Desvio-padrão relativo

Teor de dióxido de enxofre nas amostras comerciais

A Tabela 2 apresenta os resultados obtidos de SO₂, nas amostras de sucos integrais de caju, maracujá e uva, água de coco e cogumelo em conserva. Os teores médios de SO₂ encontrados nos sucos variaram de 194 a 284 mg/kg para caju, de 87 a 138 mg/kg para maracujá, menor que LQ a 19 mg/kg para uva e de 48 a 65 mg/kg para água de coco. Estes valores estavam de acordo com a legislação brasileira de aditivos intencionais, do Ministério da Saúde. Os resultados de SO₂ das 6 amostras de cogumelo em conserva variaram de 8 a 1.130 mg/kg, sendo que 3 amostras revelaram teores médios de SO₂ superiores ao limite máximo estabelecido pela legislação brasileira, que é de 50 mg/kg. Uma amostra apresentou elevado teor de SO₂ (1.130 mg/kg). Verificaram-se teores

de SO₂ muito próximos para as amostras comerciais de mesma marca com diferentes lotes.

Yabiku et al²⁷, em análise de 473 amostras de sucos de frutas naturais, do tipo integral, de diversas marcas, encontraram em 51 % das amostras valores de SO₂ acima da legislação, sendo que o suco de caju é o que apresentou valor mais elevado, atingindo o máximo de 1439 mg/kg. Bragagnolo et al³⁰, avaliou o teor de dióxido de enxofre de 25 amostras comerciais de cogumelos em conserva e verificou que 68 % encontraram-se acima dos 50 mg/kg permitidos pela legislação vigente, sendo que os níveis variaram de não detectado a 1.052 mg/kg. Machado¹¹, em 39 sucos de fruta analisados, concluiu que as amostras continham concentração de SO₂ dentro do limite da legislação e

Tabela 3. Recuperação de SO₂ das amostras comerciais adicionadas de padrão sulfito de sódio

Amostra	SO ₂ (mg/kg) na amostra fortificada (C ₁)	SO ₂ (mg/kg) na amostra (C ₂)	SO ₂ (mg/kg) adicionado (C ₃)	Recuperação* (%)	Recuperação média (%)	DP	DPR (%)
Suco de caju	283		74	120			
	277	194	73	114	113	8	7
	286		88	105			
	459		236	112			
	465	194	234	116	112	4	3
	446		232	109			
Suco de maracujá	331		198	108			
	348	118	212	108	105	6	5
	296		180	99			
	166		43	110			
	166	118	43	112	115	7	6
	171		43	122			
	176		64	92			
	156	117	43	91	92	1	1
	143		50	112			
	139	87	50	104	108	6	5
Suco de uva	251		238	105			
	247	<LQ	238	104	102	5	5
	230		238	97			
	78		83	94			
	83	<LQ	83	100	95	4	4
	76		83	92			
	227		240	95			
	297	<LQ	240	124	108	15	14
	279		267	104			
	52		47	111			
	41	<LQ	47	87	97	12	12
	44		47	94			
	120		93	108			
118	20	93	105	108	3	2	
123		93	111				
Água de coco	78		29	103			
	77	48	29	100	101	3	3
	77		29	100			
	162		112	104			
	166	46	112	107	105	2	2
	161		112	103			
Cogumelo em conserva	182		121	98			
	185	64	131	92	96	4	4
	174		111	99			
	53		16	112			
	49	35	16	88	98	13	13
	50		16	94			
	101		81	84			
	91	33	81	72	81	9	11
105		81	89				

*Recuperação (%) = $(C_1 - C_2) * 100 / C_3$ (Inmetro, 2010)² C₁ = concentração de SO₂, determinada na amostra adicionada de solução padrão (fortificada);

C₂ = concentração de SO₂, determinada na amostra diretamente, sem adição de padrão;

C₃ = concentração de SO₂, que foi adicionada à amostra.

DP = Desvio-padrão DPR = Desvio-padrão relativo

que a maioria delas estava abaixo de 50 % do limite máximo permitido.

Recuperação de SO₂ nas amostras comerciais fortificadas

Na Tabela 3 estão apresentados os teores de SO₂ determinados nas amostras comerciais fortificadas (C₁), o teor inicial obtido na amostra (C₂), os valores adicionados (C₃), os resultados de recuperação e recuperação média, desvio-padrão (DP) e desvio-padrão relativo (DPR), tendo-se o mínimo de 2 e o máximo de 5 níveis de concentração na fortificação. As recuperações médias para os sucos foram de 112-113 % para caju; 92-115 % para maracujá; 95-108 % para uva; 101-105 % para a água de coco e 81-98 % para o cogumelo em conserva. Os resultados de recuperação de SO₂ nas amostras comerciais com variação de 81 % a 115 % estão de acordo com as recomendações da AOAC¹², que preconiza valores ≥ 80 %, para alimentos fortificados. O DPR com mínimo de 1 % e máximo de 14 % também foi inferior ao DPR_r de 16,9 % para suco de fruta, estabelecido no estudo interlaboratorial para sulfitos (AOAC¹² – Tabela 990.28).

Seletividade

Referente à seletividade ou efeito de matriz, a Figura 2 (B) apresenta as curvas de regressão linear de SO₂ teórico e SO₂ determinado no método Monier-Williams para o padrão sulfito de sódio e amostras de suco de uva, cogumelo em conserva e suco de maracujá fortificadas pelo menos em três níveis de concentração (resultados da Tabela 3). O padrão SO₂ na faixa de concentração de 7 a 825 mg/L revelou linearidade com equação da reta $y = 1,0726x - 7,0385$ e coeficiente de correlação (r) 0,9990. O coeficiente angular da reta (1,0726) corresponde ao ângulo aproximado de 47°, indicando sensibilidade satisfatória. Segundo as equações de regressão das amostras fortificadas, a mesma tendência de linearidade e sensibilidade foi verificada. Tem-se um pequeno distanciamento da curva de regressão para o cogumelo em conserva, devido, provavelmente, ao seu estado sólido, comparado às outras matrizes líquidas que favorecem a remoção do SO₂ (livre e ligado).

As concentrações de SO₂, os graus de liberdade (referente ao número de repetições) e as equações da reta de regressão foram utilizadas no teste de comparação de inclinação de retas, segundo a análise estatística

de Student²⁸. Aplicando-se o teste t-Student para as inclinações das retas de recuperação do padrão de SO₂ ($b_1=1,0726$) e do suco de uva fortificado ($b_2=1,0714$), com critério de aceitação de 95 %, obteve-se $t_{\text{calc}}=0,003$ e $t_{\text{tab}}=2,034$. Como $t_{\text{calc}} < t_{\text{tab}}$ pode-se concluir que $b_1=b_2$, isto é, os coeficientes angulares das retas foram equivalentes, não havendo efeito de matriz.

O teste t-Student para inclinações também foi aplicado para as outras amostras, revelando para o cogumelo em conserva $t_{\text{calc}}=1,358 < t_{\text{tab}}=2,052$, e suco de maracujá $t_{\text{calc}}=0,447 < t_{\text{tab}}=2,048$, evidenciando a não existência de efeito de matriz para as amostras comerciais avaliadas. Os resultados estatísticos mostraram a não influência das matrizes de sucos de uva, maracujá e cogumelo em conserva, o que pôde também ser observado pelas pequenas variações das inclinações das retas apresentadas na Figura 2(B). Portanto, ficou estabelecida a seletividade do método Monier-Williams na determinação de dióxido de enxofre e, portanto, os estudos de linearidade, limite de quantificação, sensibilidade, exatidão e precisão podem ser realizados na curva padrão (sem as respectivas matrizes).

Os resultados do estudo de verificação mostraram que o desempenho do método Monier-Williams otimizado foi adequado para a análise de dióxido de enxofre, com limite de quantificação de 7 mg/L, faixa linear de trabalho de 7 a 2.675 mg/L, coeficiente de determinação (r²) de 0,9979, sensibilidade de 1,0647, recuperação de 87 – 109 %, repetitividade com DPR ≤ 7 %, sendo seletivo sem influência de matriz para os sucos integrais de uva, maracujá e cogumelo em conserva.

CONCLUSÃO

O método Monier-Williams otimizado revelou seletividade, boa precisão e exatidão na determinação de dióxido de enxofre (SO₂) em sucos de frutas, água de coco e cogumelo em conserva. A faixa linear de trabalho, o limite de quantificação e a sensibilidade foram adequados para os teores que são encontrados normalmente nas amostras de alimentos.

Os altos níveis de SO₂ nos cogumelos em conserva evidenciam uma preocupação de saúde pública, necessitando melhoria no controle de qualidade industrial e maior atuação da fiscalização, assegurando a saúde do consumidor.

Apesar do método de Monier-Williams otimizado demandar tempo longo de análise, ele é simples,

reprodutivo e não requer reagentes e equipamentos caros, possibilitando o uso da metodologia na rotina dos laboratórios de controle de qualidade.

DEDICATÓRIA

As autoras dedicam esse artigo ao Prof. Dr. Jaim Lichtig, grande amigo, colaborador e incentivador da nossa pesquisa, e que recentemente nos deixou lembranças e saudades.

REFERÊNCIAS

1. Taylor SL, Higley NA, Bush RK. Sulfites in foods: uses, analytical methods, residues, fate, exposure assessment, metabolism, toxicity, and hypersensitivity. *In: Chichester CO. Advances in Food Research*. Orlando: Academic Press, Inc.; 1986. p. 1-76.
2. Whitaker JR. Enzymes. *In: Fennema OR. Food Chemistry*. New York: Marcel Dekker; 1996. p. 431-530.
3. Haard NF, Chism GW. Characteristics of edible plant tissues. *In: Fennema OR. Food Chemistry*. New York: Marcel Dekker; 1996. p. 943-1011.
4. Sayavedra-Soto LA, Montgomery MW. Inhibition of polyphenoloxidase by sulfite. *J Food Sci*. 1986;51(6):1531-36.
5. Fazio T, Warner CR. A review of sulphites in foods: analytical methodology and reported findings. *Food Addit Contam*. 1990;7(4):433-54.
6. Sulfur dioxide and sulfites (WHO Food Additives Series 18). [Acesso 2009 abr 10]. Disponível em: [<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v18je14.htm>].
7. Walker R. Sulphiting agents on foods: some risks/benefit considerations. *Food Addit and Contam*. 1985;2(1):5-24.
8. Brasil. Ministério da Saúde. CNS. Resolução nº 4, de 24 de novembro de 1988. Aprova a revisão das Tabelas I, III, IV e V referente a aditivos intencionais, bem como os anexos I, II, III e VII, todos do Decreto nº 55.871, de 26/03/1965. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, 19 dez 1988. p. 24.716-23.
9. Brasil. Ministério da Saúde. ANVISA. Resolução RDC nº 12, de 10 de janeiro de 2002. Aprova a Extensão de uso do aditivo INS 220, dióxido de enxofre na função de conservador para suco de caju. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, 14 jan. 2002. Seção 1, nº 9. p.51.
10. Leclercq C, Molinaro MG, Piccinelli R, Baldini M, Arcella D, Stacchini P. Dietary intake exposure to sulphites in Italy – analytical determination of sulphite-containing foods and their combination into standard meals for adults and children. *Food Addit Contam*. 2000;17(12):979-89.
11. Machado RMD. Determinação dos níveis de sulfitos em vinhos e em sucos de frutas e estimativa de sua ingestão [tese de doutorado]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2007.
12. AOAC. Official methods of analysis of AOAC International. AOAC Official Method 990.28. Sulfites in Foods. Optimized Monier-Williams Method. 18th ed. Gaithersburg (MD); 2006. Chapter 47. Section 47.3.43, p. 29-31.
13. Pizzoferrato L, Quattrucci E, Di Lullo G. Evaluation of an HPLC method for the determination of sulphiting agents in foods. *Food Addit and Contam*. 1990;7(2):189-95.
14. Kim HJ. Comparison of the ion exclusion chromatographic method with the Monier-Williams method for determination of total sulfite in foods. *J Assoc Off Anal Chem*. 1989;72(2):266-72.
15. Devries JW, Ge H, Ebert FJ, Magnuson JM, Ogawa MK. Analysis for total sulfite in foods by using rapid distillation followed by redox titration. *J Assoc Off Anal Chem*. 1986;69(5):827-30.
16. Vahl JM, Converse JE. Ripper procedure for determining sulfur dioxide in wine: collaborative study. *J Assoc Off Anal Chem*. 1980;63(2):194-9.
17. Beutler HO. A new enzymatic method for determination of sulphite in food. *Food Chem*. 1984;15:157-64.
18. Pizzoferrato L, Di Lullo G, Quattrucci E. Determination of free, bound and total sulphites in foods by indirect photometry HPLC. *Food Chem*. 1998;63(2):275-9.
19. Mcfeeters RF, Barish AO. Sulfite analysis of fruits and vegetables by high-performance liquid chromatography (HPLC) with ultraviolet spectrophotometric detection. *J Agric Food Chem*. 2003;51(6):1513-7.
20. Warner CR, Daniels DH, Fitzgerald MC, Joe FLJr, Diachenko GW. Determination of free and reversibly bound sulphite in foods by reverse-phase, ion-pairing high performance liquid chromatography. *Food Addit Contam*; 1990;7(5):575-81.
21. Sullivan JJ, Holligworth TA, Wekell MM, Meo VA, Saba HH, Etamad-Moghadam A, et al. Determination of total sulfite in shrimp, potatoes, dried pineapple and white wine by flow injection analysis: collaborative study. *J Assoc Off Anal Chem*. 1990;73(1):35-42.
22. Ruiz-Capillas C, Jiménez-Colmenero F. Application of flow injection analysis for determining sulphites in food and beverages: a review. *Food Chem*. 2009;112(2):487-93.
23. Martins PR, Popolim WD, Nagato LAF, Takemoto E, Araki K, Toma HE, et al. Fast and reliable analysis of sulphite in fruit juices using a supramolecular amperometric detector encompassing in flow gas diffusion unit. *Food Chem*. 2011;127(1):249-55.
24. INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos. Rio de Janeiro; 2011. Revisão 4, 19 p. DOQ-CGCRE-008.
25. Brasil. Ministério da Saúde. ANVISA. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Aprova o “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos”. [acesso 2011 Fev 25]. Disponível em: [<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php>].
26. Norma ABNT NBR ISO/IEC 17025. Requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração. Rio de Janeiro: ABNT, 2005. 31p.
27. Yabiku HY, Takahashi MY, Martins MS, Heredia R, Zenebon O. Níveis de conservadores intencionais em sucos naturais de frutas comercializadas no Brasil. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 1987;47(1/2):65-75.
28. Rego ECP. Determinação de 1-Hidroxipireno urinário como indicador da exposição humana a hidrocarbonetos

- policíclicos aromáticos [dissertação de doutorado]. Niterói (RJ): Universidade Federal Fluminense; 2007.
29. AOAC. Official methods of analysis of AOAC International. Appendix F: guidelines for standard method performance requirements. 2012. [acesso 2012 Nov 07]. Disponível em: [http://www.eoma.aoac.org/appendices.asp].
30. Bragagnolo N, Silva CA, Taniwaki MH. Avaliação dos teores de dióxido de enxofre e da qualidade microbiológica de cogumelos em conserva. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2001; 60(2):103-7.

Determinação de vitamina E na castanha de caju e sua relação com a recomendação nutricional em humanos

Determination of vitamin E in cashew and its relation to the nutritional recommendations in humans

RIALA6/1540

Evellyn Câmara GRILLO¹, Priscila Nunes COSTA¹, Mayara Santa Rosa LIMA¹, Penha Patrícia Cabral RIBEIRO¹, Andressa Fernanda de Lima BESERRA², Roberto DIMENSTEIN^{3*}

*Endereço para correspondência: ³Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Av. Senador Salgado Filho, n° 3000, Lagoa Nova, Natal, RN, Brazil, CEP: 59072-970. Tel: 55 (84) 3215-3416 ext. 212, fax 55 (84) 33422812. E-mail: rdimenstein@gmail.com

¹Departamento de Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

²Escola da Saúde, Universidade Potiguar, RN

Recebido: 12.09.2012 - Aceito para publicação: 08.01.2013

RESUMO

O alfa-tocoferol é a forma biologicamente mais ativa da vitamina E. Sua principal função está associada à capacidade antioxidante, que protege as membranas celulares dos danos ocasionados pelos radicais livres. Pela importância da ingestão adequada desta vitamina e pela escassez de dados brasileiros sobre seu teor nos alimentos, no presente estudo foi determinada a concentração de alfa-tocoferol em castanhas de caju e o valor obtido foi comparado ao requerimento nutricional em vitamina E. Foram analisadas quatro marcas de castanhas de caju torradas, obtidas em supermercados de Natal/RN. O alfa-tocoferol das amostras foi obtido pela extração lipídica e sua determinação foi realizada por meio de CLAE. Os valores da concentração de alfa-tocoferol nas castanhas analisadas foram expressos em média e desvio padrão. A concentração média de alfa-tocoferol em 100 g de castanha de caju torrada foi de $0,96 \pm 0,12$ mg. A quantidade desta vitamina contida na porção média de castanha de caju consumida pela população entrevistada foi correspondente a 3,6 % do requerimento nutricional diário em vitamina E. Conclui-se que as castanhas torradas analisadas não podem ser consideradas como boas fontes de alfa-tocoferol, em virtude de não terem atingido a porcentagem de 10 a 20 % do requerimento nutricional diário.

Palavras-chave. castanha de caju, alfa-tocoferol, recomendações nutricionais.

ABSTRACT

Alpha-tocopherol is the most biologically active form of vitamin E. Its main function is related to the antioxidant activity, which protects the cell membranes from damage caused by free radicals. Given to the importance of adequate intake of this vitamin and the scarcity of Brazilian data on their contents in foods, this study aimed at determining the alpha-tocopherol concentration in cashew nuts, and these findings were compared with the vitamin E nutritional requirement. In this context, four brands of roasted cashew nuts purchased in supermarkets in Natal/RN were analyzed. The alpha-tocopherol was extracted from samples by lipid extraction, and its determination was performed by HPLC. The alpha-tocopherol values in the analyzed nuts were expressed as mean and standard deviation. The average concentration of alpha-tocopherol in 100 g of roasted cashew nuts was 0.96 ± 0.12 mg. The amount of this vitamin contained in the medium portion of cashew-nuts consumed by the interviewed population was equivalent to 3.6 % of the daily nutritional requirement for vitamin E. The analyzed toasted nuts cannot be considered as good sources of alpha-tocopherol, as they did not reach the percentage of 10 to 20 % of the daily nutritional requirement.

Keywords. cashew nut, alpha-tocopherol, nutrition policy.

INTRODUÇÃO

O termo “vitamina E” é utilizado para descrever uma família de oito compostos estruturalmente relacionados, abrangendo alfa, beta, gama e delta-tocoferol. Essa nomenclatura inicial também designa os tocotrienóis¹. O alfa-tocoferol possui uma mistura equivalente de oito estereoisômeros, dependendo de como os carbonos quirais presentes na cauda fitil se ligam ao anel cromanol. A conformação RRR-alfa-tocoferol é a forma química que possui a maior atividade biológica².

Nos seres humanos, a vitamina E é absorvida juntamente com os lipídeos da dieta na região proximal do intestino delgado e, em seguida, é incorporada aos quilomícrons, sendo lançada na linfa e, posteriormente, chega à corrente sanguínea. Todas as formas químicas de vitamina E são igualmente absorvidas pelo intestino, o que sugere que não há uma seletividade específica durante esse processo³. A vitamina E atinge o fígado via quilomícrons remanescentes e, nesse órgão, a proteína transportadora de alfa-tocoferol é incorporada às lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), seletivamente aos demais tipos de tocoferóis absorvidos. Essas outras formas de vitamina E são bem menos retidas no organismo, sendo excretadas via bile, urina ou por vias desconhecidas⁴. Dessa forma, a absorção dos homólogos da vitamina E é semelhante, porém o alfa-tocoferol é predominante no sangue e tecidos⁵.

A principal função da vitamina E (em particular do alfa-tocoferol) é proteger os lipídeos poliinsaturados constituintes da membrana celular contra o ataque dos radicais livres. Outras funções se relacionam à estabilização da membrana por meio da formação de complexos com os produtos da hidrólise lipídica da mesma, como os ácidos graxos livres. O alfa-tocoferol é um eficiente removedor de radicais peróxido, sendo, portanto, capaz de interromper a cadeia de reações de propagação envolvendo esse radical livre. É importante salientar, ainda, que o radical tocoferil proveniente das reações com os radicais livres pode ser regenerado para a forma alfa-tocoferol por reações cíclicas de redox envolvendo a Coenzima Q³. Sendo assim, o alfa-tocoferol é importante na preservação da integridade das membranas celulares.

A ingestão inadequada de vitamina E tem sido relacionada ao desenvolvimento de doenças degenerativas, como o câncer, a arteriosclerose e outras patologias cardíacas⁶. A literatura dispõe de estudos nos

quais foram observadas situações de baixo consumo dessa vitamina pela população⁷⁻⁹.

De acordo com as Dietary Reference Intakes (DRI), a recomendação diária de vitamina E para indivíduos saudáveis, a partir dos 14 anos, é de 15 mg de alfa-tocoferol¹⁰. No estabelecimento dessas recomendações, leva-se em consideração a forma alfa-tocoferol da vitamina, uma vez que as outras formas de tocoferóis e os tocotrienóis, apesar de serem absorvidas, não podem ser convertidas na forma bioativa e são fracamente reconhecidas no fígado pela proteína transportadora de alfa-tocoferol⁵.

As fontes mais ricas em vitamina E são os óleos vegetais. Outras boas fontes do micronutriente incluem partes de plantas ricas em lipídeos, tais como sementes, grãos e castanhas¹¹.

Segundo Sancho¹², a castanha de caju é o verdadeiro fruto do cajueiro e apresenta grande valor comercial no Brasil e no exterior. Esse fruto é comestível depois de assado e bastante apreciado como tira-gosto ou na confecção de doces. Em alguns países, a castanha também é consumida crua e exerce uma considerável competitividade com a produção de nozes, amendoins, avelãs, pistaches, entre outros¹³.

Tem-se pouco conhecimento sobre a concentração do alfa-tocoferol em alimentos tipicamente brasileiros, como a castanha de caju. Assim, o objetivo deste trabalho foi quantificar o alfa-tocoferol em castanhas de caju adquiridas em grandes supermercados da cidade de Natal/RN e comparar esse valor ao requerimento nutricional de vitamina E para humanos.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas quatro tradicionais marcas (A, B, C e D) de castanhas de caju, adquiridas em grandes supermercados da cidade de Natal/RN, cuja fabricação tenha sido realizada com o prazo máximo de um mês até a data de análise, para evitar possíveis perdas da vitamina E por agentes externos.

As castanhas de caju foram transportadas até o Laboratório de Bioquímica dos Alimentos e da Nutrição, localizado no Departamento de Bioquímica da UFRN. Em seguida, foi realizada a extração do alfa-tocoferol e sua determinação ocorreu por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

Realizou-se a extração lipídica das castanhas de caju de cada marca e, para tanto, foram pesados

50 g do produto, que foram triturados com um pistilo e adicionados de 50 mL de solução salina a 0,9 %. Para formação do homogeneizado, a mistura foi fracionada em um Mixer por 5 minutos e, em seguida, foram retiradas duas alíquotas de 1 g, às quais acrescentou-se 1 mL de álcool etílico 95 % (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil). A extração foi realizada utilizando hexano (Quimex, São Paulo, Brasil), conforme adaptação do método de Ortega et al¹⁴.

Foram adicionados 2 mL de hexano a cada tubo, contendo o homogeneizado e o álcool etílico 95 %, em seguida as amostras foram agitadas durante 1 minuto e centrifugadas por 10 minutos (500 xg), após os quais removeu-se a camada hexânica para outro tubo. Esse procedimento foi realizado três vezes, sendo obtidos 6 mL do extrato hexânico, que foi agitado por 1 minuto para a retirada de uma alíquota de 3 mL de cada amostra extraída. Esta foi evaporada a 37 °C em banho-maria, obtendo-se o extrato seco.

Para a realização da aplicação, cada extrato seco foi dissolvido em 500 µL de diclorometano UV/HPLC (High Performance Liquid Chromatography) e agitado por 1 minuto. Após esse procedimento, a amostra redissolvida foi centrifugada por 2 minutos (500 xg). Foram aplicados 20 µL no cromatógrafo de marca Shimadzu, com bomba LC-10 AD Shimadzu, acoplado a um Detector SPD-10A Shimadzu UV-VIS e integrador Chromatopac C-R6A Shimadzu com uma coluna LC Shim-pack CLC-ODS (M) 4,6 mm x 25 cm. A fase móvel utilizada foi metanol: água (98:2), em sistema isocrático com fluxo de 1,0 mL/min e comprimento de onda de 292 nm.

A identificação e quantificação do alfa-tocoferol nas amostras foram estabelecidas por comparação com o tempo de retenção e a área do padrão de alfa-tocoferol. A concentração do padrão foi confirmada pelo coeficiente de extinção específico (ϵ 1%, 1 cm = 75,8 a 292 nm) em etanol absoluto (Merck, São Paulo, Brasil), como utilizado por Nierenberg e Nann¹⁵.

A linearidade do método foi verificada pela curva de calibração estabelecida com soluções padrões de concentrações crescentes de alfa-tocoferol (Sigma). A curva de calibração foi construída por regressão linear (concentrações dos padrões x área dos padrões) e foi obtido um valor de $r^2 = 0,9992$. Os limites de detecção e quantificação foram baseados na linearidade da curva do padrão, sendo obtidos valores de 0,65 µg/mL e 1,30 µg/mL, respectivamente. A acurácia do método foi avaliada, mostrando recuperação superior a 95 %. A precisão do

método foi verificada por meio do teste de repetitividade e o coeficiente de variação obtido foi inferior a 4 %.

A concentração de alfa-tocoferol nas castanhas de caju torradas analisadas foi expressa em média e desvio padrão e a unidade utilizada foi mg de alfa-tocoferol por 100 g de castanha. Para análise estatística foi utilizado o software Statistica 7 (StatSoft, Inc, Tulsa, OK, USA). As diferenças entre as concentrações de alfa-tocoferol das marcas de castanha de caju analisadas foram tratadas utilizando Análise de Variância (ANOVA), com teste post-hoc de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

Para definição da porção média de castanha de caju usualmente consumida, foram entrevistados 120 adultos voluntários residentes na região da grande Natal. A amostra foi obtida por conveniência e os critérios de exclusão foram: possuir dislipidemia, diabetes mellitus, nefropatia ou qualquer patologia ou sintoma que possa interferir no hábito alimentar e, para as mulheres, estar grávida. Utilizou-se como instrumento auxiliar um álbum fotográfico. Para elaboração deste álbum, considerou-se a menor porção, correspondendo a 5 castanhas (12,5 g), e as outras 2 referentes a quantidades presentes em embalagens comercializadas na cidade de Natal/RN (58,6 g e 100 g). Para facilitar a estimativa da porção usualmente consumida, foram expostas também as embalagens contendo castanhas de caju correspondentes às porções média e grande, contidas nas fotografias.

RESULTADOS

A concentração de alfa-tocoferol em 100 g de castanha de caju torrada, referente às quatro marcas analisadas, foi de $0,96 \pm 0,12$ mg. Após a comparação entre as marcas de castanha de caju adquiridas, foi verificado que a concentração de alfa-tocoferol da marca B é significativamente maior que as demais, sendo $p < 0,05$.

Por meio de entrevista realizada com 120 indivíduos adultos acerca da porção de castanha de caju torrada usualmente consumida, obteve-se uma média de $56 \pm 31,5$ g desse produto. Considerando o valor da concentração de alfa-tocoferol em 100 g de castanha de caju torrada obtido neste trabalho e a porção usualmente consumida, equivalente a 56 g para a população entrevistada, pode-se inferir que esta corresponde a 0,54 mg de alfa-tocoferol ou 3,6 % do requerimento nutricional diário em vitamina E, tendo em vista que

a recomendação é de 15 mg/dia de alfa-tocoferol para adultos saudáveis a partir dos 14 anos¹⁰. Já a porção de 100 g de castanha de caju torrada equivale a 6,4 % do requerimento nutricional em vitamina E (Figura 1).

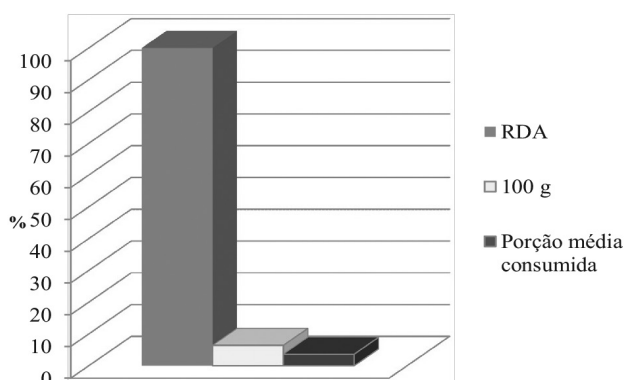


Figura 1. Nível de adequação da ingestão de alfa-tocoferol contido em 100 g de castanha de caju e na porção média consumida em relação ao requerimento nutricional em vitamina E

DISCUSSÃO

A composição nutricional dos alimentos é considerada uma informação básica para que sejam estabelecidas diversas ações em saúde, desde a prescrição dietética individual a estudos sobre o padrão de consumo alimentar. Porém, as tabelas de composição de alimentos (TCA) podem apresentar variações quanto ao teor nutricional que precisam ser identificadas e controladas para que sejam obtidas estimativas próximas da ingestão real daquele nutriente. As TCA podem ser consideradas incompletas quanto a certos nutrientes e a falta de descrição dos procedimentos analíticos utilizados pode comprometer a sua confiabilidade¹⁶.

Nas principais tabelas brasileiras de composição de alimentos não constam informações sobre as concentrações de vitamina E nos alimentos, ou é apresentada a concentração total de compostos conhecidos genericamente como vitamina E, sem especificar a quantidade de alfa-tocoferol, que é a forma química biologicamente ativa e, portanto, aquela relacionada ao requerimento nutricional para essa vitamina. Por isso, se faz necessária a realização de análises laboratoriais de alimentos, visando à atualização de dados precisos nas tabelas de composição.

A concentração média de alfa-tocoferol em castanhas de caju obtida neste trabalho é superior ao encontrado por Trox et al¹⁷ ($0,20 \pm 0,03$ mg/100 g) e

por Waheed-Uz-Zaman et al¹⁸ ($0,15 \pm 0,003$ mg/100 g), é inferior ao encontrado por Robbins et al¹⁹ ($1,48 \pm 0,33$ mg/100 g) e está em concordância com o valor apresentado na base de dados do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA – United States Department of Agriculture), ($0,92$ mg/100 g de castanha de caju)²⁰ (Figura 2). Já uma pesquisa realizada na Áustria não detectou alfa-tocoferol em castanhas de caju²¹.

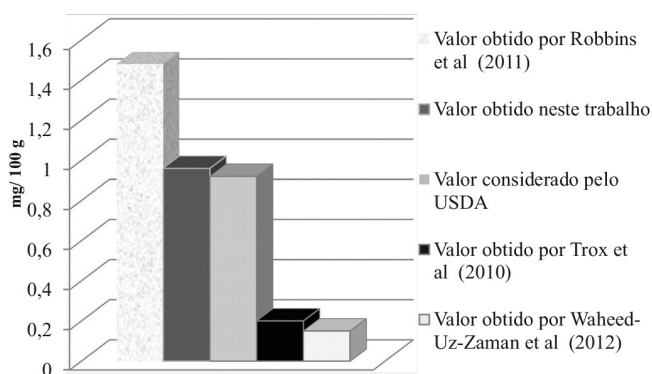


Figura 2. Concentração de alfa-tocoferol em castanhas de caju torradas, em comparação a outros estudos ou fontes de informação

Pode-se observar certa disparidade entre os valores de concentração de alfa-tocoferol em castanhas de caju obtidos por Trox et al¹⁷, Waheed-Uz-Zaman et al¹⁸, Robbins et al¹⁹ e aqueles determinados nesse trabalho. A variabilidade das informações encontradas na literatura¹⁷⁻¹⁹ acerca do conteúdo da vitamina E nos alimentos, em parte, pode ser explicada pelo fato de que esse teor sofre interferência de uma série de variáveis, como condições de cultivo e colheita, clima, características do solo, entre outras²².

Pode-se verificar que, no estudo realizado por Waheed-Uz-Zaman et al¹⁸, foi utilizado o método de Soxhlet para extração da fração lipídica, em que a amostra foi submetida a temperatura de 80 °C por 6 horas. Além disso, nesse estudo citado anteriormente e na pesquisa realizada por Trox et al¹⁷, as amostras foram submetidas ao processo de saponificação. Segundo Lima e Gonçalves²³, a saponificação, mesmo em condições brandas, leva a perdas de tocoferóis em óleos vegetais, inclusive em óleo de amêndoa de castanha de caju. Além disso, o estudo realizado por Rios e Pentead²⁴ verificou que a extração direta de alfa-tocoferol em alho mostrou maior recuperação que o procedimento de saponificação seguido da extração. Assim, diferenças metodológicas

referentes à extração do alfa-tocoferol presente na castanha de caju, nos estudos citados^{17,18}, podem ter contribuído para essa disparidade entre os resultados obtidos neste trabalho.

Sugere-se que sejam realizadas pesquisas laboratoriais como esta para a determinação da concentração de alfa-tocoferol em alimentos produzidos nacionalmente, pelo fato de esses dados serem escassos nas tabelas brasileiras de composição de alimentos, que são instrumentos importantes na avaliação e prescrição de dietas a nível individual e coletivo.

Segundo Freitas e Naves²⁵, a castanha de caju é considerada uma noz verdadeira e as nozes e sementes comestíveis são consideradas boas fontes de vitamina E para a alimentação humana, com destaque para o alfa-tocoferol.

A porção média de castanha de caju consumida pela população entrevistada corresponde a 3,6 % do requerimento nutricional em vitamina E, sendo assim, considera-se que esse alimento não pode ser classificado como alimento-fonte de alfa-tocoferol. Essa proposição está baseada na definição de alimento-fonte como aquele que contém mais de 5 % do valor da DRI (RDA ou AI) em uma porção usual²⁶.

A castanha de caju é um alimento energeticamente denso, pois contém um alto teor de lipídeos, aproximadamente de 46 %. Quanto à composição de ácidos graxos em oleaginosas, o conteúdo daqueles classificados como saturados é baixo (4 a 16 %) e a maior porcentagem se refere aos ácidos graxos insaturados. Diante disso, o perfil lipídico de castanhas em geral e nozes é um dos fatores que contribuem para os efeitos benéficos à saúde, decorrentes do seu consumo frequente. Além disso, as oleaginosas são alimentos ricos em proteínas de alta qualidade, fibras, minerais, fitoesteróis e compostos fenólicos. Estudos epidemiológicos têm associado o consumo de oleaginosas à redução da incidência de doenças coronarianas e cálculos biliares, em ambos os sexos, e diabetes, em mulheres²⁷.

Apesar de neste estudo a castanha de caju não ter sido classificada como um alimento-fonte de vitamina E, segundo Freitas e Naves²⁵, o consumo de nozes e sementes comestíveis deve ser estimulado, considerando suas propriedades nutricionais e alegações de saúde. Segundo Martínez-Lapiscina et al²⁸, o consumo de oleaginosas pode trazer benefícios quando integrado a um plano alimentar saudável. Além dos benefícios à saúde, a importância desse incentivo é justificada pelo consumo

alimentar médio *per capita* de 0,4 g de oleaginosas/dia, no Brasil, segundo a Pesquisa de Orçamento Familiar (2008-2009)²⁹.

CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos neste trabalho, infere-se que a castanha de caju não pode ser considerada um alimento-fonte de alfa-tocoferol, por não atingir uma porcentagem acima de 5 % da recomendação nutricional diária para esta vitamina em uma porção usual de consumo.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, pelo suporte financeiro concedido a este trabalho e às pessoas que participaram da definição da porção usualmente consumida de castanha de caju.

REFERÊNCIAS

1. Himmelfarb J, Kane J, Mcmonagle E, Zaltas E, Bobzin S, Boddupalli S, et al. Alpha and gamma tocopherol metabolism in healthy subjects and patients with end-stage renal disease. *Kidney Int.*2003;64:978-91.
2. Herrera E, Barbas C. Vitamin E: action, metabolism and perspectives. *J Physiol Biochem.*2001;57(2):43-56.
3. Vignini A, Alidori A, Montesi L, Raffaelli F, Nanetti L, Bertoli E, et al. Vitamin E, diabetes and related diseases: an update. *Mediterr J Nutr Metab.*2011;4:3-9.
4. Brigelius-Flohé R, Kelly FJ, Salonen JT, Neuzil J, Zingg J, Azzi A. The European perspective on vitamin E: current knowledge and future research. *Am J Clin Nutr.*2002;76:703-16.
5. Cozzolino SMF. Vitamina E (alfa-tocoferol). *In: Cozzolino SMF. Biodisponibilidade de Nutrientes. Barueri:Manole; 2005. p.276-92.*
6. Silva MG. Vitamina E. *In: Macadâmia nacional: tocoferóis e caracterização físico-química [dissertação de mestrado]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2003.*
7. Booth SL, Tucker KL, Mckeown NM, Davidson KW, Dallal GE, Sadowski JA. Relationships between Dietary Intakes and Fasting Plasma Concentrations of Fat-Soluble Vitamins in Humans. *J Nutr.*1997;127(4):587-92.
8. Pinheiro MM, Ciconelli RM, Chaves GV, Aquino L, Juzwiak CR, Genaro OS, et al. Antioxidant intake among Brazilian adults - The Brazilian Osteoporosis Study (BRAZOS): a cross-sectional study. *Nutr J.*2011;10:39.
9. Talegawkar SA, Johnson EJ, Carithers T, Taylor Jr. HA, Bogle ML, Tucker KL. Total a-Tocopherol Intakes Are Associated with Serum a-Tocopherol Concentrations in African American Adults. *J Nutr.*2007; 137:2297-303.
10. Institute of Medicine (US). Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids. Washington (DC): National Academy Press; 2000.

11. Frank J. Dietary Phenolic Compounds and Vitamin E Bioavailability: Model studies in rats and humans [tese de doutorado]. Sweden (Uppsala): Swedish University of Agricultural Sciences; 2004.
12. Sancho SO. Efeito do processamento sobre características de qualidade do suco de caju (*Anacardium occidentale* L) [dissertação de mestrado]. Fortaleza (CE): Universidade Federal do Ceará; 2006.
13. Chaves MH, Citó AMGL, Lopes JAD, Costa DA, Oliveira CAA, Costa AF, et al. Fenóis totais, atividade antioxidante e constituintes químicos de extratos de *Anacardium occidentale* L., Anacardiaceae. *Rev Bras Farmacogn*.2010;20(1):106-12.
14. Ortega RM, López-Sobaler AM, Martínez RM, Andrés P, Quintas ME. Influence of smoking on vitamin E status during the third trimester of pregnancy and on breast-milk tocopherol concentrations in Spanish women. *Am J Clin Nutr*.1998; 68:662-7.
15. Nierenberg DW, Nann SL. A method for determining concentrations of retinol, tocopherol, and five carotenoids in human plasma and tissue samples. *Am J Clin Nutr*.1992; 56:417-26.
16. Ribeiro P, Morais TB, Colugnati FAB, Sigulem DM. Tabelas de composição química de alimentos: análise comparativa com resultados laboratoriais. *Rev Saúde Publ*.2003; 37(2):216-25.
17. Trox J, Vadivel V, Vetter W, Stuetz W, Scherbaum V, Gola U, et al. Bioactive compounds in cashew nut (*Anacardium occidentale* L.) kernels: effect of different shelling methods. *J Agric Food Chem*.2010; 58(9):5341-6.
18. Waheed-Uz-Zaman, Akram M, Rehman R, Anwar J. Statistical Analysis and Quantification of alpha tocopherol in edible seeds and nuts of pakistan by reversed phase HPLC with UV/Visible Detector. *J Chem Soc Pak*.2012; 34(2):302-5.
19. Robbins KS, Shin E, Shewfelt RL, Eitenmiller RR, Pegg RB. Update on the healthful lipid constituents of commercially important tree nuts. *J Agric Food Chem*.2011; 59(22):12083-92.
20. National Nutrient Database for Standard Reference Release 24. Nutrient data for 12085, Nuts, cashew nuts, dry roasted, without salt added. [acesso 2012 set 10]. Disponível em: [http://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/3705].
21. Kornsteiner M, Wagner K, Elmadfa I. Tocopherols and total phenolics in 10 different nut types. *Food Chem*.2006;98(2):381-7.
22. Guinazi M. Tocoferóis e tocotrienóis em hortaliças, ovos e óleos vegetais utilizados em restaurantes comerciais [dissertação de mestrado]. Viçosa (MG):Universidade Federal de Viçosa; 2004.
23. Lima JR, Gonçalves LAG. Quantificação de tocoferóis em óleos de milho, soja, castanha do pará e castanha de caju por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em fase reversa. *Alim Nutr*.1997;8:65-73.
24. Rios MDG, Penteadó MVC. Determinação de α -tocoferol em alho irradiado utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). *Quim Nova*.2003; 26(1): 10-2.
25. Freitas JB, Naves MMV. Composição química de nozes e sementes comestíveis e sua relação com a nutrição e saúde. *Rev Nutr*.2010; 23(2): 269-79.
26. Philippi ST. Alimentação Saudável e a pirâmide dos alimentos. *In: Pirâmide dos Alimentos: Fundamentos básicos da Nutrição*. Barueri: Manole; 2008. p.3-29.
27. Ros E. Health benefits of nut consumption. *Nutrients*.2010; 2(7): 652-82.
28. Martínez-Lapiscina EH, Pimenta AM, Beunza JJ, Bes-Rastrollo M, Martínez JA, Martínez-González MA. Nut consumption and incidence of hypertension: the SUN prospective cohort. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*.2010; 20(5): 359-65.
29. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa de Orçamentos Familiares - 2008-2009: análise do consumo alimentar pessoal no Brasil. Rio de Janeiro; 2011.

Parâmetros de qualidade da anchoita (*Engraulis anchoita*) enlatada

Quality parameters of canned anchovy (*Engraulis anchoita*)

RIALA6/1541

Aline Porto de Oliveira CARVALHO*, Diego CORTEZIA, Milton Luiz Pinho ESPIRITO SANTO

*Endereço para correspondência: Laboratório de Controle de Qualidade de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande/FURG. Rua Eng. Alfredo Huch, 475, Pavilhão 3, Caixa Postal 474, CEP: 96.201-900, Rio Grande, RS, Brasil. Tel.: (53) 3233-8750, Fax: (53) 3233-8745. E-mail: alineportoengq@gmail.com
Recebido: 29.11.2012 – Aceito para publicação: 24.02.2013

RESUMO

Neste estudo foram elaboradas conservas de anchoita (*Engraulis anchoita*), avaliados o processo de enlatamento e as características físico-químicas e microbiológicas do enlatado. As conservas foram elaboradas utilizando-se dois meios de cobertura, tempos de salmouragem e pré-cozimentos, obtendo-se oito tratamentos distintos. As amostras foram analisadas quanto aos parâmetros físico-químicos e microbiológicos, bem como a avaliação da esterilidade comercial. As avaliações microbiológicas apresentaram conformidade com a legislação vigente para conservas de pescado. As conservas de pescado submetido à salmouragem por 5 minutos, adicionadas de molho de tomate sem pré-cozimento mostraram o maior percentual de NaCl (0,24 %) e de cinzas (4,10 %). Com relação ao teor proteico, o máximo valor de 16,97 % foi detectado no produto enlatado adicionado de óleo de girassol e submetido a 2 minutos de salmouragem, utilizando-se o pré-cozimento antes da recravação.

Palavras-chave. conservas de pescado, espécies pelágicas, controle de qualidade.

ABSTRACT

This study was conducted to elaborate the canned anchovy (*Engraulis anchoita*), and to evaluate the canning process, the physical-chemical and microbiological characteristics of the canned product. The canned anchovies were prepared with two topping liquids, employing different brine and pre-cooking times, which resulted in eight treatments. These samples were analyzed to determine the physical-chemical and microbiological characteristics, and the commercial sterility was assessed. The microbiological parameters were in compliance with the canned fish legislation in force. The canned anchovies submitted to brine for five minutes, preserved in tomato sauce and without pre-cooking procedure showed the highest percentage of sodium chloride contents (0.24 %) and of ashes (4.10 %). The canned anchovies preserved in sunflower oil, submitted to brine for two minutes, and pre-cooked showed the highest proteins contents (16.97 %).

Keywords. canned fish, pelagic species, quality control.

INTRODUÇÃO

Em muitos países, principalmente da Europa e Ásia, o pescado representa a principal fonte proteica de origem animal. O pescado marinho é fonte de iodo e contém uma concentração de cálcio quatro vezes maior que as carnes vermelhas, além de apresentar baixo conteúdo de tecido conjuntivo e ácidos graxos saturados, sendo, portanto, de fácil digestão¹.

A maior parte da captura mundial de pescado é de origem marinha, sendo metade correspondente a espécies demersais e a outra metade a espécies pelágicas. Os peixes pelágicos, devido a sua condição de habitat e por formarem grandes cardumes, são de importância industrial, podendo ser capturados com maior frequência².

Entre os pelágicos de pequeno porte, a anchoita (*Engraulis anchoita*) destaca-se em águas brasileiras, constituindo-se em um estoque alternativo abundante, com potencial estimado de captura sustentada de 135.000t/ano, sendo a maior parte da captura proveniente da região sul do país e em menor escala no sudeste². A distribuição da anchoita no Brasil vai desde Cabo Frio (RJ) até o Chuí (RS), sendo dominante durante os meses de julho a outubro³. No Brasil, esse recurso ainda não é explorado comercialmente. Dentre as razões para o não desenvolvimento da pesca de anchoita destaca-se, principalmente, o desconhecimento do mercado consumidor com relação a essa espécie. Outros fatores a serem considerados recaem no hábito para o consumo, o baixo rendimento obtido em função do tamanho da espécie, a rápida perda da qualidade associada a sua fragilidade durante o manuseio, a falta de tecnologia envolvendo as capturas e o desconhecimento dos sistemas de tratamento e acondicionamento a bordo para a preservação dessa matéria-prima⁴. Considerando o esgotamento de determinadas espécies devido à sobrepesca e o estoque abundante de anchoita na costa Sul do país, é possível o emprego desse pescado para a produção de conservas utilizando meios de cobertura como molho de tomate e óleos comestíveis, obtendo produtos semelhantes aos existentes no mercado, elaborados com sardinha (*Sardinella brasiliensis*)².

O presente estudo objetiva o processamento de conservas utilizando a anchoita como matéria-prima, a determinação da composição proximal do produto final, a estanqueidade das latas e a avaliação microbiológica das conservas adicionadas de molho com tomate e óleo de girassol.

MATERIAL E MÉTODOS

Matéria-prima e elaboração dos enlatados

O pescado utilizado para o enlatamento foi a anchoita (*Engraulis anchoita*) capturada na costa do Rio Grande/RS. A captura foi realizada por traineira, por arraste de meia-água, utilizando rede de cerco. Após a captura, a anchoita foi acondicionada na quantidade de 14 kg em caixas perfuradas de polipropileno e resfriada com gelo em escamas na proporção de 30 %. Após o desembarque, o pescado foi congelado e estocado a -25 °C para posterior processo de enlatamento.

Para a elaboração dos enlatados, as amostras de pescado foram descongeladas em câmara de resfriamento a 4 °C durante 24 h. As conservas foram preparadas com e sem pré-cozimento, utilizando-se dois meios de cobertura: molho de tomate e óleo de girassol. Para as latas submetidas ao pré-cozimento, este foi realizado utilizando vapor saturado a 95 °C por 20 min. Durante essa operação, o líquido de constituição do pescado foi exsudado e removido por gravidade, considerando que as latas foram processadas com o fundo voltado para cima na esteira transportadora. Os tempos de salmouragem foram estabelecidos em 2 e 5 min na concentração salina de 24 °Bé. O molho de tomate foi preparado a partir da polpa de tomate concentrada (30 – 32 °Brix) diluído em água na proporção 3:1. As embalagens utilizadas foram fabricadas em alumínio com 2 peças, corpo e tampa, com capacidade para 125 g (peso líquido). Dos lotes produzidos foram retiradas 3 amostras (latas) de cada tratamento e as determinações foram realizadas em triplicata. O tratamento térmico foi realizado a 115 °C por 20 min. O enlatamento, bem como todas as outras operações que o antecederam, foi realizado na Indústria Actemsa S.A.

Caracterização química do pescado em conserva

Após a abertura das latas, o meio de cobertura foi escorrido por 2 min utilizando peneira inox. Este procedimento de preparação das amostras seguiu as orientações do Laboratório Nacional de Referência Animal – LANARA⁵. Em seguida, as amostras foram homogeneizadas para a realização das determinações analíticas. O teor de umidade foi determinado por gravimetria por meio de secagem em estufa a 105°C até a obtenção de peso constante segundo metodologia descrita pelo Instituto Adolfo Lutz⁶. As proteínas foram quantificadas pelo método micro-Kjeldahl (Association of Official Analytical Chemists – AOAC)⁷. No cálculo, foi

utilizado o fator de conversão específico 6,25. Os lipídios foram determinados em extrator Soxhlet, segundo a técnica descrita pelo Instituto Adolfo Lutz⁶.

A determinação de cinzas foi realizada de acordo com o método descrito pela AOAC, pela incineração em mufla a 500 – 550 °C⁷. Os cloretos foram determinados como cloreto de sódio, segundo metodologia descrita pelo Instituto Adolfo Lutz⁶. O método utiliza cromato de potássio 10 % como indicador e titulação com solução de nitrato de prata 0,1N.

Avaliações microbiológicas

A determinação de *Staphylococcus* coagulase positiva foi realizada conforme o método descrito pela Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003⁸. O método utilizou o Ágar Baird-Parker como meio de crescimento. As placas foram incubadas invertidas a 36 ± 1 °C por 48 h.

A detecção de *Salmonella* spp. foi realizada segundo técnica descrita pela American Public Health Association – APHA⁹, a qual utiliza dois meios distintos para o enriquecimento seletivo: Caldo Selenito-cistina (CSC) e Caldo Tetrionato (CTT). Os meios foram incubados a 36 ± 1 °C por 24 h. O plaqueamento seletivo foi realizado em Ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD) e Brilliant-green Phenol-red Lactose Sucrose Agar (BPLS), e as placas foram incubadas invertidas a 36 ± 1 °C por 24 h.

A determinação de *Clostridium* sulfito redutor foi realizada segundo a Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003⁸, o qual utiliza como meio base o Ágar Triptose Sulfito Cicloserina (TSC). As placas foram colocadas em jarro de anaerobiose e incubadas a 36 ± 1 °C durante 24 h.

O teste de esterilidade comercial foi realizado conforme a Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003⁸, as amostras permaneceram incubadas a 36 ± 1 °C

por 10 dias e a 55 ± 1 °C por 7 dias, objetivando a detecção de crescimento bacteriano e/ou possível vazamento evidenciado pelo estufamento da embalagem metálica.

Avaliação estatística

Os dados obtidos experimentalmente foram avaliados por análise de variância (ANOVA) e teste de comparação de médias de Tukey, ao nível de 5 % de significância, utilizando-se o programa *Statistica for Windows* versão 6.0¹⁰.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliação das conservas utilizando como meio de cobertura o molho de tomate

A definição dos tempos de salmouragem e pré-cozimento da anchoita eviscerada estão representados na Tabela 1.

Tabela 1. Tempos de salmouragem e pré-cozimentos da anchoita eviscerada

Operações	Tratamentos			
	1	2	3	4
Tempo de salmouragem (min)	2	2	5	5
Pré-cozimento	Sim	Não	Sim	Não

A Tabela 2 apresenta os valores da composição química das conservas de anchoita (*Engraulis anchoita*) em molho de tomate. Os teores são expressos sobre o músculo comestível da anchoita eviscerada com pele.

Os resultados apresentados na Tabela 2 demonstram que os teores de umidade no músculo do pescado não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos executados.

Considerando os tempos de salmouragem pré-estabelecidos, não houve diferenças significativas

Tabela 2. Composição química da anchoita eviscerada (g/100 g) enlatada com molho de tomate

*Componentes (%)	Tratamentos			
	1	2	3	4
Proteínas	16,57 ± 0,04 ^a	16,24 ± 0,05 ^a	15,94 ± 0,04 ^a	15,31 ± 0,02 ^a
Lipídios	3,94 ± 0,02 ^a	4,66 ± 0,02 ^b	3,15 ± 0,01 ^a	4,90 ± 0,01 ^b
Umidade	73,0 ± 0,06 ^a	73,28 ± 0,04 ^a	73,70 ± 0,23 ^a	73,98 ± 0,05 ^a
Cinzas	3,22 ± 0,16 ^a	3,67 ± 0,01 ^b	3,80 ± 0,02 ^b	4,10 ± 0,11 ^c

Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas ao nível de 95 % de confiança (p < 0,05).

*Resultados (média ± desvio padrão).

nos teores de cinzas para as conservas submetidas aos tratamentos 2 e 3. Comparando os teores de cinzas entre os tratamentos 1 e 2, os quais foram submetidos ao mesmo tempo de salmouragem, verificou-se que as amostras sem a aplicação do pré-cozimento apresentaram resultados superiores de cinzas. De modo análogo, para as conservas submetidas aos tratamentos 3 e 4, com tempo de salmouragem de 5 min, os valores de cinzas foram superiores nas amostras sem pré-cozimento. O cloreto de sódio absorvido durante a salmouragem pode ter sido a causa da elevação do teor de cinzas para as amostras não submetidas ao pré-cozimento. Os teores proteicos não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos realizados. Considerando tempos de salmouragem diferenciados, os percentuais lipídicos foram superiores para as conservas que não foram submetidas ao pré-cozimento. Uma justificativa a ser considerada é a possível variabilidade do teor de lipídios na matéria-prima utilizada no experimento, decorrente de uma desuniformidade na composição química da espécie envolvida em função da época de captura e tamanho do pescado. Outra justificativa a ser considerada é o reduzido período de tempo entre o enlatamento do pescado propriamente dito e a ocorrência das análises. Há necessidade de uma estabilidade do produto que só acontecerá com o tempo de quarentena realizado durante a estocagem. Furlan, et al¹¹, avaliando a composição química da anchoita processada, encontraram 16,80 % de proteínas, valor sensivelmente superior aos encontrados neste trabalho. Colembegue et al¹², avaliando a composição química da sardinha (*Sardinella brasiliensis*) enlatada em molho com tomate, encontraram os seguintes valores para a composição química: 19,35 % proteínas, 15,11 % lipídios, 62,44 % umidade e 2,70 % cinzas. Em comparação com esses resultados, a anchoita apresentou valores proteicos e lipídicos inferiores, e percentuais superiores de umidade e cinzas.

Avaliação das conservas utilizando como meio de cobertura o óleo de girassol

Os valores obtidos na composição química das conservas de anchoita enlatada em óleo de girassol estão apresentados na Tabela 3. Os percentuais estão expressos sobre o músculo comestível, com pele. A definição dos tempos de salmouragem e pré-cozimento da anchoita eviscerada estão representados na Tabela 1.

Como podem ser observados na Tabela 3, os teores de cinzas apresentaram diferenças significativas para os tratamentos com diferentes tempos de salmouragem. Este parâmetro obteve valores superiores para os tratamentos 3 e 4, considerando a salmouragem de 5 minutos, o que poderia ter ocasionado uma maior absorção de cloreto de sódio pelo músculo do pescado, elevando este teor. Similar às conservas de anchoita em molho de tomate, este parâmetro apresentou valores superiores para as amostras que não foram submetidas a operação de pré-cozimento e mesmo tempo de salmouragem. Sem a operação de pré-cozimento, o pescado retém uma maior quantidade da água de constituição e, por decorrência, o cloreto de sódio absorvido durante a salmouragem, o que pode elevar o nível desse parâmetro (cinzas). Os teores lipídicos encontrados foram superiores para aquelas amostras processadas com o pré-cozimento. Isto se deve provavelmente a uma maior absorção do óleo de girassol pelo músculo do pescado submetido a esta operação. No pré-cozimento, o músculo do pescado perde umidade e, quando é adicionado o meio de cobertura, há uma tendência a ser absorvido pela musculatura do pescado, induzindo o aumento.

Na Tabela 3, ainda, pode-se observar que o teor de umidade foi inferior para os tratamentos em que as conservas foram submetidas ao pré-cozimento. Com relação ao percentual de proteínas encontrado, de forma similar às avaliações envolvidas com as conservas adicionadas de molho de tomate, não apresentaram diferenças significativas para os quatro tratamentos realizados.

Tabela 3. Composição química da anchoita eviscerada (g/100 g) enlatada com óleo de girassol

*Componentes (%)	Tratamentos			
	1	2	3	4
Proteínas	16,97 ± 0,07 ^a	16,76 ± 0,06 ^a	15,97 ± 0,06 ^a	15,89 ± 0,21 ^a
Lipídios	7,68 ± 0,01 ^a	5,70 ± 0,06 ^b	7,91 ± 0,03 ^a	5,19 ± 0,08 ^b
Umidade	65,87 ± 0,15 ^a	68,74 ± 0,24 ^b	66,26 ± 0,32 ^{ac}	68,23 ± 0,01 ^{bc}
Cinzas	3,16 ± 0,04 ^a	3,28 ± 0,01 ^a	3,78 ± 0,13 ^b	3,87 ± 0,17 ^b

Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas ao nível de 95 % de confiança (p < 0,05).

*Resultados (média ± desvio padrão)

Pizato et al¹³, avaliando conservas de tilápia em óleo comestível, encontraram os seguintes resultados: proteína 12,2 %; lipídios 32,7 %; umidade 48,4 % e cinzas 3,1 %. Observa-se que a anchoita enlatada apresentou maiores conteúdos proteicos, de cinzas e umidade, e valores lipídicos inferiores. Pfeil et al,¹⁴ em trabalhos de pesquisa com sardinhas (*Sardinella brasiliensis*) enlatadas com óleo comestível, encontraram valores diferenciados para a composição química das conservas com e sem pré-cozimento: 25,58 e 25,21 % proteínas; 7,79 e 5,34 % lipídios; 63,78 e 64,85 % umidade; 3,85 e 4,38 % cinzas, respectivamente às operações envolvidas. A anchoita enlatada em óleo de girassol apresentou percentuais proteicos e de cinzas inferiores, conteúdo lipídico semelhante e valores de umidade superiores.

Avaliação do teor de cloretos

A operação de salmouragem tem a finalidade de eliminar a limosidade superficial do pescado e de melhorar sua textura. Em determinadas operações, quando o enlatamento é realizado sem a aplicação da salmouragem, porções da pele podem manter-se aderidas à superfície interna da embalagem ocasionando o rompimento da musculatura no momento da retirada do produto da lata⁴. Para as conservas de anchoita em molho de tomate e óleo de girassol, os teores de cloretos avaliados para cada tratamento estão apresentados na Tabela 4.

Como pode ser observado na Tabela 4, o teor de cloretos da anchoita enlatada em molho de tomate não apresentou diferenças significativas nos tratamentos executados utilizando o mesmo tempo de salmouragem.

As conservas de anchoita em óleo de girassol não apresentaram diferenças significativas relacionadas com os teores de cloretos entre as amostras submetidas ao diferentes tempos de salmouragem (2 e 5 min), com ou sem o emprego de pré-cozimento. Comparando-se os teores de cloretos obtidos para as amostras de anchoita enlatada com diferentes meios de cobertura e, submetidas aos mesmos tratamentos de salmouragem e pré-cozimento, podemos observar que as conservas adicionadas de molho de tomate apresentaram resultados superiores para este parâmetro (0,17, 0,19, 0,21 e 0,24 %). Isto se deve provavelmente ao teor de cloreto de sódio presente no molho de tomate adicionado como meio de cobertura. Para as conservas adicionadas de óleo de girassol, o teor de cloretos é proveniente somente do pescado de origem marinha e do efeito da salmouragem.

Determinação microbiológica das conservas de anchoita

Nas determinações realizadas não foi observado crescimento de colônias características relacionadas com os micro-organismos avaliados (Tabela 5).

De acordo com a Resolução RDC nº 12/2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa¹⁵,

Tabela 4. Teor de cloretos (NaCl) na anchoita enlatada adicionada de molho de tomate e óleo de girassol

Tempo de salmouragem (min)	Pré-cozimento	*Cloretos (g/100g)	
		Molho de tomate	Óleo de girassol
2	Sim	0,17 ± 0,01 ^a	0,10 ± 0,02 ^a
2	Não	0,19 ± 0,01 ^{ab}	0,12 ± 0,01 ^b
5	Sim	0,21 ± 0,01 ^{bc}	0,13 ± 0,01 ^b
5	Não	0,24 ± 0,01 ^c	0,21 ± 0,01 ^c

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas ao nível de 95 % de confiança (p<0,05).

*Resultados (média ± desvio padrão)

Tabela 5. Avaliação microbiológica das conservas de anchoita em óleo de girassol e molho de tomate

Micro-organismos	Resultados microbiológicos
<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva (*UFC.g ⁻¹)	< 10 ³
<i>Clostridium</i> sulfito redutor (*UFC.g ⁻¹)	< 10 ³
<i>Salmonella</i> spp. (em 25g)	Ausência
Testes de esterilidade comercial	
Incubação a 55 ± 1 °C	Negativo
Incubação a 36 ± 1 °C	Negativo

*Unidade Formadora de Colônia

os produtos à base de carnes, pescado, ovos e similares cozidos devem apresentar uma população microbiana máxima para *Staphylococcus* coagulase positiva e *Clostridium* sulfito redutor equivalente a 10^3 UFC/g e ausência de *Salmonella* spp. Portanto, as conservas de pescado avaliadas se encontram de acordo com a legislação vigente associada à inocuidade deste alimento para consumo humano. Colemberg¹⁶, avaliando a qualidade da conserva de anchoita (*Engraulis anchoita*) em molho com tomate, detectou ausência de *Salmonella* spp, *Staphylococcus* coagulase positiva ($< 1 \times 10^3$ UFC/g) e *Clostridium* sulfito redutor ($< 1 \times 10^3$ UFC/g). Observou, portanto, uma conformidade com a legislação da Anvisa¹⁵, resultado semelhante ao obtido neste trabalho. As amostras submetidas ao teste de esterilidade comercial com a utilização de incubações a 36 ± 1 °C e a 55 ± 1 °C não apresentaram alterações por decorrência de um inadequado processamento oriundo de uma esterilização deficiente ou recravação não conforme.

CONCLUSÃO

Por meio dos resultados obtidos, é possível concluir que as conservas de anchoita apresentaram qualidade satisfatória, estando de acordo com a legislação vigente, sendo possível o processamento desse pescado em conserva. Para o estudo da viabilidade comercial dessas conservas, sugere-se a realização de futuros trabalhos com avaliações sensoriais.

REFERÊNCIAS

1. Food and Agriculture Organization of the United Nations – FAO. Topics Fact Sheets - Composition of fish 2005. Lahsen A. [acesso 2011 Fev 25]. Disponível em: [http://www.fao.org/fishery/topic/12318/en].
2. Madureira LSP, Castello JP, Prentice-Hernández C, Queiroz MI, Espírito Santo ML, Ruiz WA et al. Current and potential alternative food uses of the Argentine anchoita (*Engraulis anchoita*) in Argentina, Uruguay and Brazil. In: Hasan MR, Halwart M (eds). Fish as feed inputs for aquaculture: practices, sustainability and implications. FAO Fish Aquacult Tech Paper. n° 518. Rome: FAO. 2009. p.269-87.
3. Castello L, Castello JP. Anchovy stocks (*Engraulis anchoita*) and larval growth in the SW Atlantic. *Fish Res*.2003;59:409-21.
4. Schwingel PR, Castello JP. Programa para desenvolvimento da pescaria da anchoita (*Engraulis anchoita*) no sul do Brasil. Itajaí: Universidade do Vale do Itajaí, 2000.
5. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Animal (LANARA). Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes. II – Métodos Físico-Químicos. Brasília (DF): Laboratório Nacional de Referência Animal; 1981.
6. Instituto Adolfo Lutz (São Paulo - Brasil). Métodos físico-químicos para análise de alimentos: normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. 4ª ed. [1ª ed. digital]. São Paulo (SP): Instituto Adolfo Lutz; 2008. [acesso 2011 Jan 15]. Disponível em: [http://www.ial.sp.gov.br/index.php?option=com_remository&Itemid=7&func=select&orderby=1&Itemid=7].
7. Association of Official Analytical Chemists - AOAC. Official methods of analysis. 16 ed, v. 2, Arlington: AOAC; 1995.
8. Brasil. Ministério da Saúde. Instrução Normativa nº62, de 26 de agosto de 2003. Oficializa os métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. Diário [da] República Federativa do Brasil, BrasíliaDF, 18 de set. 2003. Seção 1, p.14.
9. American Public Health Association - APHA. Compendium of methods for biological examination of foods. 3a edition. Washington: American Public Health Association; 1992. 1219 p.
10. Rodrigues MI, Lemma AF. Planejamento de experimentos e otimização de processos. 2a ed. Campinas (SP): Casa do Espírito Amigo Fraternidade Fé e Amor; 2009.
11. Furlan VJM, Silva APR, Queiroz MI. Avaliação da eficiência de extração de compostos nitrogenados da polpa de anchoíta (*Engraulis anchoita*). *Ciênc Tecnol Alim*.2009;29(4):834-9.
12. Colembergue JP, Espírito Santo MLP, Gularte MA. Caracterização química e aceitabilidade da sardinha (*Sardinella Brasiliensis*) em conserva adicionada de molho com tomate. *Alim Nutr*.2011; 22(2):273-8.
13. Pizato S, Kraieski J, Sarmiento C, Prentice C. Avaliação da qualidade tecnológica apresentada por tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) enlatada. *Semina: Ciênc Agrar*.2012;33(2):667-74.
14. Pfeil EC, Santos NN, Medeiros SD, Oliveira GA. Avaliação da qualidade da conserva de sardinha sem pré-cozimento. *Rev Hig Alim*.1999;13(60):63-7.
15. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 10 jan. 2001.
16. Colemberg JP. Processamento e avaliação da qualidade da conserva de anchoita (*Engraulis anchoita*) em molho com tomate [dissertação de mestrado]. Rio Grande (RS): Universidade Federal do Rio Grande; 2011.

Avaliação da qualidade da água de poço

Assessment the quality of well-water

RIALA6/1542

Claudio Fernández ARAUJO¹, Janayna Roriz HIPÓLITO², Andrea Viviana WAICHMAN³

*Endereço para correspondência: ¹Setor de Produtos, Laboratório Central de Saúde Pública do Amazonas, Fundação de Vigilância em Saúde do Amazonas. Rua Emílio Moreira, 518, Praça 14, Manaus, AM, Brasil, CEP: 69020-040. Tel: (92) 8113-3347. E-mail: claudioaer@yahoo.com.br

²Departamento de Cito-histologia, Escola Superior de Ciências da Saúde, Universidade do Estado do Amazonas.

³Laboratório de Ecologia, Departamento de Biologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas.

Recebido: 14.09.2012 - Aceito para publicação: 24.02.2013

RESUMO

O poço é considerado uma importante fonte de suprimento de água para consumo humano por populações que não têm acesso à rede pública de abastecimento em Manaus. A elevada porosidade dos solos de uma região, associada à quantidade de chuvas, pode comprometer a qualidade da água de poço por contaminação, principalmente antropogênica. Com o intuito de verificar essa contaminação, foram avaliadas 962 amostras oriundas das seis zonas do Município de Manaus durante todo o ano de 2007 e de 2008, divididas nos períodos de chuva (inverno amazônico) e de seca (verão amazônico) da região, por meio de análises laboratoriais (físico-químicas e microbiológicas). Foram encontrados resultados fora dos parâmetros estabelecidos na Portaria nº 2914/2011 do MS em 20 % das amostras correspondentes ao período de seca e em 34 % das amostras referentes ao período de chuva. Esses resultados alertam para o risco da população ser acometida por diversas doenças de veiculação hídrica. Outrossim, este estudo mostra que é necessária a intervenção de órgãos competentes no sentido de minimizar a ocorrência de várias doenças de veiculação hídrica como parasitoses, hepatite infecciosa, febre tifoide, paratifoide, disenteria bacilar, cólera, dentre outras, na população de Manaus que faz uso de água de poço.

Palavras-chave. água, análises físico-químicas, análises microbiológicas.

ABSTRACT

The use of wells by populations for domestic water supply in Manaus is an important source of water for human consumption. The high porosity of the soils associated with the rain amount can cause effect on the quality of well-water due to the anthropogenic contamination. The present study assessed the well-water quality by analyzing 962 samples collected from six areas of the municipal district of Manaus. Physicochemical and microbiological analysis were performed in samples collected in 2007 and 2008 during the rainy and dry seasons. Of the total analyzed samples, 20 % corresponding to the dry season and 34 % to the rainy season showed water quality parameters noncompliant with the established standard (Decree nº 2914/2011). This study indicated the health risk to the population by consuming this well-water. Hence, it is necessary to implement the sanitation and water supply program for reducing the risk and minimizing the occurrence of waterborne diseases.

Keywords. water, physicochemical analysis, microbiological analysis.

INTRODUÇÃO

Em cidades onde as redes de abastecimento de água encanada são insuficientes para suprir toda a demanda, a busca de fontes alternativas, como a perfuração de poços, tem se tornado a principal solução^{1,2}, que apresenta vantagens práticas e econômicas quanto a sua captação, além de ser abundante e de qualidade, dispensando tratamentos químicos, exceto desinfecção³.

No estado do Amazonas, o uso de água de poço faz parte do senso comum em matéria de abastecimento de água para consumo humano, seja pela facilidade de obtenção ou pela dificuldade de receber regularmente água de abastecimento encanada, até mesmo em grandes indústrias e condomínios. A Companhia de Pesquisa de Recursos Minerais estima que existam cerca de sete mil poços clandestinos na cidade de Manaus⁴.

Em geral, os depósitos de água subterrânea são naturalmente protegidos, mas não estão isentos de agentes de poluição e contaminação⁵. Além das contaminações com esgoto lançado sem nenhum tratamento, existem outros fatores que podem gerar a contaminação da água. Já foram identificadas amostras de águas superficiais contaminadas por metais pesados em Manaus, com possibilidade de contaminação dos recursos hídricos subterrâneos^{6,7}.

Comumente, onde não há rede de abastecimento de água, normalmente não há coleta de esgoto, em geral, usam-se fossas ou sumidouros para o esgotamento doméstico, dessa forma, esses dejetos podem vir a contaminar a água subterrânea tornando-a imprópria para o consumo devido a sua proximidade aos poços, ou por infiltração no solo⁸.

O uso de água sem controle na qualidade coloca em risco a saúde do usuário, gerando problemas para a saúde pública devido à alta incidência de doenças de veiculação hídrica e outras ditas negligenciadas a ela relacionadas, gerando alto custo e a necessidade de um serviço especializado para o tratamento destas patologias⁹.

Em 1855, John Snow mostrou a relação entre água contaminada e o surto de cólera em Londres¹⁰. Para a população de Manaus, as características estéticas da água de poço são os fatores mais importantes para sua utilização, sendo que, na maioria dos casos, a aparência da água é o único fator considerado para seu uso, sem a realização de análises físico-químicas ou bacteriológicas

que de fato indiquem se ela é apropriada para o consumo humano^{11,12}. Portanto, a população consome água de poço sem a prévia verificação de sua qualidade e, desta forma, talvez esteja consumindo água com contaminantes imperceptíveis sem a realização de análises laboratoriais, o que possibilita a disseminação de doenças de veiculação hídrica e coloca em risco a saúde dos usuários.

A avaliação da qualidade da água por parâmetros físico-químicos, como por exemplo, nitratos associados à presença de matéria orgânica no lençol freático, principalmente originária de fossas sépticas, pode ser ferramenta útil para a verificação de risco ambiental e à saúde humana¹³. Também é importante a verificação de contaminação microbiana (presença ou ausência de bactérias do gênero coliformes), que é um indicativo direto de contaminação ambiental por dejetos de origem humana, principalmente esgotos¹⁴.

Assim, este trabalho objetivou identificar e quantificar alguns destes eventuais contaminantes das águas subterrâneas com marcadores físico-químicos e microbiológicos que sinalizem para a tomada de medidas ambientais e sanitárias, com o intuito de minimizar e mesmo evitar efeitos nocivos sobre a saúde da população.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizado um estudo descritivo e analítico de avaliação da qualidade da água de poço no município de Manaus. Todas as amostras encaminhadas ao setor de Produtos do Laboratório Central de Saúde Pública do Amazonas (LACEN-AM) para análise nos anos de 2007 e 2008 foram analisadas, totalizando 962 amostras.

As amostras foram coletadas conforme preconizado no Guia de Coleta de Amostras de Água do LACEN-AM em sacos plásticos estéreis de 1000 mL para o ensaio físico-químico e 200 mL para o ensaio microbiológico, acondicionadas em caixas isotérmicas com gelo e transportadas no mesmo dia para o Setor de Produtos do LACEN-AM.

Foram realizadas análises microbiológicas de coliformes totais e *Escherichia coli*, conforme descrito em Official Methods of Analysis of AOAC International¹⁵. Os parâmetros físico-químicos da água pesquisados foram alcalinidade, cloreto, dureza, nitrato, pH e turbidez, descritos no Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater¹⁶ e as análises de amônia e cor, descritas nas Normas Analíticas do

Instituto Adolfo Lutz¹⁷. Estes parâmetros, escolhidos por serem indicadores de alterações na qualidade da água e de contaminação, estão elencados nas análises previstas na Portaria nº 2914/2011¹⁸, e a presença de alguns deles acima de valores máximos estabelecidos podem representar risco para a saúde humana.

Os resultados obtidos estão apresentados como médias ± desvio padrão e foram analisados pelo programa Microsoft Excell[®]. A utilização dos resultados foi autorizada pela Fundação de Vigilância em Saúde do Amazonas (FVS-AM).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Primeiramente, as amostras foram agrupadas de acordo com os períodos de chuva e seca da região amazônica, sendo divididas em dois grandes grupos. Verificou-se que, nos anos de 2007 e 2008, os meses de janeiro, fevereiro, março, abril, maio, novembro e dezembro tiveram o maior índice pluviométrico, sendo considerado o período chuvoso ou inverno amazônico, e os meses de junho, julho, agosto, setembro e outubro, que foram os meses com menor índice pluviométrico e com temperaturas mais altas, sendo considerado como período seco ou verão amazônico¹⁹.

Do total de 962 amostras de água de poço do município de Manaus dos anos de 2007 e 2008, foram analisadas 535 nos meses chuvosos e 427 no período considerado seco. A maior parte das amostras analisadas (55 %) foi oriunda de escolas, o que torna preocupante o fato da água estar fora dos padrões de potabilidade para uso por crianças que já têm o sistema imune fragilizado por sua baixa idade, favorecendo a ocorrência de doenças de veiculação hídrica (Tabela 1).

Tabela 1. Procedência das amostras de poço coletadas no município de Manaus nos anos de 2007 e 2008

Procedência	Período de seca		Período chuvoso	
	n	%	n	%
Escolas	237	55,5	288	53,8
Unidades de Saúde	60	14,1	51	9,5
Residências	54	12,6	72	13,5
Outros	76	17,8	124	23,2
Total	427	100	535	100

No verão, 20 % das amostras apresentaram alguma não conformidade e, no inverno, 34 % das amostras foram reprovadas em alguma análise laboratorial (estavam acima dos valores máximos

permitidos estabelecidos pela Portaria nº 2914/2011), foi verificada diferença significativa entre os períodos de seca e chuvoso conforme apresentado na Tabela 2. Estes resultados estão de acordo com outros autores^{1,20} que verificaram que a qualidade da água de poço é afetada pelo ciclo hidrológico.

Tabela 2. Resultado das análises físico-químicas de água de poço no período de seca (jun, jul, ago, set, out) e no período chuvoso (jan, fev, mar, abr, mai, nov, dez) em Manaus, nos anos de 2007 e 2008

Resultado	Período de seca		Período chuvoso		p
	n	%	n	%	
Aprovado	342	80	352	66	<0,001*
Reprovado	85	20	183	34	<0,001*

*Teste Mann-Whitney

Assim, a qualidade da água de poço é afetada pela chuva e é agravada pela alta porosidade do solo (Arenito Manaus) e a grande quantidade de fossas domésticas instaladas^{21,22}. Em maior ou menor grau, todos os igarapés urbanos de Manaus estão poluídos, seja por lançamento de esgotos industriais, por esgotos domésticos, por lançamentos de águas servidas, ou pela falta de coleta de lixo. Na maioria dos casos, a poluição ocorre pela junção das três causas⁴.

Na Tabela 3 estão apresentados os resultados das amostras reprovadas nas análises microbiológicas do município de Manaus, separadas por período chuvoso e de seca. No período chuvoso foi observado um aumento significativo no número de amostras reprovadas, sendo 50 % maior que o observado na época de seca. Foram considerados como critérios para reprovação, amostras com presença de coliformes totais e *Escherichia coli*.

Tabela 3. Resultado das reprovações por análise microbiológica

Setor	Período de seca		Período chuvoso	
	n	%	n	%
Microbiologia	37	8,7	91	17,0

Outros estudos mostraram resultados similares, como os de Santana e Zeferino¹² e o de Costa¹¹, que encontraram coliformes totais acima dos valores admitidos pela Portaria do Ministério da Saúde¹⁸ em todas as áreas de Manaus amostradas. Neste último estudo, foi constatado ainda que 75 % dos poços apresentaram água imprópria para o consumo devido à presença de coliformes totais e coliformes termotolerantes acima do permitido nos dois períodos.

Na Tabela 4 são apresentados os resultados das análises físico-químicas nos períodos de seca e chuvoso em Manaus.

Tabela 4. Resultados das análises físico-químicas das águas de poço do município de Manaus nos anos 2007 e 2008, separados por período de seca e chuvoso

Análises físico-químicas	Período de seca	Período chuvoso
Alcalinidade (mg/L)	4,8 ± 6,95	3,80 ± 4,87
Amônia (mg/L)	0,45 ± 1,18	0,33 ± 0,93
Cloretos (mg/L)	12,95 ± 15,18	6,81 ± 8,74
Cor (uH)	3,41 ± 26,66	4,84 ± 24,53
Dureza (mg/L)	13,79 ± 12,73	12,95 ± 12,86
Nitrato (mg/L)	9,13 ± 24,74	10,20 ± 24,55
Turbidez (NTU)	0,52 ± 1,18	0,67 ± 1,77

uH=unidade de Hazen (mg Pt-Co/L); NTU=unidade nefelométrica de turbidez

Foram verificados valores de alcalinidade de 4,8 mg/L no período seco e de 4,0 mg/L no período chuvoso. Apesar de não estar entre os parâmetros elencados pela Portaria nº 2914/2011 do Ministério da Saúde¹⁸, a análise da alcalinidade toma importância por ter incidência sobre o caráter corrosivo ou incrustante e, em altas concentrações, pode afetar o sabor, que é considerado um dos principais fatores de rejeição por parte dos usuários.

Neste estudo, encontraram-se valores de amônia semelhantes aos estudos de Costa¹¹ e de Silva²⁰, dentro do exigido pela Portaria do Ministério da Saúde¹⁸, que é de até 1,5 mg/L. A amônia é formada no processo de decomposição de matéria orgânica (ureia-amônia), e tem importância por ser o primeiro produto da decomposição de substâncias nitrogenadas por isso, a presença desta substância indica uma poluição orgânica recente. A amônia, assim como o nitrito, costuma estar ausente, pois são rapidamente convertidos a nitrato pelas bactérias.

O nitrato está presente em águas superficiais em quantidades pequenas, e pode atingir níveis elevados em águas subterrâneas. As águas de abastecimento contendo quantidade excessiva de nitrato podem causar a metemoglobinemia (cianose) e câncer em crianças²³, quando esta substância está presente na água em concentrações superiores a 10 mg/L, que é o valor limite estabelecido pela Portaria nº 2914/2011 do Ministério da Saúde¹⁸.

Foram encontrados valores médios de nitrato de 9,1 mg/L e 10,2 mg/L no período de seca e no período

chuvoso, respectivamente. Entretanto, estes valores foram menores aos encontrados por Carvalho²⁴ na zona leste de Manaus (25,45 mg/L) e por Rocha e Horbe⁷, que foi de 17,8 mg/L, na área do lixão no bairro Novo Israel (Zona Norte).

Nas águas subterrâneas, os nitratos ocorrem em teores geralmente abaixo de 5 mg/L. Altas concentrações de nitrato na água estão relacionadas à falta de sistema de esgotamento sanitário, sendo comum também em outras regiões do país. Valores de nitrato acima dos limites exigidos na legislação também foram encontrados em 30 % das amostras do estudo de Freitas et al⁸ em água de poço do Rio de Janeiro e por Alaburda e Nishihara²⁵, na região metropolitana de São Paulo, que encontraram 15 % das amostras fora das especificações de alguma forma de nitrogênio.

Scorsafava et al²³, avaliando águas de poço e de minas, também encontraram valores acima do permitido na legislação e sinalizaram possível indício de contaminação ambiental e aumento do risco de doenças de veiculação hídrica. Silva et al²² atribuíram os achados a forte dinâmica de fluxo provocada pela alta pluviosidade local, que funciona como um importante fator de dispersão hidrodinâmica dos poluentes pelo fluxo subterrâneo, o que promove a diluição das concentrações iônicas no aquífero.

Concentrações altas de cloretos podem restringir o uso da água em razão do sabor que eles conferem e pelo efeito laxativo que podem provocar. Teores anômalos são indicadores de contaminação por água do mar e por aterros sanitários. No presente estudo, encontramos valores bem abaixo do exigido na Portaria nº 2914/2011 do Ministério da Saúde¹⁸ (que é de 250 mg/L), não sendo um fator limitante para o uso das águas analisadas.

Os valores de cor foram de 3,4 uH e 4,8 uH, respectivamente, no período de seca e no período chuvoso, valores bem abaixo do exigido pela legislação, que é de 15 uH. Valores dentro dos exigidos na Portaria do Ministério da Saúde¹⁸ também foram encontrados por Costa¹¹, que determinou cor aparente entre setembro a novembro de 2003, de 2,8 uH. A cor é consequência de substâncias dissolvidas como, por exemplo, substâncias húmicas, taninos, pela presença de metais como o ferro e o manganês e resíduos industriais fortemente coloridos.

A dureza está ligada a outros parâmetros, como o pH e a alcalinidade e, dependendo destes, pode formar depósitos nos dutos e até obstruí-los completamente. As análises realizadas indicaram valores médios próximos de 13 mg/L muito abaixo do valor máximo permitido pela

Portaria nº 2914/2011 do Ministério da Saúde¹⁸, que é de 500 mg/L e semelhante aos observados em outros estudos na cidade de Manaus^{11,20,24}. O principal inconveniente de águas duras é porque o sabão não limpa eficientemente, aumentando seu consumo, e deixando uma película insolúvel sobre a pele, pias, banheiras e azulejos do banheiro.

A turbidez da água é devida à presença de materiais sólidos em suspensão, que reduzem a sua transparência. É um indicador sanitário e padrão de aceitação da água de consumo humano. As águas subterrâneas normalmente não apresentam problemas devido ao excesso de turbidez. Em alguns casos, águas ricas em ferro podem apresentar uma elevação de sua turbidez quando entram em contato com o oxigênio do ar. Neste estudo foram encontrados valores médios de 0,52 NTU na seca e 0,67 NTU no período das chuvas, valores estes menores aos reportados por Costa¹¹. Ambos os estudos mostraram valores dentro do exigido na Portaria do Ministério da Saúde¹⁸.

O pH (potencial hidrogeniônico), ou mais popularmente descrito como grau de acidez, é um parâmetro que afeta a qualidade da água. Os principais fatores que determinam o pH da água são o gás carbônico dissolvido e a alcalinidade. Neste estudo, foram encontrados valores de pH de 5,4 na seca e 5,6 no período chuvoso. Em outros estudos realizados na região também foram verificados valores de pH ácido: Santana e Zeferino¹² encontraram valores entre 4,18 e 4,72; Silva²⁰ encontrou valores de pH entre 4,1 e 5,4 com média de 4,8 e Costa¹¹ encontrou valores de 4,7 na época da chuva (jan a mar) e 4,4 no período de seca. Em todos os estudos os valores estiveram fora dos limites exigidos na Portaria do Ministério da Saúde¹⁸, que estabelece valores de pH acima de 6.

O pH das águas subterrâneas varia geralmente entre 5,5 e 8,5. A corrosão pode adicionar constituintes para a água, tais como: ferro, cobre, chumbo, zinco e cádmio. O controle de pH da água bruta é fundamental em processos importantes como a desinfecção com cloro e está associado a fenômenos, tanto de corrosão como de incrustações da rede de distribuição. Os valores de pH encontrados em todos os estudos na região amazônica apontam para a necessidade de adaptação da legislação às características da região, uma vez que, até mesmo a água de abastecimento no município de Manaus, não consegue atingir o valor exigido, devido ao caráter ácido da água.

Freitas e Freitas¹⁰ descreveram a necessidade de divulgação dos achados de estudos para a adequada

vigilância da qualidade da água. O grande número de amostras coletadas ao longo de dois anos para a realização neste trabalho possibilitou verificar as variações nos períodos de seca e chuvas da região Amazônica.

De acordo com os achados deste estudo, boa parte das amostras analisadas apontam que as águas subterrâneas utilizadas pela população de Manaus estão impróprias para o consumo, de acordo com a legislação vigente, sendo necessária uma intervenção de órgãos competentes para minimizar a ocorrência de doenças relacionadas à água.

REFERÊNCIAS

1. Castro AM SM, Câmara VM. Avaliação do programa de vigilância da qualidade da água para consumo humano em Salvador, Estado da Bahia. *Rev Baiana Saúde Publica*.2004;28:212-6.
2. Borges JT. Saneamento e suas interfaces com os igarapés de Manaus. *T&C Amazôn*.2006; IV:9.
3. Azevedo RP. Uso de água subterrânea em sistema de abastecimento público de comunidades na várzea da Amazônia central. *Acta Amaz*.2006;36:313-20.
4. Companhia de Pesquisa de Recursos Minerais - CPMR. Poços cadastrados. 2010. [Acesso 2010 Jul 08]. Disponível em: [http://siagasweb.cprm.gov.br/layout/uf_pocos.php].
5. Associação Brasileira de Educação Agrícola Superior – ABEAS. Água subterrânea: conceitos, reservas usos e mitos. Brasília DF; 1999.
6. Santana GP, Barroncas PSR. Estudo de metais pesados (Co, Cu, Fe, Cr, Ni, Mn, Pb e Zn) na bacia do Tarumã-Açu Manaus (AM). *Acta Amaz*.2007;37:111-8.
7. Rocha LCR, Horbe AMC. Contaminação provocada por um depósito de lixo no aquífero Alter do Chão em Manaus-AM. *Acta Amaz*.2006;36:307-12.
8. Freitas MB, Brilhante OM, Almeida LM. Importância da análise de água para a saúde pública em duas regiões do estado do Rio de Janeiro: enfoque para coliformes fecais, nitrato e alumínio. *Cad Saúde Pública*.2001;17:651-60.
9. Giatti LL. Reflexões sobre água de abastecimento e saúde pública: um estudo de caso na Amazônia Brasileira. *Saúde Soc*.2007;16:134-44.
10. Freitas MB, Freitas CM. A vigilância da qualidade da água para consumo humano – desafios e perspectivas para o Sistema Único de Saúde. *Ciênc Saúde Colet*.2005;10:993-1004.
11. Costa AMR. Uso da água subterrânea na cidade de Manaus [dissertação de mestrado]. Manaus (AM): Universidade Federal do Amazonas; 2005.
12. Santana GP, Zeferino VOL. Avaliação da qualidade das águas subterrâneas usadas em escolas da rede estadual de ensino de Manaus. *Cam Geogr*.2008; 9:24-36.
13. Soto FRM, Fonseca YSK, Risseto MR, Azevedo SS, Arini MLB, Ribas MA, et al. Monitoramento da qualidade da água de poços rasos de escolas públicas da zona rural do município

- de Ibiuna/SP: parâmetros microbiológicos, físico-químicos e fatores de risco ambiental. *Rev Inst Adolfo Lutz*.2006;65:106-11.
14. Marcondes DW, Viana PC, Valente PA, Salzer MA, Luz SM. Avaliação da qualidade físico-química e microbiológica das águas de poços em unidades de saúde pública na cidade de Manaus-AM. 2005. *In: 14º Encontro Nacional de Analistas de Alimentos*.
 15. Association of Analytical Communitie AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC International. 17th ed. Gaithersburg, Maryland, EUA: 2000.
 16. American Public Health Association. Standart methods for the examination of water and wastewater. 20th ed. Maryland, EUA: 1998.
 17. Instituto Adolfo Lutz (São Paulo – Brasil). Métodos físico-químicos para análise de alimentos: normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. 4^a ed. Brasília (DF) Anvisa; 2005.
 18. Ministério da Saúde. Portaria nº 2914, de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 14 dez. 2011. Seção 1. p.39-46.
 19. Allmetsat. Climatologia de Manaus. [internet]. [Acesso 2010 mar. 05]. Disponível em: [<http://pt.allmetsat.com/clima/america-sul.php?code=82331>].
 20. Silva ML. Hidroquímica elementar dos isótopos de Urânio nos aquíferos de Manaus/AM [dissertação de mestrado]. Rio Claro (SP): Universidade Estadual Paulista; 1999.
 21. Souza LSB, Verma OP. Mapeamento de aquíferos da cidade de Manaus (AM) – utilizando perfilagem geofísica de poço e sondagem elétrica vertical. *Rev Bras Geofis*.2006;24:443.
 22. Silva AC, Dourado JC, Krusche AV, Gomes BM. Impacto físico-químico da deposição de esgotos em fossas sobre as águas de aquífero freático em Ji-Paraná-RO. *Rev Est Amb*.2009;11:101-12.
 23. Scorsafava MA, Souza A, Stofer M, Nunes CA, Milanez TV. Avaliação físico-química da qualidade de água de poços e minas destinada ao consumo humano. *Rev Inst Adolfo Lutz*.2010;69(2):229-32.
 24. Carvalho FP. Possibilidades de contaminação das águas subterrâneas na zona leste da cidade de Manaus [dissertação de mestrado]. Manaus (AM): Universidade Federal do Amazonas; 2003.
 25. Alaburda J, Nishihara L. Presença de compostos de nitrogênio em águas de poços. *Rev Saúde Pública*.1998;32(2):160-5.

Perfumes e colônias no comércio ilegal

Perfumes and colognes in the illegal trade

RIALA6/1543

Lígia Luriko MIYAMARU^{1*}, Maria Cristina SANTA BÁRBARA¹, Tatiana Caldas PEREIRA², Adriana Aparecida Buzzo ALMODOVAR², Viviane Emi NAKANO³, Tamiko Ichikawa IKEDA⁴, Christiane Guedes LAMBERT⁴, Vinicius Dalben RODRIGUES⁵, Adriana BUGNO⁶

*Endereço para correspondência: ¹Núcleo de Ensaios Físicos e Químicos em Cosméticos e Saneantes, Centro de Medicamentos, Cosméticos e Saneantes, Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr. Arnaldo, 355, CEP 01246-000, São Paulo, SP, Brasil.

E-mail: lmiyamaru@ial.sp.gov.br.

²Núcleo de Ensaios Biológicos e de Segurança, Centro de Medicamentos, Cosméticos e Saneantes, Instituto Adolfo Lutz

³Núcleo de Contaminantes Orgânicos, Centro de Contaminantes, Instituto Adolfo Lutz

⁴Núcleo de Cultura de Células, Centro de Procedimentos Interdisciplinares, Instituto Adolfo Lutz

⁵Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo

⁶Centro de Medicamentos, Cosméticos e Saneantes, Instituto Adolfo Lutz

Recebido: 21.11.2012 - Aceito para publicação: 05.02.2013

RESUMO

Perfumes e colônias são elaborados a partir de uma criteriosa seleção de matérias-primas que, combinadas, conferem características únicas e de alto valor agregado ao produto. Em virtude da enorme lucratividade que o setor da indústria cosmética proporciona, a comercialização de produtos falsificados cresce continuamente. Este estudo analisou a autenticidade e a segurança de perfumes e colônias de marcas nacionais encontrados no comércio clandestino de São Paulo, avaliando-se os parâmetros microbiológico, citotóxico, perfil cromatográfico e de autenticidade. Houve divergências entre as características das amostras analisadas e dos padrões de referência, as quais indicam que estes produtos não eram procedentes das empresas detentoras das marcas. Este dado serve de alerta para intensificar a fiscalização e adoção de medidas contra a prática da falsificação, como as campanhas educativas, para esclarecer os riscos que estes produtos podem causar à saúde e à segurança dos consumidores.

Palavras-chave. autenticidade, falsificação, perfumes, colônias, fragrância.

ABSTRACT

Perfumes and colognes are produced with a careful selection of raw materials, which are combined to provide a unique characteristic and of high value-added product. Due to the huge profits provided to the cosmetic industry, the sale of counterfeit goods has been growing. This study aimed at assessing the authenticity and safety of perfumes and colognes of national brands marketed in the clandestine trade of São Paulo, by evaluating the following parameters microbiological, cytotoxicity, chromatographic profile and authenticity. Characteristics differences between the samples and the reference standards were found, indicating that they were not manufactured by the industry companies which hold the perfume brand. These findings serve as a warning to intensify the surveillance and to follow the measures against the practice of forgery, as by means of educational campaigns, for elucidating the risks that these products can cause to the consumers health and safety.

Keywords. authenticity, forgery, perfumes, colognes, fragrance.

INTRODUÇÃO

A manufatura de perfumes é uma arte complexa, que requer seleção e combinação de fragrâncias naturais e sintéticas. Um perfume pode conter centenas de ingredientes, combinados harmoniosamente por especialistas capacitados, que criam produtos de marca registrada com odor e propriedades únicas, de alto valor agregado. Dentre mais de 2000 ingredientes de fragrâncias, os perfumes são formulados misturando-se quantidades adequadas de óleos essenciais, agentes fixadores, preservantes, diluentes e outros¹⁻⁵.

As substâncias aromáticas que compõem as fragrâncias, por suas diversas origens e características químicas particulares, têm valores de pressão de vapor próprios, o que garante índices de volatilidade variáveis. Combinando esses ingredientes com estas características, o perfumista consegue preparar uma fragrância que, ao evaporar, arrasta notas diferentes a cada instante. Deste modo, a estrutura da fragrância pode ser dividida em três fases, de acordo com a sua volatilidade: a) notas de saída, também denominadas topo, superior ou cabeça do perfume: são as primeiras notas que podem ser percebidas ao abrir um frasco de perfume ou ao aplicá-lo sobre a pele; b) notas de corpo ou de meio ou coração: correspondem ao núcleo da fragrância; c) notas de fundo ou base: permanecem sobre a pele após várias horas de sua aplicação⁵⁻¹¹.

O preço dos produtos de perfumaria apresenta diferenças, dependendo da sua classificação como perfumes, colônias ou loções, as quais refletem na composição da mistura: quanto maior a porcentagem das essências nas fragrâncias, maior o preço do produto⁹.

Segundo dados da Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos², as fragrâncias representam o segundo lugar em vendas no país, com mais de 400 marcas comercializadas. É um mercado promissor que coloca o Brasil entre os países que mais produzem, vendem e consomem cosméticos no mundo, ficando atrás apenas dos Estados Unidos e Japão. Em vista disso, os perfumes mais apreciados se tornam alvo potencial para falsificações. Essa prática, além de levar à diminuição de custos pela evasão de impostos, rendas e empregos, gera riscos à saúde e à sociedade como um todo, devido à utilização de matérias-primas de origem duvidosa, expondo os consumidores a misturas tóxicas^{1-3, 5, 11}.

Nas empresas produtoras, perfumes e colônias têm sua conservação e qualidade pré-avaliadas por testes de

estabilidade, fotoquímico e de segurança. Isto não ocorre num produto falsificado, cujas fragrâncias utilizadas são de procedência desconhecida, podendo apresentar concentração da essência inferior à dos perfumes originais. Os falsificadores de perfumes, frequentemente, formulam seus produtos com álcool combustível, às vezes contendo metanol, extremamente tóxico, em substituição ao álcool desnaturado usado por fabricantes idôneos. Há trabalhos na literatura que relatam os riscos à saúde causados pelo uso de produtos falsificados, tais como: alergia, neurotoxicidade e dermatites de contato^{2, 11}.

O objetivo deste estudo foi verificar a autenticidade e segurança de perfumes e colônias encontrados no comércio clandestino de São Paulo, avaliando os parâmetros: microbiológico, citotóxico, perfil cromatográfico e de autenticidade.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram avaliadas 30 amostras de perfumes e colônias de marcas nacionais apreendidas e encaminhadas pelo Instituto de Criminalística de São Paulo. Para a realização dos ensaios de autenticidade, citotoxicidade *in vitro* e perfil cromatográfico, foram utilizados os respectivos padrões de referência das empresas fabricantes dos produtos originais.

Análise microbiológica

Foram avaliados os parâmetros contidos na Resolução nº 481, de 23 de setembro de 1999¹²: enumeração de micro-organismos aeróbios mesófilos, ausência de coliformes totais e fecais, ausência de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, utilizando metodologias analíticas preconizadas pela Farmacopeia Brasileira¹³.

Preparação das amostras

Alíquotas de 10 mL foram adicionadas a frascos contendo 90 mL de Caldo Lethen (diluição inicial). Após a homogeneização em agitador tipo vortex por 2 minutos, foram executadas diluições decimais seriadas utilizando o mesmo meio de cultura.

Enumeração de micro-organismos mesófilos totais aeróbios

Foi utilizado o método de contagem em placas por meio de semeadura em profundidade "Pour Plate", de acordo com a Farmacopeia Brasileira¹³, usando o ágar

caseína de soja para a enumeração de bactérias mesófilas aeróbias e o ágar sabouraud dextrose para a enumeração de fungos. As placas preparadas foram incubadas em estufa bacteriológica a $32,5 \pm 2,5$ °C por cinco dias para bactérias e a $22,5 \pm 2,5$ °C por sete dias para fungos.

Pesquisa de coliformes totais e fecais

Para a pesquisa de coliformes totais e fecais foi utilizado método preconizado pela Farmacopeia Brasileira, teste de ausência de bactérias gram-negativas biletolerantes. Alíquotas contendo 1 mL dos produtos foram transferidas a frasco contendo caldo de enriquecimento de enterobactérias, segundo Mossel, e incubados em estufa bacteriológica a $32,5 \pm 2,5$ °C durante 24 a 48 horas¹³.

Foram realizadas subculturas a partir dos frascos positivos do caldo de enriquecimento de enterobactérias em placas contendo ágar violeta vermelho neutro bile glicose. Colônias com características morfológicas de bactérias gram-negativas biletolerantes foram isoladas para a realização de provas bioquímicas para identificação, quando necessário.

Pesquisa de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*

A pesquisa dos micro-organismos patogênicos *S. aureus* e *P. aeruginosa* foi realizada a partir da diluição inicial das amostras após incubação em estufa bacteriológica a $32,5 \pm 2,5$ °C por 48 horas.

Para o isolamento dos micro-organismos foram realizadas subculturas em meios de cultura seletivos em placa: ágar Vogel Johnson (VJ) e ágar manitol salgado para a pesquisa de *S. aureus* e ágar cetrimide para a pesquisa de *P. aeruginosa*. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a $32,5 \pm 2,5$ °C por 48 e 72 horas, respectivamente. Colônias com características morfológicas para cada micro-organismo foram isoladas para a realização de provas bioquímicas para identificação, quando necessário.

Perfil cromatográfico

Perfis cromatográficos das amostras e padrões sem diluição foram obtidos em duplicatas por cromatografia em fase gasosa com detector de ionização de chama (CG/FID). Condições de análise: cromatógrafo a gás HP6890 com detector FID; coluna capilar de polietileno glicol (DB-Wax), dimensões 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm; temperatura inicial do

forno: 60 °C; rampa de aquecimento: 60 °C (1 min), 10 °C/min até 240 °C (7 min); temperatura do injetor: 250 °C; volume de injeção: 1 µL; split 1:100; temperatura do detector: 250 °C; fluxos dos gases: nitrogênio = 30 mL/min, hidrogênio = 40 mL/min, ar sintético = 450 mL/min; aquisição de dados: software HPChem.

Avaliação da citotoxicidade in vitro

Este ensaio foi realizado para verificar a presença de possíveis efeitos tóxicos das amostras e padrões de referência, comparando os seus índices. Usou-se o Método de difusão em ágar com a linhagem celular NCTC CLONE 929 (ATCC-CCL1) de tecido conjuntivo de camundongo¹⁴.

As amostras foram embebidas em disco de papel de filtro atóxico, colocado sobre o meio semi-sólido. Após 24 horas, as leituras das placas foram feitas para verificar se houve a formação do halo claro ao redor do material correspondente às células mortas, que não incorporaram o corante vital vermelho neutro¹⁵. Quando presente, os halos resultantes de efeito citotóxico foram cuidadosamente medidos, usando paquímetro calibrado, e classificados em índices de zona (IZ), de acordo com a Farmacopeia Americana¹⁶.

Todas as amostras foram avaliadas em triplicata e, como controles negativos e positivos, utilizaram-se, respectivamente, disco de papel de filtro atóxico e fragmentos de látex.

Teste de autenticidade

O teste de autenticidade foi realizado comparando as amostras com os padrões de referência fornecidos pelas empresas fabricantes detentoras das marcas originais. Foram avaliados os parâmetros de odor e cor. Em relação ao odor, as composições aromáticas foram avaliadas por meio de “fitas olfativas” impregnadas com jatos de fragrâncias da amostra e padrão na presença dos responsáveis técnicos da empresa fabricante. Avaliou-se a cor por observação visual.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A falsificação é uma prática ilegal que tem crescido nas últimas décadas, acarretando prejuízos para a indústria e a sociedade, sendo o consumidor um dos principais responsáveis para que esse mercado continue a existir. O baixo custo de produtos falsificados, quando comparados aos produtos originais, é um grande

atrativo, contribuindo para a existência desse mercado paralelo.

A análise da composição química de aromas e amostras relacionadas é uma tarefa complexa e trabalhosa, devido ao grande número de componentes, semelhança de propriedades físico-químicas e existência de substâncias em altas concentrações associadas a várias outras em níveis baixos, que quase sempre são as responsáveis pela qualidade do odor ou cor. Considerando que as composições das fragrâncias não são patenteadas, pois são um segredo comercial, os órgãos regulamentadores não podem obrigar os fabricantes a identificarem os ingredientes nos seus produtos. Dessa forma, é necessário o emprego de técnicas analíticas viáveis e confiáveis para a determinação de contaminações de produtos específicos, por exemplo, água, álcool, solventes orgânicos, entre outros reagentes, ou por substâncias de importância farmacológica ou técnica, tais como mentol, limoneno, citral e outros^{3-5,8}.

A análise de autenticidade revelou que as amostras de perfumes e colônias, quando comparadas com as amostras de referência, apresentaram diferenças quanto aos parâmetros de odor e cor. O odor é basicamente o resultado de uma interação entre um estímulo químico e o sistema receptor olfativo. Dentre os atributos avaliados, foi possível discriminar intensidades diferentes das fragrâncias, sendo que a equipe de avaliação estava treinada pelas empresas detentoras das marcas, utilizando ferramentas e técnicas adequadas para a obtenção de resultados confiáveis. Ressalta-se que condições de armazenamento destes produtos, originais ou não, como quando expostos a condições drásticas de temperatura e luz, podem interferir em suas características de odor e cor. Entretanto, em relação ao parâmetro cor, a avaliação destas amostras mostrou diferenças significativas quando comparadas às amostras de referência por apresentarem cor totalmente divergente do padrão original. Além disso, as embalagens primárias reconhecidas como de procedência do fabricante apresentavam os lacres violados, demonstrando provável reutilização das embalagens.

A avaliação microbiológica evidenciou que as amostras analisadas estavam em conformidade com a legislação vigente¹²: enumeração microbiana inferior a 10 UFC/mL, ausência de coliformes totais e fecais e ausência de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

O controle microbiológico de cosméticos tem como objetivo comprovar a ausência de micro-organismos

patogênicos, bem como avaliar a carga microbiana presente, que se for elevada, pode comprometer a estabilidade do produto, causando alterações de suas características organolépticas, resultando em produtos potencialmente perigosos para o consumo.

As matérias-primas utilizadas na produção de produtos falsificados não passam por controle de qualidade e são obtidas de fornecedores não qualificados. Além disso, o processo de produção não cumpre com os requisitos de Boas Práticas de Fabricação, o que pode causar contaminação microbiana do produto acabado. No caso dos perfumes e colônias, a conformidade dos ensaios microbiológicos pode ser explicada pela composição desta categoria de produtos, pois o álcool possui potencial antimicrobiano e citotóxico e as matérias-primas de origem sintética em sua formulação não favorecem o crescimento e desenvolvimento microbiano.

As análises por CG/FID das 30 amostras encaminhadas pelo Instituto de Criminalística não indicaram correspondência com os respectivos padrões de referência das empresas fabricantes das amostras autênticas. As amostras apresentaram, quase na sua totalidade, o mesmo perfil cromatográfico, como mostrado na Figura 1, com picos majoritários na região dos tempos de retenção 11-13,2 minutos, sugerindo serem originárias da mesma mistura de constituintes para formar a base do produto. Comparando-se os cromatogramas obtidos, verificou-se que, na maioria das vezes, esses constituintes majoritários estão até presentes nos perfis cromatográficos dos padrões, mas em proporções diferentes, como exemplificados na Figura 2, cujo perfil cromatográfico corresponde ao padrão da amostra autêntica 26.

A cromatografia a gás é a técnica mais largamente utilizada para análise de perfumes, devido ao fato de ser uma técnica de alta eficiência, que permite a separação de compostos de propriedades físicas semelhantes, identificando a pureza e fornecendo o perfil da composição^{1,17}.

No teste de citotoxicidade *in vitro*, todas as amostras causaram morte celular. Este fato já era esperado para esta categoria de produto, devido a sua composição possuir ingredientes agressivos para células cultivadas *in vitro*. As amostras de perfumes e colônias apresentaram IZ 2 menor que os obtidos nos padrões de referência. Essa diferença pode ser explicada pelo fato das amostras supostamente falsificadas de perfumes e

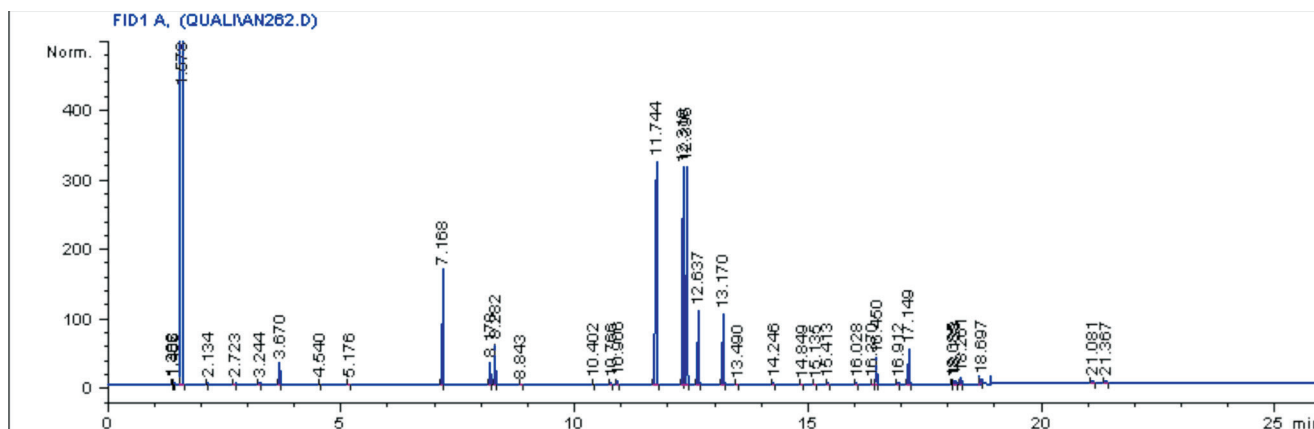


Figura 1. Perfil cromatográfico da amostra 26

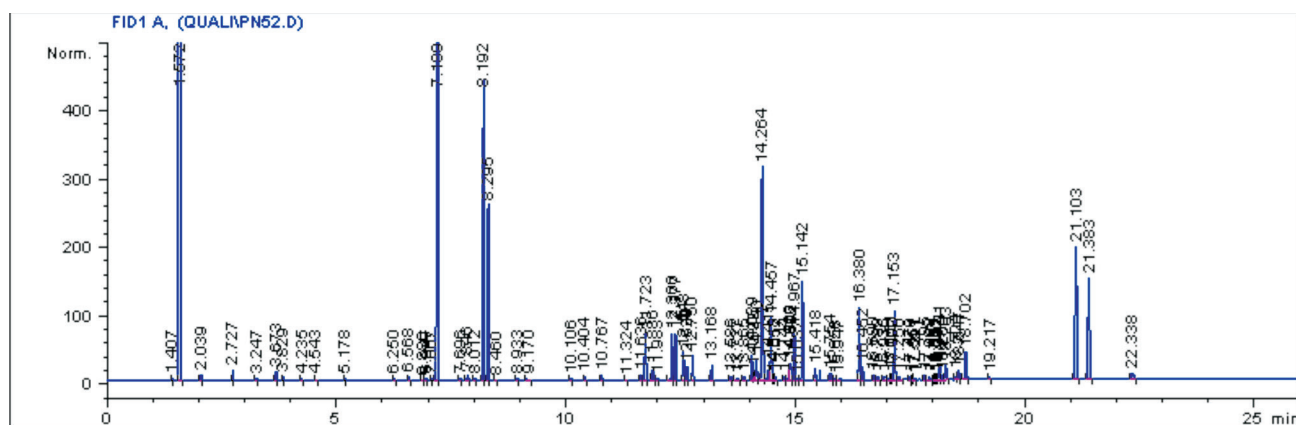


Figura 2. Perfil cromatográfico do padrão de referência da amostra 26

colônias estarem mais diluídas, quando comparadas com os respectivos padrões de referência, cuja composição apresenta ingredientes com níveis altos de concentração.

Os resultados obtidos comprovam que os produtos analisados não eram os mesmos de fabricação da empresa detentora da marca, o que evidencia uma problemática quanto ao comércio clandestino. Essa prática ilegal é prejudicial tanto para as empresas de perfumes quanto para os consumidores, que enfrentam o risco de serem expostos a substâncias nocivas. Os produtos falsificados não passam por inspeção e podem ser elaborados com matérias-primas de qualidade e procedência duvidosa, passíveis, portanto, de provocar inúmeros malefícios, como alergia, irritação cutânea, avermelhamento e descamação, coceira, inchaço e até mesmo manchas na pele^{2,11}.

A Associação dos Distribuidores e Importadores de Perfumes, Cosméticos e Similares – ADIPEC recomenda que, na compra desses produtos, deve-se fazer uma inspeção detalhada, observando-se a rotulagem, prazo de validade, etiqueta na embalagem secundária, características odoríferas, se existe notificação das empresas fabricantes e/ou importadoras e distribuidoras na Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA/MS, emissão de nota fiscal e preço compatível².

CONCLUSÃO

Concluiu-se que nenhum dos produtos encaminhados pelo Instituto de Criminalística correspondia aos respectivos padrões de referência, demonstrando que não eram de fabricação da empresa

detentora da marca. Os dados obtidos servem de alerta aos órgãos competentes para intensificação da fiscalização e adoção de medidas contra a prática da falsificação, como campanhas educativas, esclarecendo os riscos que esses produtos podem causar à saúde e à segurança dos consumidores.

REFERÊNCIAS

1. Haddad R, Catharino RR, Marques LA, Eberlin, MN. Perfume fingerprinting by easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry: nearly instantaneous typification and counterfeit detection. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2008; 22:3662-6.
2. Associação dos Distribuidores e Importadores de Perfumes, Cosméticos e Similares - ADIPEC. Aprendendo para ensinar sobre pirataria. São Paulo; 2007. [acesso 2012 mai 02]. Disponível em: [http://www.adipec.com.br/selo/pirataria].
3. Ellendt K, Hempel G, Köbler H. Analysis of sensitizing fragrances by gas chromatography – mass spectrometry. *SÖFW J.* 2001; 127(12):29-34.
4. Augusto F, Poppi RJ, Pedroso MP, Godoy LAF, Hantao LW. GCxGC-FID for qualitative and quantitative analysis of perfumes. *LC-GC.* 2010: 430-8.
5. Lucca LG, Paese K, Guterres SS. Perfumes: Arte e Ciência. *Rev Cosm Toiletr.* 2011; 23(3):54-64.
6. Santos H. Composições inspiradas na natureza. *Rev Neg Ind Beleza.* 2007; 5:24-36.
7. Schueller R, Romanowski P. A essência das fragrâncias. *Rev Cosm Toiletr.* 2005;1 7(5): 50-5.
8. Del Comune AP, Menin SEA, Pagliace SR, Petch V. O perfume e o alquimista. *Lecta.* 1998; 16(1):91-8.
9. Dias SM, Silva RR. Perfumes: uma química inesquecível. *Quím Nova Esc.* 1996; 4:3-6.
10. Draelos ZD. *Cosméticos em Dermatologia.* 2ªed. Rio de Janeiro (RJ): Revinter; 1999: 237-43.
11. Marques L A. Aplicação de técnicas avançadas de espectrometria de massas em ciências de alimentos e perfumaria [dissertação de mestrado]. Campinas (SP): Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas; 2006.
12. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução nº. 481, de 23 de setembro de 1999. Dispõe sobre o controle de qualidade microbiológica para os produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil.* Brasília, DF, 06 out 1999. Seção 1. p.06.
13. *Farmacopeia Brasileira*, 5 ed. vol. 1. Brasília, 2010.
14. Pinto TJA, Ikeda TI, Miyamaru LL, Santa Bárbara MC, Santos RP, Cruz AS. Cosmetic Safety: proposal for the replacement of *in vivo* (Draize) by *in vitro* test. *Open Toxicol.* 2009; 31-7.
15. International Organization For Standardization [BSEN-ISO] 10993-05: Biological evaluation of medical devices tests for *in vitro* cytotoxicity. Geneva, 2009.
16. UNITED. States Pharmacopeia. 34 ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2011.
17. Asten A. The importance of GC and GC-MS in perfume analysis. *Trends Anal Chem.* 2002; 21(9-10):698-708.

False-negative results in Real-Time PCR (RT-PCR) for meningococcal disease diagnosis

Ocorrência de resultados falso-negativos na reação de PCR em Tempo Real (PCR-TR) no diagnóstico da doença meningocócica

RIALA6/1544

Lucila Okuyama FUKASAWA^{1*}, Maria Gisele GONÇALVES¹, Fabio Takenori HIGA¹, Maristela Marques SALGADO¹, Ana Paula Silva de LEMOS², Claudio Tavares SACCHI¹

*Corresponding author: ¹Center of Immunology, Instituto Adolfo Lutz. Av. Dr. Arnaldo, 355, 11º andar, CEP: 01246-000, Cerqueira César, São Paulo – SP, Brasil. Tel: (11) 3068-2899. E-mail: lucilaof@gmail.com

²Center of Bacteriology, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brazil.

Recebido: 19.07.2012 - Aceito para publicação: 04.02.2013.

ABSTRACT

Factors responsible for false-negative results (F-N) in RT-PCR assay for detecting *N. meningitidis* in serum and CSF samples were investigated. As the meningococcal disease should be rapidly treated because of its high mortality and epidemic potential, the F-N in diagnostic testing may cause treatment failures and/or on disease restraint in community. Thus, it is crucial to learn the factors which cause F-N in RT-PCR assays. The F-N were induced by inhibition, low quantity of target DNA in extracted samples, and inadequate temperature employed at PCR annealing procedure. As bacterial DNA concentration in samples might be highly variable, the ideal sample volume to be extracted could not be defined. As previously recommended for *N. meningitidis* gene-grouping by RT-PCR assay, the annealing temperature at 60 °C was not suitable for B and W₁₃₅ genogroups. Altogether, these factors induced F-N in 31 samples; therefore, 30 % of *N. meningitidis* detected by RT-PCR were classified as non-genogrouped. The inhibitors and/or the low amount of target DNA induced F-N on RT-PCR, independently of the specimen volume used for extracting DNA. However, adjustments on the PCR annealing temperature and amount of extracted DNA added into the reaction might avoid the occurrence of the majority of F-N.

Keywords. real-time polymerase chain reaction, *N. meningitidis*, *N. meningitidis* serogroup, melting temperature, cerebrospinal fluid.

RESUMO

Foram investigados os fatores que causam resultados falso-negativos (RF-N) nas reações de PCR-TR no diagnóstico de *N. meningitidis* em amostras de soro e LCR. Considerando-se que a doença meningocócica deva ser rapidamente tratada pela alta letalidade e potencial epidêmico, o RF-N no ensaio diagnóstico pode ocasionar falhas no tratamento e/ou na contenção da doença na comunidade. Portanto, é importante elucidar os fatores que induzem RF-N na PCR-TR. Os RF-N ocorreram em virtude de inibição, baixa quantidade de DNA-alvo nas preparações de DNA e inadequada temperatura no procedimento de anelamento. Por ser altamente variável a concentração de DNA bacteriano em amostras clínicas, não foi possível definir o volume ideal de amostra a ser extraído. A temperatura a 60 °C para anelamento, recomendada para genogrupagem de *N. meningitidis* por PCR-TR, não foi adequada para genogrupos B e W₁₃₅. Estes fatores ocasionaram a indução de RF-N em 31 amostras; conseqüentemente, 30 % das bactérias detectadas pelo PCR-TR foram classificadas como não genogrupáveis. Inibidores e/ou baixa quantidade de DNA-alvo induzem RF-N, independentemente do volume de amostra utilizada na extração de DNA; entretanto, ajustes na temperatura de anelamento e na quantidade de amostra extraída adicionada na reação podem evitar a maioria destes RF-N.

Palavras-chave. reação em cadeia da polimerase em tempo real, *N. meningitidis*, *N. meningitidis* sorogruppo, temperatura de anelamento, líquido cefalorraquidiano.

INTRODUCTION

Bacterial meningitis is a serious disease that requires laboratory confirmation for optimal management. Most bacterial meningitis is still caused by *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* serotype b, although the latter has declined in incidence substantially in many countries since the introduction of *H. influenzae* b vaccine^{1,2}. Although bacterial culture is considered the gold standard method for laboratory confirmation, many cases are diagnosed using non-culture approaches, including latex agglutination, counterimmunoelectrophoresis (CIE), conventional PCR and, more recently, real-time PCR (RT-PCR)^{3,4}.

In April 2007, we begun using multiplex RT-PCR for the diagnosis of bacterial meningitis caused by *N. meningitidis*⁴, *S. pneumoniae*⁵, and *H. influenzae*³ on cerebrospinal fluid (CSF) and serum samples in Greater São Paulo, Brazil⁶. For samples that are RT-PCR positive for *N. meningitidis*, genogrouping is also performed using specific singleplex RT-PCR assays (for serogroups A, B, C, Y, W₁₃₅ and X)⁴.

Since the introduction of multiplex RT-PCR for diagnosis of bacterial meningitis in Greater São Paulo, two unexpected situations have arisen: (i) we have identified 6 serum samples with false negative RT-PCR results for *N. meningitidis*, and (ii) 25 CSF samples with false negative serogroup-specific RT-PCR results for serogroups B (n=15) and W₁₃₅ (n=10). As RT-PCR is more sensitive and specific than most non-culture diagnostic methods including CIE, the possibility of false negative RT-PCR results is of great interest. The objective of this study was to investigate the reasons for these 31 false negative RT-PCR results.

MATERIAL AND METHODS

Institutional review board (IRB) approvals

The Instituto Adolfo Lutz (IAL), as well as the Comissão Nacional de Ética em Pesquisa, the Brazilian national IRB, approved the study.

Clinical samples

From April to May 2007, we received 534 clinical samples suspected of bacterial meningitis collected in Greater São Paulo, State of São Paulo, Brazil. Six serum and 25 CSF samples with discordant CIE and RT-PCR

results were selected to this study (Table 1). Fifteen additional non-discordant sera samples were included in the study for comparison reasons.

Culture, CIE, and latex agglutination

As a retrospective study, culture, CIE, and latex agglutination results for the 25 CSF and 21 sera samples were accessed on our database (Table 2). All 6 serum samples were serogroup C by CIE and latex agglutination, one was *N. meningitidis* C by culture and slide agglutination test using polyclonal antiserum. All 6 sera samples were *N. meningitidis* negative by RT-PCR, but genogrouped as C by RT-PCR genogrouping. Fifteen CSF samples were serogroup B by CIE and latex agglutination, 8 of them were culture positive for *N. meningitidis* and serogroup B by slide agglutination; by RT-PCR all 15 samples were *N. meningitidis* but none of them was genogrouped. The remaining 10 CSF samples were serogroup W₁₃₅ by CIE, latex agglutination, 2 of them were culture positive for *N. meningitidis* and serogroup W₁₃₅ by slide agglutination; by RT-PCR all 10 CSF were *N. meningitidis*, but none of them were genogrouped.

DNA extraction

DNA extraction was performed using QIAGEN QIAamp DNA Blood mini kit (QIAGEN, Valencia, CA) as described by the manufacturer except that an aliquot of 500 µL of sera and CSF were processed, and the DNA was eluted in 50 µL of TE buffer. A second DNA extraction was also performed using 200 µL for all sera and CSF samples with available volume.

Real-time PCR assay

Two different RT-PCR assays were used in this study. The first was a multiplex RT-PCR including primers and probe for *ctrA*⁴, *lytA*⁵, and *bexA*³ genes⁶. The second RT-PCR assay was performed as a singleplex for *N. meningitidis* genogroup determination⁴. All samples were submitted to RT-PCR assays with 5 µL as template. As inhibition was one possible reason for discrepant results between CIE and RT-PCR, we also repeated the genogrouping RT-PCR assay using 2 µL and/or 5 µL of extracted DNA as template, from 200 µL and 500 µL of extracted DNA for comparison. Nine CSF samples were submitted to RT-PCR with 2 µL and 5 µL and the remaining 16 CSF samples with 2 µL only.

DNA was amplified with 7300 Real Time PCR system (Applied Biosystems) by using the following

Table 1. Laboratory results for 31 samples with false negative RT-PCR results

Sample #	Material	CIE	Latex agglutination	Conventional PCR	Serogroup from culture*	RT-PCR	
						Multiplex	Genogrouping
36.766	Serum	MenC	MenC	Negative	ND	Negative	C
43.792	Serum	MenC	MenC	MenC	MenC	Negative	C
44.670	Serum	MenC	MenC	Negative	Negative	Negative	C
55.039	Serum	MenC	MenC	Negative	Negative	Negative	C
60.830	Serum	MenC	MenC	Negative	Negative	Negative	C
61.253	Serum	MenC	MenC	Negative	Negative	Negative	C
2.065	CSF	MenB	MenB	MenB	ND	Men	NG
4.128	CSF	MenB	MenB	MenB	MenB	Men	NG
4.366	CSF	MenB	MenB	MenB	ND	Men	NG
6.301	CSF	MenB	MenB	MenB	MenB	Men	NG
8.914	CSF	MenB	MenB	MenB	MenB	Men	NG
8.915	CSF	MenB	MenB	MenB	MenB	Men	NG
9.105	CSF	MenB	MenB	MenB	MenB	Men	NG
17.339	CSF	MenB	MenB	MenB	ND	Men	NG
24.633	CSF	MenB	MenB	MenB	MenB	Men	NG
32.863	CSF	MenB	MenB	MenB	MenB	Men	NG
33.822	CSF	MenB	MenB	MenB	ND	Men	NG
40.276	CSF	MenB	MenB	MenB	ND	Men	NG
40.722	CSF	MenB	MenB	Negative	ND	Men	NG
44.292	CSF	MenB	MenB	Negative	ND	Men	NG
62.107	CSF	MenB	MenB	MenB	MenB	Men	NG
15.333	CSF	MenW135	MenW135/Y	MenW135	ND	Men	NG
37.801	CSF	MenW135	MenW135/Y	MenW135	ND	Men	NG
61.573	CSF	MenW135	MenW135/Y	MenW135	MenW135	Men	NG
63.237	CSF	MenW135	MenW135/Y	MenW135	ND	Men	NG
67.184	CSF	MenW135	MenW135/Y	MenW135	ND	Men	NG
79.261	CSF	MenW135	MenW135/Y	MenW135	MenW135	Men	NG
770.501	CSF	MenW135	MenW135/Y	MenW135	ND	Men	NG
770.502	CSF	MenW135	MenW135/Y	MenW135	ND	Men	NG
770.503	CSF	MenW135	MenW135/Y	MenW135	ND	Men	NG
770.504	CSF	MenW135	MenW135/Y	MenW135	ND	Men	NG

*Serogrouping by slide agglutination. CIE: Counterimmunoelectrophoresis; MenB: *N. meningitidis* serogroup B; MenC: *N. meningitidis* serogroup C; MenW135: *N. meningitidis* serogroup W135; NG: non-groupable; ND: not-done
CSF: cerebrospinal fluid

Table 2. Multiplex RT-PCR results for 21 sera samples according the extraction volume

Sample		CIE	Multiplex RT-PCR Ct value	
Group	#		500 µL extraction Men	200 µL extraction Men
6 false negative sera samples by RT-PCR	36.766	MenC	NA	36
	43.792	MenC	NA	NA
	44.670	MenC	NA	38
	55.039	MenC	NA	NA
	60.830	MenC	NA	38
	61.253	MenC	NA	24
15 additional sera samples	20.929	MenC	38	NA
	24.733	MenC	36	34
	27.382	MenC	28	31
	28.312	MenW ₁₃₅	26	24
	36.520	MenC	38	33
	38.655	MenC	40	40
	40.722	MenB	38	NA
	44.292	MenB	39	37
	46.811	MenC	40	28
	49.874	MenC	29	27
	50.859	MenC	26	24
	50.861	MenC	30	29
	53.254	MenC	34	28
	56.607	MenC	34	33
	62.811	MenC	19	24

CIE: Counterimmunoelectrophoresis; MenB: *N. meningitidis* serogroup B; MenC: *N. meningitidis* serogroup C; MenW₁₃₅; NA: no amplification; Men: *N. meningitidis*

cycling parameters: 95 °C for 10 min, followed by 45 cycles of 95 °C for 15 seconds and 60 °C or 55 °C for 1 min. Amplification data were analyzed by instrument software. Negative samples were defined as those with cycle threshold (Ct) values greater than 40. As RT-PCR positive controls, 1 ng of extracted DNA from *N. meningitidis* serogroups B, C and W₁₃₅ was used per reaction.

Conventional PCR

Other than inhibition, false negative genogroups B and W₁₃₅ could be related to the annealing temperature used for the RT-PCR assay. To investigate the need for adjusting the annealing temperature, some samples were submitted to conventional PCR using genogroups B and W₁₃₅ RT-PCR primers and using 60 °C and 55 °C, as annealing temperatures. For this conventional PCR

we used DNA extracted from the 8 CSF genogroup B *N. meningitidis* culture isolates, and from all 10 CSF with CIE and latex serogroup W₁₃₅ (figure not shown). For some samples RT-PCR genogrouping was also repeated using both annealing temperatures as mentioned above. All 31 samples with suspected false negative RT-PCR results were also tested on a conventional multiplex PCR for *N. meningitidis* identification (*crgA* gene), and serogroup determination (*siaD* for genogroup B, and *synG* for genogroup W₁₃₅)⁷. The PCR products were visualized after run on 2 % agarose gel.

RESULTS

Conventional PCR

Only one of the 6 serum samples was positive for *N. meningitidis* serogroup C by conventional PCR. Twenty

three CSF samples were positive for *N. meningitidis* by conventional PCR, 13 and 10 were serogroups B and W₁₃₅, respectively (Table 1).

RT-PCR for *N. meningitidis* on sera samples

Four out of 6 false negative sera samples became positive after reducing the extraction volume from 500 µL to 200 µL (Table 2). The remaining two samples were still negative using 200 µL volume for extraction. However, those two samples were RT-PCR genogrouped confirmed as *N. meningitidis* serogroup C. By testing the additional 15 sera samples, the reduction in volume for DNA extraction affected the positivity of 2 samples previously RT-PCR positive for *N. meningitidis* (Table 2). There was no amplification for the other targets of the RT-PCR multiplex assay (*S. pneumoniae* and *H. influenzae*).

N. meningitidis RT-PCR genogrouping

Experiments were conducted for the 15 and 10 false negative genogroups B and W₁₃₅, respectively. The first experiment was to verify if the recommended annealing temperature for the genogroups B and W₁₃₅ assays were optimized. To accomplish this we used extracted DNA from 8 isolates out of the 15 CIE serogroup B, and all 10 CIE serogroup W₁₃₅ cases (Table 1).

The second experiment was to verify if 500 µL extraction product had inhibitors that could interfere in the reaction. However, because the limited volume for most of the 25 CSF samples, we were only able to additionally extract 200 µL from 9 samples (Table 3). Genogrouping B and W₁₃₅ *N. meningitidis* was performed for these 9 CSF samples using 2 µL and 5 µL at 55° C and 60 °C (Table 3). For the remaining 16 CSF samples,

Table 3. Comparison of RT-PCR genogrouping results using different template volumes, annealing temperatures and CSF extracted volumes

Sample #	CIE	Culture	RT-PCR Genogrouping Ct values							
			500 µL CSF extracted				200 µL CSF extracted			
			60 °C		55 °C		60 °C		55 °C	
			5 µL	2 µL	5 µL	2 µL	5 µL	2 µL	5 µL	2 µL
4.128	MenB	MenB	NA	33	35	23	41	32	26	26
6.301	MenB	MenB	NA	37	32	28	NA	37	32	30
8.914	MenB	MenB	NA	39	NA	26	NA	31	33	27
8.915	MenB	MenB	NA	NA	NA	39	NA	NA	NA	39
9.105	MenB	MenB	NA	33	29	26	41	30	26	27
24.633	MenB	MenB	NA	36	31	28	32	31	27	27
32.863	MenB	MenB	NA	38	33	29	ND	ND	ND	ND
62.107	MenB	MenB	NA	37	32	29	ND	ND	ND	ND
15.333	MenW ₁₃₅	ND	43	32	25	26	41	35	24	35
37.801	MenW ₁₃₅	MenW ₁₃₅	NA	44	NA	32	NA	30	21	19
61.573	MenW ₁₃₅	MenW ₁₃₅	NA	36	31	31	NA	40	30	30
63.237	MenW ₁₃₅	ND	NA	37	32	29	ND	ND	ND	ND
67.184	MenW ₁₃₅	ND	41	34	27	30	ND	ND	ND	ND
79.261	MenW ₁₃₅	ND	NA	33	27	25	ND	ND	ND	ND
770.501	MenW ₁₃₅	ND	NA	31	32	24	ND	ND	ND	ND
770.502	MenW ₁₃₅	ND	44	32	26	24	ND	ND	ND	ND
770.503	MenW ₁₃₅	ND	NA	44	38	37	ND	ND	ND	ND
770.504	MenW ₁₃₅	ND	NA	NA	38	37	ND	ND	ND	ND

CIE: Counterimmunoelectrophoresis; CSF: cerebrospinal fluid; MenB: *N. meningitidis* serogroup B; MenW₁₃₅: *N. meningitidis* serogroup W₁₃₅; NA: no amplification; ND: not-done

genogrouping was performed from the 500 µL extraction at 55 °C using 2 µL as template.

The results from these two experiments show that all the 25 originally false negative genogroup samples became genogrouped when using 500 µL sample extraction, at 55 °C, and using 2 µL of extracted DNA as template (15 genogroup B and 10 genogroup W₁₃₅).

DISCUSSION

Bacterial meningitis is a public health problem worldwide, and for appropriated control, early diagnosis is necessary. To overcome the lack of culture results, laboratories have used other methods to detect the presence of *N. meningitidis*, *H. influenzae* and *S. pneumoniae* in clinical samples. Conventional PCR and, more recently, RT-PCR assays, are the most promising approaches because they provide rapid detection of different target genes with high sensitivity and specificity.

Some of these PCR assays have been standardized based on whole cell suspensions or DNA extracted from isolates with little or no clinical samples included⁴. In practice moving from bacterial isolates to clinical samples on PCR assays brings at least two new issues to be addressed. The first is the presence of different source of inhibitors, especially on serum samples. The use and amplification of an internal control for inhibition detection does not guarantee that inhibition is not affecting the reaction, since inhibitors do may not affect all reactions equally. In addition, sometimes it is inappropriate or impossible to introduce one more set of primers and probe on a multiplex RT-PCR assay without disturbing the kinetics of other reactions in the mixture, what may result in reduced sensitivity of the assay. The second issue is the wide range of bacteria DNA present in clinical samples. The amount of bacteria DNA is not only related to clinical disease severity, but also on the sample volume available or chosen for DNA extraction⁸.

In reality, some PCR assays are introduced in a clinical laboratory routine with strong evidence of high sensitivity and specificity but they have not always been fully validated on clinical samples. It is using prospective results, that adjustments are introduced to optimize the assays. The objective of this work was to optimize our RT-PCR assay, finding the reasons for its apparently lower sensitivity in comparison with the CIE in detecting *N. meningitidis* and its genogroups B and W₁₃₅ on sera and CSF samples, respectively.

When we first began performing multiplex RT-PCR for detection of *N. meningitidis*, *H. influenzae*, and *S. pneumoniae* DNA on clinical samples, 200 µL aliquots of sera or CSF were used for DNA extraction. For comparison reasons, CIE was always performed in parallel. After few weeks of testing we had more CIE than RT-PCR positive results on sera and CSF samples. Additionally, we were observing too many RT-PCR results with high Ct values what makes difficult to differentiate a positive from a negative result (data not shown). Increasing the extraction sample volume to 500 µL, we were able to correct these discrepancies. However, after months of using RT-PCR in our laboratory, we found 6 new false negative RT-PCR results. Why did our multiplex RT-PCR not detected *N. meningitidis* on 6 serum samples despite the fact that RT-PCR has higher sensitivity? PCR of blood and blood fractions has been reported to be highly unpredictable and challenging due to the presence of inhibitors in blood and the low concentration of bacterial DNA^{3,4,7,9,10,11}. Drawing of blood for PCR at times different from those at which blood for culture was drawn also compromise analysis of sensitivity for both methods.

The reduction in sera volume for DNA extraction reduces the presence of inhibitors but it also reduces the amount of target DNA in the final purified DNA suspension. This reduction appears to have greater effect on the sensitivity of the *S. pneumoniae* component of the assay than on *N. meningitidis* component among our samples (data not shown). As the concentration of DNA present in a sample can be highly variable, it was not possible to define an ideal sample volume to be extracted.

The reduction on sample volume did not make 2 of the 6 false negatives RT-PCR become positive by multiplex RT-PCR (Table 2). As these two samples were genogrouped as C by RT-PCR, and reactions, *ctrA* and *siaD* have the same low limit of detection of 200 fg, the samples still have inhibitors that selectively interfere on the *ctrA* reaction but not on the genogroup C reaction. These are examples of how difficult is to adjust PCR assays for clinical samples, where there is a wide range of DNA target in it, and different types and amount of sample related inhibitors.

The use of extracted DNA from isolates is a necessary step for standardization of a new PCR assay for diagnosis, and that was how *N. meningitidis* RT-PCR genogrouping was optimized⁵. The best primer and probe concentrations were determined based on RT-PCR: (i)

multicomponent signals and exponential curves, (ii) 60 °C annealing temperature, (iii) using as template extracted DNA from isolates. But there was no attempt to check how the annealing temperature was affecting the efficiency of the reaction on clinical samples. Our results show that 60 °C is not the best annealing temperature for B or W₁₃₅ genogrouping reaction on clinical samples, and that was one of the reasons why 15 serogroup B and 10 serogroup W₁₃₅ *N. meningitidis* positives samples by CIE were not genogrouped confirmed by RT-PCR; the other reason was the presence of inhibitors. After reducing the annealing temperature to 55 °C and the amount of template to 2 µL in the reaction, all 25 samples were successfully genogrouped as B or W₁₃₅ and our rate of non-genogrouped samples dropped from 30 % to 7 %. Additional investigations will focus on the reasons for the 7 % of non-genogrouped samples. Interestingly, serogroup C RT-PCR genogrouping is successfully performed using the 60 °C annealing temperature as we have 73 samples genogrouped by RT-PCR as C using this temperature, and 25 and 10 of them were confirmed by CIE and by slide agglutination serogrouping from culture isolates, respectively. The detection of the 25 false negative genogrouping results was only possible because we run in parallel CIE as an additional test to RT-PCR. No problem with positive controls was ever detected. Our results suggest that the annealing temperature and consequently the efficiency of the reaction are less important when DNA template is not a limiting factor.

In summary, false negative results by RT-PCR assay for *N. meningitidis* may occur independently of the chosen volume for DNA extraction (500 µL or 200 µL); a better DNA extraction process where higher sample volumes are processed with more efficiency in removing inhibitors is desirable; optimization of RT-PCR assays for clinical samples should not be only based on extracted DNA from isolates, but also on clinical samples; and it is important to check how the recommended 60 °C annealing temperature for RT-PCR TaqMan assay may affect each individual reaction.

Based on the results of this study, we adopted the following sample processing algorithm:

1) For the DNA extraction process: employ 500 µL for CSF and 200 µL for serum.

2) For the RT-PCR assays for genogroups B and W₁₃₅: we employ 2 µL of DNA template and annealing temperature of 55 °C. If no amplification, the sample is tested for the presence of the other genogroups.

REFERENCES

1. Adams WG, Deaver KA, Cochi SL, Plikaytis BD, Broome CV, Wenger JD. Decline of childhood *Haemophilus influenzae* type b (Hib) disease in the Hib vaccine era. *JAMA*.1993;269:221-6.
2. Ribeiro GS, Lima JB, Reis JN, Gouveia EL, Cordeiro SM, Lobo TS, et al. *Haemophilus influenzae* meningitis 5 years after introduction of the *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine in Brazil. *Vaccine*.2007;25:4420-8.
3. Corless CE, Guiver M, Borrow R, Edwards-Jones V, Fox AJ, Kaczmarek EB. 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;39:1553-8.
4. Mothershed EA, Sacchi CT, Whitney AM, Barnett G, Ajello GW, Schmink S, et al. Use of real-time PCR to resolve slide agglutination discrepancies in serogroup identification of *Neisseria meningitidis*. *J Clin Microbiol*.2004;42:320-8.
5. Carvalho MGS, Tondella ML, McCaustland K, Weidlich L, McGee L, Mayer LW, et al. Evaluation and Improvement of Real-Time PCR detection assay to *lytA*, *ply*, and *psa* genes for detection of pneumococcal DNA. *J Clin Microbiol*.2007;45:2460-6.
6. Sacchi CT, Fukasawa LO, Gonçalves MG, Salgado MM, Shutt KA, Carvalhanas TR, et al. Incorporation of Real-Time PCR into Routine Public Health Surveillance of Culture Negative Bacterial Meningitis in São Paulo, Brazil. *PLoS ONE*.2011;6:1-8.
7. Taha MK. Simultaneous approach for non-culture PCR-based identification and serogroup prediction of *Neisseria meningitidis*. *J Clin Microbiol*.2000;38:855-7.
8. Yamamoto Y. PCR in diagnosis of infection: detection of bacteria in cerebrospinal fluids. *Clin Diagn Lab Immunol*.2002;9:508-14.
9. Al-Soud WA, Radstrom P. Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells. *J Clin Microbiol*.2001;39:485-93.
10. Al-Soud WA, Ouis IS, DQ L, Ljungh S, Wadstrom T. Characterization of the PCR inhibitory effect of the bile to optimize real-time PCR detection of *Helicobacter* species. *FEMS Immunol Med Microbiol*.2005;44:177-82.
11. Sheppard CL, Harrison TG, Morris R, Hogan A, George RC. Autolysin-targeted. LightCycler assay including internal process control for detection of *Streptococcus pneumoniae* DNA in clinical samples. *J Clin Microbiol*.2004;53:180-95.

Avaliação parasitológica da água de abastecimento e do solo peridomiciliar de Aldeias Guarani

Parasitological assessment of the water supply and the domiciliary surrounding area soil in Guarani Villages

RIALA6/1545

Alyne da Silva BARBOSA^{1*}, Claudia Maria Antunes UCHÔA¹, Valmir Laurentino da SILVA², Antônio Nascimento DUARTE³, Newton Francisco da CONCEIÇÃO³, Myriam Bandeira VIANNA⁴, Ana Beatriz Monteiro FONSECA⁵, Marcus Vinicius Maia RIBEIRO¹, Otilio Machado Pereira BASTOS¹

*Endereço para correspondência: ¹Laboratório de Parasitologia, Departamento de Microbiologia e Parasitologia (MIP), Instituto Biomédico (CMB), Universidade Federal Fluminense (UFF/RJ). Rua Pr. Ernani Pires de Melo, n° 101, Niterói, CEP 24210-130, RJ-Brasil. Tel: (21) 2629-2426. E-mail: alynnedsb@vm.uff.br; alynnedsb@gmail.com.

²Laboratório de Imunodiagnóstico, Departamento de Ciências Biológicas (DCB), Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca (ENSP), Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz). ³Laboratório de Parasitologia, Departamento de Ciências Biológicas (DCB), Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca (ENSP), Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz). ⁴Laboratório de Meio Ambiente, Departamento de Microbiologia e Parasitologia (MIP), Instituto Biomédico (CMB), Universidade Federal Fluminense (UFF/RJ). ⁵Laboratório de Estatística, Departamento de Estatística, Universidade Federal Fluminense (UFF/RJ).
Recebido: 12.12.2011 - Aceito para publicação: 25.03.2013

RESUMO

As aldeias Guarani de Angra dos Reis e Paraty possuem abastecimento de água constituído por captação das nascentes, tratamento da água com cloro e/ou filtros e reservatórios de armazenamento. O sistema de saneamento é estruturado por módulos sanitários fornecidos pela Funasa. Para investigar a contaminação ambiental por protozoários e helmintos, as amostras de água e de solo das aldeias foram avaliadas por meio de análises parasitológicas. De quatro aldeias, foram coletadas 24 amostras de água nas captações com cartuchos filtrantes, 24 dos reservatórios de água clorada por sifonação e 64 amostras de solo por raspagem superficial no peridomicílio. Todas as amostras foram analisadas pelas técnicas de centrifugo-sedimentação, centrifugo-flutuação e ensaio imunoenzimático para *Cryptosporidium* spp., *Giardia lamblia* e *Entamoeba histolytica*, associando-se à pesquisa de larvas de nematódeos no solo. As aldeias de Paraty Mirim e Rio Pequeno apresentaram maior positividade para parasitas nas amostras de água, detectando-se cistos de amebídeos e *Giardia* sp., antígenos de *G. lamblia*, *E. histolytica* e *Cryptosporidium* spp. Foram detectados ovos de *Ascaris* sp., *Trichuris* sp., antígenos de *Cryptosporidium* spp. e *E. histolytica* nas amostras de solo da aldeia Sapukai. Esses resultados indicam elevada contaminação ambiental e deficiência no tratamento da água que abastece as aldeias Guarani.

Palavras-chave. água de consumo humano, contaminação do solo, análise parasitológica, protozoários, helmintos, comunidades indígenas.

ABSTRACT

In Guarani villages of Angra dos Reis and Paraty the water is supplied by springs capture, water treatment with chlorine and/or filters and storage reservoirs. The sanitation system is structured by sanitary modules provided by Funasa. In order to evaluate the environmental contamination by protozoa and helminths, the soil and water samples collected from the villages were assessed by means of parasitological analyses. From four villages, twenty-four water samples were collected from the intake points using filter cartridges, 24 samples from chlorinated water reservoirs by siphoning and 64 soil samples by scraping the soil surface of domiciliary surrounding areas. All samples were analyzed by means of centrifugal sedimentation, flotation techniques, and enzyme immunoassay for *Cryptosporidium* spp., *Giardia lamblia* and *Entamoeba histolytica*, and associated detection of soil nematode larvae. The Paraty Mirim and Rio Pequeno villages showed the highest number of positive water samples for parasites amoebids and *Giardia* sp. cysts, *G. lamblia*, *E. histolytica* and *Cryptosporidium* spp. antigens. Eggs of *Ascaris* sp. and *Trichuris* sp.; antigens of *Cryptosporidium* spp. and *E. histolytica* were detected in the village Sapukai soil. These results indicate a high environmental contamination and a deficiency in the treatment of water that supplies the Guarani villages.

Keywords. drinking water quality, soil contamination, parasitological analyses, protozoa, helminths, indigenous communities.

INTRODUÇÃO

As infecções ocasionadas por veiculação hídrica ocorrem quando há ingestão ou banho com água contaminada por micro-organismos ou água inadequadamente tratada¹. Essas infecções, sobretudo as causadas pelos protozoários intestinais, são consideradas como um dos principais problemas de saúde pública². Embora o tratamento da água potável envolva procedimentos de clarificação, sedimentação, filtração, cloração e fluoretação, esses não são totalmente eficazes na eliminação de ovos de helmintos e, principalmente, cistos de protozoários^{3,4}.

A vegetação de cobertura e o lençol freático contaminados por esgotos e efluentes podem atuar como veículo e fonte de agentes causadores de doenças, considerando que as pessoas estão, direta ou indiretamente, em contato permanente com o solo por meio de alimentos, água e ar⁵. O solo pode possibilitar a infecção por parasitos via contaminação de mãos e unhas, água ou alimentos e ainda, penetração de larvas infectantes através da pele, principalmente associada ao hábito de andar descalço⁶.

Apesar do solo e da água serem considerados importantes veículos na transmissão das enteroparasitoses, poucos laboratórios de companhias de abastecimento de água realizam a detecção de formas evolutivas de protozoários e helmintos, alegando falta de padronização, complexidade das técnicas e custo elevado⁷. Para água de abastecimento, a Portaria n°

2914/2011 do Ministério da Saúde preconiza a pesquisa de cistos de *Giardia* sp. e *Cryptosporidium* spp⁸. Já em solo, a detecção de ovos e larvas de helmintos e cistos de protozoários, geralmente, é realizada em pesquisas epidemiológicas, principalmente em amostras coletadas em parques e praças públicas⁹.

A prevalência das parasitoses é elevada em locais nos quais as condições de saneamento básico são insatisfatórias. Os indígenas, nas diversas regiões do Brasil, têm um complexo quadro de saúde, diretamente relacionado a processos históricos de mudanças sociais, econômicas e ambientais, aliado à expansão de frentes demográficas e econômicas da sociedade nacional. Atualmente, verifica-se a emergência de desafios à saúde nessas populações, em consequência de doenças crônicas não transmissíveis, doenças transmissíveis e contaminação ambiental. A fim de combater eficazmente e prevenir os agravos à saúde, que acometem essas populações, faz-se necessário conhecer melhor o perfil epidemiológico do meio ambiente onde vivem¹⁰.

Este estudo foi realizado em quatro aldeias Guarani, situadas nos municípios de Angra dos Reis (aldeia Sapukai) e Paraty (aldeias de Araponga, Rio Pequeno e Paraty Mirim) do Estado do Rio de Janeiro (Figura 1).

Sapukai, a maior das aldeias estudadas, com cerca de 360 indígenas, localiza-se em Angra dos Reis, no bairro de Bracuí, região de Mata Atlântica, em altitudes que variam de 300 a 1.300 m¹¹. Paraty Mirim, com aproximadamente 180 indígenas, localiza-se no



Figura 1. Mapa de localização das aldeias Guarani nos Municípios de Angra dos Reis e Paraty, RJ/Brasil. Fonte: Original

bairro que leva o mesmo nome, a cerca de 20 km ao sul da cidade de Paraty e distante aproximadamente 4,5 km da estrada Rio-Santos¹². Araponga, que apresenta 20 habitantes de um mesmo núcleo familiar, é uma aldeia de difícil acesso, muito preservada por estar em altitude elevada no interior da Serra da Bocaina¹³, está situada no bairro de Patrimônio e distante aproximadamente 30 km ao sul da cidade de Paraty. Rio Pequeno, com 35 habitantes, situa-se no bairro do mesmo nome, localiza-se 20 km ao norte da cidade de Paraty e cerca de 3 km da estrada Rio-Santos, porém ainda não há demarcação oficial da área de reserva e aldeamento.

Todas as aldeias possuem módulos sanitários, de uso comunitário, instalados pelo setor de saneamento da Fundação Nacional de Saúde (Funasa) na parte externa da casa e constituídos por construções de alvenaria ou fibra, com vaso sanitário, chuveiros e pia. Os sistemas de abastecimento de água destas aldeias captam a água bruta das nascentes (mananciais superficiais) por meio de canos de policloreto de vinila e a conduzem para reservatórios de polietileno tipo caixa d'água, onde recebe tratamento com hipoclorito de cálcio. Filtros de areia e pedra são utilizados no sistema de abastecimento da aldeia Rio Pequeno, enquanto filtros lentos de areia são utilizados em Sapukai; as aldeias Araponga e Paraty Mirim não possuem filtros.

O hipoclorito de cálcio, assim como a areia e pedra dos filtros, é fornecido regularmente pelo setor de saneamento da Funasa. Todas as aldeias possuem um Agente indígena de saneamento (Aisan), responsável pela limpeza dos reservatórios de água, reposição do cloro no tratamento da água, limpeza dos módulos sanitários e manutenção dos filtros de areia e pedra, bem como desobstrução dos canos de água.

Considerando que não há, nessa região, pesquisas que abordem avaliação parasitológica de amostras ambientais em comunidades indígenas, o objetivo deste estudo foi avaliar a contaminação, por protozoários e helmintos, da água de abastecimento e do solo dos peridomicílios, com a finalidade de identificar possíveis riscos de infecção para a população Guarani que vive nos municípios de Angra dos Reis e Paraty.

MATERIAL E MÉTODOS

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética da Escola Sérgio Arouca, CEP-ENSP nº56/09, protocolo: 0056.0.031.000-09, sendo parte de um

projeto do Departamento de Ciências Biológicas da ENSP/Fiocruz-RJ.

Local do estudo: Aldeias Guarani

Este estudo foi realizado em quatro aldeias Guarani situadas nos municípios de Angra dos Reis (aldeia Sapukai) e Paraty (aldeias de Araponga, Rio Pequeno e Paraty Mirim) do Estado do Rio de Janeiro.

Coleta de amostras

As coletas das amostras foram realizadas no período de fevereiro a outubro de 2010.

As amostras de água foram coletadas em seis sistemas distintos: três existentes em Sapukai (Cachoeira, Cacique e Pupunha), um em Araponga, um em Rio Pequeno e outro em Paraty Mirim. Em cada um destes sistemas, foram coletadas 04 amostras de água bruta e 04 amostras de água tratada, totalizando 24 amostras de cada tipo de água. Dois litros de água bruta foram filtrados em cartuchos modelo DPPPY-1 Micro Wind II da Cuno[®], os quais foram acondicionados em sacos plásticos de primeiro uso e identificados; as amostras de água tratada foram recolhidas nos reservatórios por sifonação em garrafas plásticas de dois litros, previamente higienizadas e identificadas.

As amostras de solo foram coletadas em quatro pontos distintos de cada aldeia, escolhidos pela maior concentração humana e/ou animais domésticos. Em cada ponto, foram coletadas 04 amostras, totalizando 16 amostras de solo para cada aldeia e 64 amostras no total. As amostras, constituídas por *pool* de pontos, distantes 250 cm entre si, que circundavam um raio de 150 cm do local de escolha, foram obtidas por raspagem superficial com pá de aço inoxidável, utilizando um gabarito de 25 cm², acondicionadas em sacos plásticos de primeiro uso e identificados.

Todas as amostras coletadas foram encaminhadas aos laboratórios de Parasitologia do Instituto Biomédico da Universidade Federal Fluminense (UFF) e de Imunodiagnóstico do Departamento de Ciências Biológicas (DCB) da Escola Nacional de Saúde Pública (ENSP) Fiocruz para análises, em recipiente isotérmico e sob refrigeração.

Análise Parasitológica

Os cartuchos foram lavados com um litro de solução detergente neutro 0,001 %. Em seguida, o lavado foi filtrado, em tamis e gaze, e sedimentado por intervalos

de 24 horas, até obtenção de sobrenadante límpido. O mesmo procedimento foi executado com as amostras de água tratada, coletadas em garrafas plásticas.

Cada amostra de solo foi dividida em quatro frações de 25 g cada, para pesquisa de larvas de nematódeos por termohidrotropismo – técnica microscópica de Baermann¹⁴. Após esse processamento, os 100 g de amostra foram eluídos em um litro de solução detergente neutro 0,001 %, filtrados em tamis e gaze e sedimentados por intervalos de 24 horas, até a obtenção de sobrenadante límpido.

Para a pesquisa das formas evolutivas de protozoários e helmintos, parte do sedimento obtido do pré-processamento das amostras de água e solo foi submetido às técnicas de Ritchie¹⁵ modificada por Young et al¹⁶ com leitura de três lâminas por amostra e de Sheather¹⁷ modificada por Huber et al¹⁸ com leitura de uma lâmina por amostra, em microscópio óptico binocular Olympus® BX 41 em aumento de 100 vezes e confirmação em 400 vezes. O ensaio imunoenzimático (Elisa – *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) foi realizado no laboratório de Imunodiagnóstico do DCB – ENSP utilizando os kits Wampole *Cryptosporidium* II test Techlab®, *Entamoeba* Ridascreen® e *Giardia* Ridascreen®. Seguiu-se o protocolo preconizado pelo fabricante dos kits com leitura em equipamento Testline® ELx 800, sendo aplicados 100 µL da amostra diluída na proporção 1:2 em solução diluente fornecida nos kits.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliação parasitológica da água

Vinte e três amostras coletadas de água (48 %), tanto bruta como tratada, foram positivas para formas evolutivas de protozoários, helmintos e/ou antígenos de *G. lamblia*, *Cryptosporidium* spp. e *E. histolytica*, sendo que estes resultados concordam com os obtidos por Carneiro¹⁹, que evidenciou, por técnicas microscópicas, a presença de cistos de *Giardia* sp., *Entamoeba coli* e oocistos de *Cryptosporidium* spp. em água antes e após a sua entrada nas caixas d'água de residências na cidade de Morrinhos/GO.

A positividade em água tratada, quando comparada com a de água bruta, foi maior em Araponga e Rio Pequeno e teve positividade similar em Sapukai Cachoeira e Sapukai Pupunha, evidenciando que em 66,6 % (4/6) dos sistemas de abastecimentos estudados, a água tratada apresentou positividade igual ou superior à água bruta. Estes resultados denotam uma possível contaminação da água após a captação, relacionada ao manejo ou ao armazenamento nos reservatórios (Figura 2).

Em Rio Pequeno, Paraty Mirim e Sapukai (sistema Cacique) foram detectados cistos de amebídeos com mais de quatro núcleos, em elevada intensidade nas lâminas de microscopia examinadas, apesar de não ter sido realizada avaliação parasitológica quantitativa. A presença destas estruturas pode indicar cisto de amebídeo em processo de maturação para tornar-se cisto

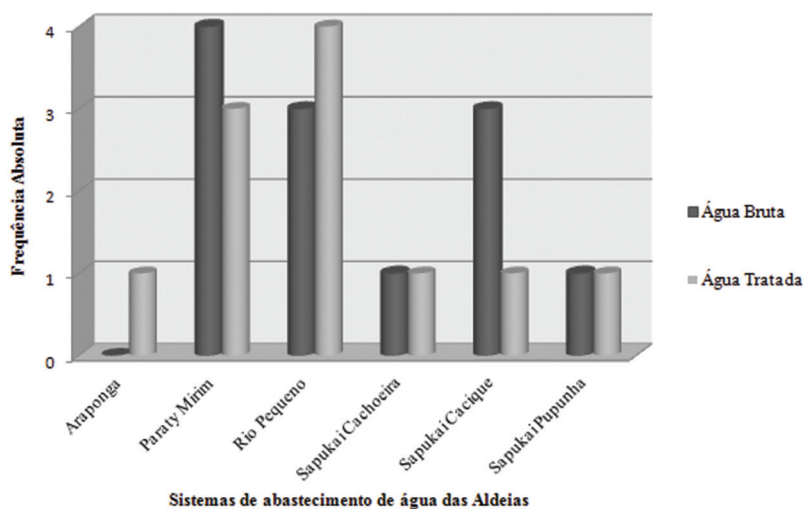


Figura 2. Distribuição em água bruta e tratada das 23 amostras de água positivas para protozoários e/ou helmintos coletadas em aldeias Guarani, RJ/Brasil

octanucleado, os quais podem pertencer a espécies de amebas específicas de animais ou do ser humano, como *Entamoeba coli*, o qual também foi detectado por Cutolo e Rocha²⁰ na pesquisa de parasitos em águas de reuso no Estado de São Paulo.

Na água tratada de Rio Pequeno foi encontrado oocisto de *Cystoisospora* sp. com dimensões compatíveis com *C. rivolta*, parasito de felídeos e *C. ohioensis*, parasito de canídeos²¹. A presença deste coccídio indica contaminação por fezes de animais, sendo grande a possibilidade de ser *C. ohioensis*, considerando haver cães domésticos coexistindo no peridomicílio.

Somente nos exames microscópicos das amostras de água da aldeia Paraty Mirim foram evidenciados, tanto em água bruta quanto em tratada, cistos de *Giardia* sp. com dimensões compatíveis com *G. lamblia* ou *G. microti*²². A positividade verificada nessas amostras para o antígeno de *G. lamblia* sugere que o cisto evidenciado seria desse parasito, porém não foi possível descartar a possibilidade da presença de cistos de outras espécies de *Giardia* sp. com dimensões compatíveis. Nas amostras de água dessa aldeia também foram detectados cistos de amebídeo tetranucleado com 10µm de diâmetro, compatíveis com o complexo *E. histolytica/E. dispar*, e a confirmação do antígeno de *E. histolytica* sugere que os cistos de amebídeos tetranucleados detectados nas técnicas microscópicas são dessa espécie (Tabela 1).

A detecção dos antígenos de *Cryptosporidium* spp., *E. histolytica* e *G. lamblia* nas amostras de água bruta e tratada indica contaminação fecal, de origem humana ou outros animais, no manancial superficial ou diretamente no reservatório de água clorada. Segundo Franco²³, esses protozoários têm importância em saúde pública, apresentando formas infectantes (cistos e oocistos) com alta resistência a condições ambientais adversas

e aos processos convencionais de tratamento da água, favorecendo a ocorrência de surtos por veiculação hídrica.

Nas amostras de água coletadas nas aldeias Rio Pequeno, Paraty Mirim e Sapukai (Cacique e Pupunha) foram detectados larvas e ovos de nematódeos, que podem ser espécies de vida livre e/ou parasitária, e demonstram que esses ambientes hídricos eram adequados ao embrionamento, desenvolvimento e sobrevivência de helmintos. Na água tratada no sistema de Sapukai Cacique foram evidenciados ovos de *Trichuris* sp. com dimensões compatíveis com *T. vulpis*, nematódeo parasito de canídeos com importância em saúde pública por estar relacionado a casos de larva migrans visceral humana²⁴ e infecção intestinal em humanos²⁵.

A utilização de filtros de areia e pedra no sistema de Rio Pequeno e de filtros lentos de areia em Sapukai não impediu a passagem de ovos de helmintos e cistos de protozoários dos mananciais superficiais contaminados para os reservatórios de água clorada, sendo que estes resultados concordam com os evidenciados por Heller et al²⁶, que isolaram cistos de *Giardia* sp. e oocistos *Cryptosporidium* spp. em água de mananciais superficiais, antes e após a etapa de filtração nas estações de tratamento de água na cidade de Viçosa, MG.

O filtro é um importante elemento para retenção de formas evolutivas de parasitos, porém existem fatores determinantes da eficácia do processo de purificação da água que devem ser considerados, como o diâmetro do poro da malha filtrante associado à variação da vazão da água. Os resultados indicaram que a presença do filtro nos sistemas de abastecimento de água de algumas aldeias não interferiu na positividade de protozoários e nematódeos em relação a aldeias que não utilizaram filtro, como Paraty Mirim e Araponga. Segundo Lechevalier et al²⁷, os filtros diminuem a passagem de matéria orgânica, mas não retêm

Tabela 1. Distribuição dos protozoários e/ou helmintos detectados por técnicas microscópicas e imunoenzimáticas nas amostras de água coletadas nos sistemas de abastecimento de quatro aldeias Guarani de Angra dos Reis e Paraty, RJ/Brasil

Organismos	Araponga		Rio Pequeno		Paraty Mirim		Sapukai Cachoeira		Sapukai Cacique		Sapukai Pupunha	
	AB*	AT**	AB*	AT**	AB*	AT**	AB*	AT**	AB*	AT**	AB*	AT**
Protozoários	-	-	1	-	2	2	-	-	1	-	-	-
Helmintos	-	-	-	1	1	1	1	-	1	1	-	1
Antígeno de <i>Entamoeba histolytica</i>	-	-	1	2	1	1	1	-	-	-	-	-
Antígeno de <i>Cryptosporidium</i> spp.	-	1	2	1	3	1	-	1	-	-	-	1
Antígeno de <i>Giardia lamblia</i>	-	-	1	1	3	2	1	-	1	-	-	-
Larva de nematódeo	-	-	-	1	1	-	-	-	1	1	-	-

AB*: Água Bruta; AT**: Água Tratada; -: não foi detectado

ovos de helmintos e principalmente cistos de protozoários, que passam entre os grãos de areia ou pedra.

Em Rio Pequeno, assim como em Sapukai, o reservatório de água clorada permanece sempre tampado e situado em local de difícil acesso e elevação de terreno, condições essas que dificultam a ocorrência de contaminação fecal direta e sugerem que a contaminação da água com formas evolutivas de protozoários e helmintos tenha ocorrido no manancial superficial (água bruta), sendo importante ressaltar que estas aldeias estão próximas à mata fechada e, portanto, suscetíveis à contaminação dos mananciais por fezes de animais silvestres ou material fecal do solo carregado pela água das chuvas. Apesar de benéfica, a elevação dificulta a limpeza rotineira que, associada à ausência de filtros no sistema de Paraty Mirim, determinaram acúmulo de grande quantidade de sujidades no fundo dos reservatórios.

A observação de uma única amostra positiva no sistema de abastecimento da aldeia Araponga pode ser consequência do difícil acesso à nascente, onde ocorre a captação da água bruta, e da supervisão rigorosa do cacique sobre o Aisan para a limpeza periódica do reservatório de água clorada, no qual foi verificado pouquíssimo sedimento em seu fundo. A preocupação do cacique quanto à limpeza dos reservatórios e a ação efetiva do Aisan não foram observadas nas demais aldeias, fato que pode ter propiciado a verificação de maior volume de resíduos nos outros sistemas de abastecimento.

Avaliação parasitológica do solo

Dentre as 64 amostras de solo coletadas, 40 (62,5 %) foram positivas para protozoários, helmintos e/ou antígenos de *G. lamblia*, *Cryptosporidium* spp. e *E. histolytica*. Todas as aldeias apresentaram ao menos uma amostra de solo positiva para formas evolutivas de protozoários e helmintos, sem grandes variações nos números absolutos e nos locais coletados, conforme demonstrado na Tabela 2.

Ovos de *Trichuris* sp. com tamanho de 76 x 32 µm, compatíveis com *T. vulpis* (parasito de canídeos) ou *T. campanula* (parasito de felídeos), foram evidenciados em amostras no posto de saúde de Sapukai e na escola em Araponga, e indicaram a ocorrência de contaminação do solo por fezes de cães e gatos domésticos que circulam nessas aldeias ou de canídeos ou felídeos silvestres oriundos da mata. A detecção de ovos de *Trichuris* sp. também foi relatada por Tavares et al²⁸, pesquisando solo de praças públicas na cidade Pelotas, RS.

Larvas de nematódeos foram isoladas em todas as aldeias e ovos de nematódeos foram evidenciados somente no módulo sanitário de Paraty Mirim e no de Sapukai Cacique. A morfologia dessas larvas não foi avaliada, bem como a identificação do gênero, sendo somente observada a presença para possível verificação das condições ambientais quanto ao desenvolvimento de geo-helmintos. Os resultados obtidos permitiram afirmar que o solo das aldeias é favorável à manutenção e ao desenvolvimento de nematódeos de vida livre ou parasitos denominados de geo-helmintos.

Ovos férteis de ascarídeo com mensuração compatível com *Ascaris* sp. foram detectados apenas nas amostras de solo do módulo sanitário do sistema Pupunha em Sapukai, em conformidade com os resultados verificados na avaliação de amostras de solo de praças públicas de Maringá feita por Tiyo et al²⁹ e em praças públicas da cidade do Rio de Janeiro feita por Souza et al³⁰. Os resultados obtidos neste estudo sugerem que esses ovos sejam de *A. lumbricoides*, espécie de nematódeo que parasita o ser humano e que a contaminação do solo ocorreu por fezes humanas, visto que a aldeia não possuía suínos, seja pelo uso do ambiente como sanitário por questões culturais, como pela limpeza inadequada dos módulos sanitários.

Poucas formas evolutivas de protozoários foram detectadas nas amostras de solo pelas técnicas microscópicas. Tal fato pode ter ocorrido devido a maior dispersão das formas evolutivas parasitárias no solo, bem como por alterações morfológicas na estrutura do protozoário por exposição a condições ambientais adversas por longo período e que dificultam a identificação microscópica. A detecção dos protozoários *G. lamblia*, *Cryptosporidium* sp. e *E. histolytica* foi possível por ensaio imunoenzimático. Esta metodologia não foi utilizada anteriormente em amostras de solo, segundo o referencial teórico pesquisado para realização deste estudo (Tabela 3).

A presença de protozoários e helmintos no solo das aldeias Guarani indicou contaminação fecal e risco de infecção para os indígenas, principalmente para as crianças que andam descalças, em concordância com estudo similar em comunidades indígenas no Distrito de Iauretê/AM, realizado por Rios et al³¹, no qual detectaram, em amostras obtidas por raspagem superficial do solo, ovos de *Ascaris* sp., *Trichuris* sp., cistos de *E. coli*, larvas de ancilostomídeos e cistos de outros protozoários.

Tabela 2. Frequência absoluta das amostras de solo positivas para protozoários e/ou helmintos detectados por técnicas microscópicas e imunoenzimáticas coletadas em quatro aldeias Guarani em Angra dos Reis e Paraty, RJ/Brasil

Aldeias	Locais de coleta	Número de amostras coletadas	Número de amostras positivas para protozoários e/ou helmintos
Araponga	Módulo Sanitário	4	2
	Escola	4	3
	Casa de reza	4	3
	Posto de Saúde	4	3
	Total	16	11
Rio Pequeno	Módulo Sanitário	4	3
	Escola	4	3
	Casa de artesanato	4	2
	Área de descanso	4	2
	Total	16	10
Paraty Mirim	Módulo Sanitário	4	
	Escola	4	2
	Casa de reza	4	1
	Área de descanso	4	2
	Total	16	7
Sapukai	Módulo Sanitário do sistema Cacique	4	3
	Escola	4	3
	Módulo Sanitário do sistema Pupunha	4	3
	Posto de Saúde	4	3
	Total	16	12
Total global de amostras		64	40

Tabela 3. Distribuição dos antígenos de protozoários detectados por técnicas imunoenzimáticas nas amostras de solo coletadas nos peridomicílios de quatro aldeias Guarani em Angra dos Reis e Paraty, RJ/Brasil

Amostras	Antígeno		
	<i>Entamoeba histolytica</i>	<i>Cryptosporidium</i> spp.	<i>Giardia lamblia</i>
Araponga	Módulo Sanitário	-	1
	Escola	-	-
	Casa de reza	1	-
	Posto de Saúde	-	-
Rio Pequeno	Módulo Sanitário	-	-
	Escola	2	1
	Casa de artesanato	1	-
	Área de descanso	-	-
Paraty Mirim	Módulo Sanitário	1	2
	Escola	1	-
	Casa de reza	-	1
	Área de descanso	1	1
Sapukai	Módulo Sanitário do Sistema Cacique	1	-
	Escola	1	1
	Módulo Sanitário do Sistema Pupunha	1	1
	Posto de Saúde	-	-

-:não foi detectado

CONCLUSÃO

A detecção de formas evolutivas de protozoários e helmintos em água de abastecimento e solo de peridomicílio nas quatro aldeias Guarani de Angra dos Reis e Paraty indicam a necessidade da implementação de ações educativas, que estimulem a participação de todos os sujeitos envolvidos, e de ações sanitárias. Essas ações poderão favorecer o empoderamento dos indígenas nas questões de saúde, possibilitando uma redução significativa da transmissão de enteroparasitoses, incluindo-se as de caráter zoonótico, onde se destaca o controle de animais que circulam nestas aldeias pelas entidades competentes em parceria com as comunidades indígenas residentes.

AGRADECIMENTOS

Aos Guaranis das aldeias de Sítio Rio Pequeno, Paraty Mirim, Araponga e Sapukai pela colaboração e ao setor de saneamento da Funasa pelo apoio logístico durante a realização da dissertação de mestrado que originou este artigo. Os autores agradecem ao técnico do Departamento de Ciências Biológicas – Fiocruz e a Dr^a Lea Ferreira Camillo Coura pela revisão crítica deste manuscrito.

REFERÊNCIAS

1. Karanis P, Kourenti C, Smith H. Waterborne transmission of protozoan parasites: A worldwide review of outbreaks and lessons learnt. *J Water Health*.2007;5(1):1-37.
2. Smith A, Reacher M, Smerdon W, Adak GK, Nichols G, Chalmers RM. Outbreaks of waterborne infectious intestinal disease in England and Wales, 1992-2003. *Epidemiol Infect*.2006;134:1141-9.
3. Craun MF, Craun GF, Calderon RL, Beach MJ. Waterborne outbreaks reported in the United States. *J Water Health*.2006;4(2):19-30.
4. Lechevallier MW, Norton W. Examining relationship between particle counts and *Giardia*, *Cryptosporidium* and turbidity. *J Am Water Works Assoc*.1992;84(12):54-60.
5. Santamaría J, Toranzos GA. Enteric pathogens and soil: a short review. *Int Microbiol*.2003;6:6-9.
6. Souza FD, Mamede-Nascimento TL, Santos CS. Encontro de ovos e larvas de helmintos no solo de praças públicas na zona Sul da cidade do Rio de Janeiro. *Rev Patol Trop*.2007;36(3):247-56.
7. Lima EC, Stamford TLM. *Cryptosporidium* spp. no ambiente aquático: aspectos relevantes da disseminação e diagnóstico. *Ciênc Saúde Coletiva*.2003;8(3):791-800.
8. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria 2914, de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 12 dez 2011.
9. Santos NM, Silva VMG, Thé TS, Santos AB, Souza TP. Contaminação das praias por parasitos caninos de importância zoonótica na orla da parte da cidade de Salvador – BA. *Rev Ciênc Med Biol*.2006;5(1):40-7.
10. Santos RV, Coimbra Jr. CEA. Cenários e tendências da saúde e da epidemiologia dos povos indígenas no Brasil. In: Coimbra Jr CEA, Santos RV, Escobar AL, organizadores. *Epidemiologia e Saúde dos Povos Indígenas no Brasil*, Rio de Janeiro: Editora Fiocruz e Abrasco 2003; p.13-47.
11. Diretoria de Assuntos Fundiários, Fundação Nacional do Índio. Memorial descritivo de demarcação. Brasília: Fundação Nacional do Índio, 1991. Disponível no acervo de documentos do Museu Nacional do Índio, Rio de Janeiro.
12. Diretoria de Assuntos Fundiários, Fundação Nacional do Índio. Memorial descritivo de demarcação – 16 de janeiro. Brasília: Fundação Nacional do Índio, 1995. Disponível no acervo de documentos do Museu Nacional do Índio, Rio de Janeiro.
13. Diretoria de Assuntos Fundiários, Fundação Nacional do Índio. Memorial descritivo de demarcação – 25 de agosto. Brasília: Fundação Nacional do Índio, 1995. Disponível no acervo de documentos do Museu Nacional do Índio, Rio de Janeiro.
14. Baermann G. Eine einfache Methode zur Auffindung von Ankylostomum- (Nematoden) – Larven in Erdproben. *Mededeel Mit H Geneesk. Lab Weltvreden Feestbundel*.1917;41-7.
15. Ritchie LS. An ether sedimentation technique for routine stool examinations. *Bull U S Army Med Dep*.1948;8(4):326.
16. Young KH, Bullock SL, Melvin DM, Spruill CL. Ethyl acetate as a substitute for diethyl ether in the formalin-ether sedimentation technique. *J Clin Microbiol*.1979;10(6):852-3.
17. Sheather LA. The detection of intestinal protozoa and mange parasites by a flotation technique. *J Comp Pathol Ther*.1923;36:266-75.
18. Huber F, Bomfim TC, Gomes RS. Comparação da eficiência da Técnica de Sedimentação pelo formaldeído-éter e da técnica de centrífugo-flutuação modificada na detecção de cistos de *Giardia* sp. e oocistos de *Cryptosporidium* sp. em amostras fecais de bezerros. *Rev Bras Parasitol Vet*.2003;12(2):135-7.
19. Carneiro LC. Estudo parasitológico em caixas d'água e torneiras residenciais na cidade de Morrinhos – GO. *Vita et Sanitas*.2009;3:110-21.
20. Cutolo SA, Rocha AA. Uso de parasitos como indicadores sanitários para análise da qualidade das águas de reuso. XXVII Congresso Interamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental. ABES – Associação Brasileira Engenharia Sanitária e Ambiental 3-8 Dez, Porto Alegre 2000; 1-7.
21. Fortes E. Protozoologia. In: Fortes E. *Parasitologia Veterinária 4ª ed*, Porto Alegre, Rio Grande do Sul: Editora Ícone.2004;47-138.
22. Januschka MM, Erlandsen SL, Bemrick WJ, Schupp DG, Feely DE. A comparison of *Giardia microti* and *Spironucleus muris* cysts in the vole: an immunocytochemical, light, and electron microscopic study. *J Parasitol*.1988;74(3):452-8.
23. Franco RMB. Protozoários de veiculação hídrica: relevância em saúde pública. *Rev Panam Infectol*.2007;9(4):36-43.

24. Sakano T, Hamamoto K, Kobayashi Y, Sakata Y, Tsuji M, Usui T. Visceral larva migrans caused by *Trichuris vulpis*. Arch Dis Child.1980;55:631-3.
25. Hall JE, Sonnenberg B. An apparent case of human infection with the whipworm of dogs, *Trichuris vulpis* (Froechich, 1789). J Parasitol.1956;42(2):197-9.
26. Heller L, Bastos RKX, Bevilacqua PD, Brito LLA, Mota SMM, Oliveira AA, et al. Oocistos de *Cryptosporidium* e cistos de *Giardia*: circulação no ambiente e riscos à saúde humana. Epidemiol Serv Saúde.2004;13(2):79-92.
27. Lechevallier MW, Norton W, Lee RG. Ocurrance of *Giardia* and *Cryptosporidium* sp in surface water supplies. Appl Environ Microbiol.1991;57(9):2610-6.
28. Tavares ALC, Scaini CJ, Müller G, Farias NAR, Berne MEA. Contaminação do solo de praças de conjuntos habitacionais por helmintos e protozoários em Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. Vittal.2008; 20(1):59-63.
29. Tiyo R, Guedes TA, Falavigna DLM, Guilherme-Falavigna AL. Seasonal contamination of public squares and lawns by parasites with zoonotic potential in southern Brazil. J Helminthol.2008;82:1-6.
30. Souza FD, Mamede-Nascimento TL, Santos CS. Encontro de ovos e larvas de helmintos no solo de praças públicas na zona Sul da cidade do Rio de Janeiro. Rev Patol Trop.2007;36(3):247-53.
31. Rios L, Cutolo AS, Giatti LL, De Castro M, Rocha AA, Toledo RF, et al. Prevalência de parasitos intestinais e aspectos socioambientais em comunidades indígenas no Distrito de Jauretê, município de São Gabriel da Cachoeira (AM), Brasil. Saúde Soc.2007;16(2): 76-85.

Qualidade físico-química da água de abastecimento da região do Vale do Ribeira-SP, Brasil

Physico-chemical characteristics of the public drinking water of the region of Vale do Ribeira, SP, Brazil

RIALA6/1546

Maria Anita SCORSAFAVA, Arlete de SOUZA, Monica STOFER, Claudete Azevedo NUNES, Thaís Valéria MILANEZ*

*Endereço para correspondência: Núcleo de Águas e Embalagens, Centro de Contaminantes, Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr. Arnaldo nº 355, CEP 01246-000, São Paulo, SP, Brasil. E-mail: aguas.ial@gmail.com

Recebido: 26.06.2012 - Aceito para publicação: 18.03.2013

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a qualidade físico-química da água de abastecimento para consumo humano da região do Vale do Ribeira, SP, Brasil, entre 2008 e 2010. Foram medidos os parâmetros ferro, turbidez, cor aparente, nitrato e avaliados segundo a Portaria nº 2.914/2011 do Ministério da Saúde. O fluoreto medido foi avaliado de acordo com a Resolução da Secretaria de Estado da Saúde SP 250/1995. Foram coletadas 1.254 amostras de águas de 15 municípios dessa região. Os resultados mostraram que 46 % das amostras estavam inadequadas para o consumo humano, principalmente pelos níveis de fluoreto, que é adicionado à água de abastecimento público para prevenir a cárie dentária. Observou-se que 42,7 % das amostras estavam fora da faixa recomendada (0,6 a 0,8 mg.L⁻¹). Turbidez, ferro e cor aparente acima dos valores máximos recomendáveis (VMR) pela legislação foram evidenciados, respectivamente, em 2,2 %, 6,1 % e 2,1 % das amostras. Nenhuma das amostras apresentou nitrato. À vista dos resultados obtidos, conclui-se que há necessidade de implementar o monitoramento da qualidade da água.

Palavras-chave. água, fluoreto, saúde pública, Vale do Ribeira, SP.

ABSTRACT

This study aimed at evaluating the physical-chemical quality of public water supply in the region of the Vale do Ribeira, SP, Brazil, from 2008 to 2010. The parameters analyzed were iron, turbidity, nitrate and apparent color that were evaluated according to the Decree n. 2914/2011 of the Brazilian Ministry of Health. The measured fluoride was evaluated according to the Regulation of the State Secretariat of Health of Sao Paulo SP 250/1995. A total of 1,254 water samples were collected from 15 municipalities of this region. The results showed that 46 % of samples were inadequate for consumption mainly because of the fluoride contents, which is added into public water supplies to prevent tooth decay. This study showed that 42.7 % of samples were in compliance with the recommended range (0.6 to 0.8 mg.L⁻¹). Turbidity, iron and apparent color above the maximum recommended values (MRV) were identified in 2.2 %, 6.1 % and 2.1 % of samples, respectively. No nitrate was detected in the analyzed samples. Based on these finding, it is needed to implement a program for monitoring public water supply in this region.

Keywords. water, fluoride, public health, Vale do Ribeira, SP.

INTRODUÇÃO

A água tem importância vital para todos os seres humanos e a avaliação de sua potabilidade é primordial para a saúde da população. A disponibilidade dos serviços de água (captação e tratamento) e também de esgoto (coleta e tratamento) podem ser considerados como indicadores sanitários. A água é considerada própria para o consumo humano quando seus parâmetros microbiológicos e físico-químicos atendem aos padrões de potabilidade estabelecidos atualmente pela Portaria nº 2.914/2011 do Ministério da Saúde (MS)¹.

O Vale do Ribeira é uma região que se estende ao sul do Estado de São Paulo e ao leste do Estado do Paraná e sua bacia, cuja extensão é de 28.306 km², sendo 17.115 km² no estado de São Paulo, possui alta disponibilidade hídrica². Segundo a Sabesp, na Unidade do Vale do Ribeira, capta-se água para o abastecimento tanto de mananciais superficiais, como de serra e também de subterrâneos². Essa região é composta por áreas de preservação ambiental e, em 1999, recebeu da Unesco o título de Patrimônio Natural, socioambiental e cultural da humanidade. O Vale do Ribeira é uma das regiões menos urbanizadas do estado de São Paulo, com população estimada em 400 mil habitantes, grande parte dela em áreas rurais, vivendo da agricultura (banana e chá), mineração e extrativismo vegetal (palmito)³. De acordo com o Sebrae⁴, o Vale do Ribeira atualmente se caracteriza pela grande concentração de pequenas propriedades (até 50 ha) que produzem além da banana e palmito, chá mate, arroz, milho, flores; há atividade de pesca de subsistência ao longo dos 140 km de extensão do Complexo Estuarino Lagunar de Iguape-Cananeia-Paranaguá⁴. Segundo Chabaribery et al⁵ a região apresenta carência na assistência médica e sanitária e deficiências no sistema público de esgoto, principalmente na área rural. Neste estudo, o foco foi a fluoretação da água, que tem impacto na prevenção e redução da incidência de cárie dentária. De acordo com o Centro de Controle de Doenças dos Estados Unidos, a fluoretação pode reduzir a incidência da cárie dentária de 18 % a 40 %, nas crianças, e aproximadamente 35 %, nos adultos⁶. A Portaria 635/1975 do Ministério da Saúde (MS)⁷ estabeleceu que a concentração de fluoreto deve estar de acordo com a média das temperaturas máximas diárias e a Resolução 250 de 1995 da Secretaria de Estado da

Saúde⁸ fixou para o Estado de São Paulo a faixa de 0,6 a 0,8 mg.L⁻¹ para fluoreto na água.

Nesse contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a qualidade físico-química da água de abastecimento para consumo humano da região do Vale do Ribeira baseando-se nos teores dos seguintes parâmetros: ferro, turbidez, cor aparente, nitrato e fluoreto.

MATERIAL E MÉTODOS

No período de 2008 a 2010 foram coletadas 1.254 amostras de águas de 15 municípios da região do Vale do Ribeira, sul do Estado de São Paulo/Brasil:

Cajati (latitude: -24.730 e longitude: -48.110), Itariri (latitude: -24.300 e longitude: -47.167), Cananeia (latitude: -25.017 e longitude: -47.950), Jiquiá (latitude: -24.317 e longitude: -47.633), Pedro de Toledo (latitude: -24.283 e longitude: -47.233); Pariqueira-Açu (latitude: -24.717 e longitude: -47.883), Iguape (latitude: -24.717 e longitude: -47.550), Ilha Comprida (latitude: -24.7313 e longitude: -47.5589), Jacupiranga (latitude: -24.699 e longitude: -48.004), Eldorado (latitude: -24.522 e longitude: -48.108), Miracatu (latitude: -24.283 e longitude: -47.467), Sete Barras (latitude: -24.383 e longitude: -47.917), Iporanga (latitude: -24.583 e longitude: -48.583), Barra do Turvo (latitude: -24.750 e longitude: -48.500) e Registro (latitude: -24.500 e longitude: -47.833).

A amostragem levou em consideração, entre outros, a densidade populacional, locais com grande afluência de público, de distribuição espacial de doenças de transmissão hídrica, locais estratégicos (hospitais, creches e escolas) de baixa pressão no sistema de distribuição⁹. As amostras foram coletadas pelas Vigilâncias Sanitárias Municipais de acordo com os requisitos básicos de coleta, transporte e acondicionamento que constam no Manual de Coleta, Conservação e Transporte de Amostras de Água do Centro de Vigilância Sanitária¹⁰.

Nas amostras, foram determinados ferro por espectrometria de absorção atômica, limite de quantificação do método (LQ) = 0,15 mg.L⁻¹; cor aparente por nefelometria; nitrato por espectrofotometria UV/VIS, LQ = 0,05 mg.L⁻¹; turbidez por turbidimetria, LQ = 0,1 uT e potenciometria com eletrodo seletivo para determinação de fluoreto, LQ = 0,15 mg.L⁻¹. Os métodos utilizados estão descritos no livro de Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz⁹.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos na análise das águas da região do Vale do Ribeira, no período 2008-2010, estão apresentados na Figura 1, que mostra os municípios em função da distribuição do total de amostras analisadas, satisfatórias e insatisfatórias.

Dentre os parâmetros avaliados, a turbidez e a cor são indicativas da presença de sólidos dissolvidos, em suspensão, ou material em estado coloidal, sejam eles orgânicos ou inorgânicos (areia, argila), porém muitas vezes eles podem estar relacionados com a elevada concentração de ferro¹². Neste levantamento não houve registro de amostras apresentando apenas turbidez, esta esteve sempre associada ao ferro e/ou cor. Todas as amostras com ferro e/ou cor e/ou turbidez apresentaram níveis acima dos valores máximos permitidos (VMP) pela Portaria nº 2.914/2011¹. Quanto ao nitrato, nenhuma das amostras apresentou teores acima de seu VMP, de 10 mg.L⁻¹ de nitrato em nitrogênio¹.

No total de 1.254 amostras, apenas 28 (2,2 %) apresentaram turbidez acima do VMP (5 uT)¹. O ferro esteve presente em 77 (6,1 %) das amostras de água avaliadas em valores acima do permitido (0,3 mg.L⁻¹)¹. Dessas 77 amostras, 21 delas também apresentaram turbidez em valores superiores aos da legislação e 27 com cor acima do VMP (15 uH)¹. O consumo excessivo de ferro pode causar uma doença chamada hemocromatose que se caracteriza pelo depósito deste metal nos tecidos de órgãos como fígado, pâncreas, coração e hipófise¹². A sua presença na água pode favorecer o desenvolvimento de ferro-bactérias, que não são prejudiciais à saúde, mas

dão cor e odor à água. Das fontes potenciais, o ferro pode ser proveniente tanto da má condição da bomba do poço (encanamento enferrujado) ou mesmo da própria natureza das rochas com a sua dissolução pelo gás carbônico da água. Nas águas superficiais, o ferro pode ocorrer com a erosão das margens ou ainda ser produto dos efluentes industriais da região¹².

As amostras com fluoreto abaixo e acima da faixa recomendada, 0,6 a 0,8 mg.L⁻¹, são consideradas insatisfatórias, segundo a Resolução nº 250⁸, de São Paulo. Neste estudo, o fluoreto foi o parâmetro com maior número de amostras em desacordo, média total de 42,7 % (Figura1). Na Tabela 1 estão as porcentagens das amostras insatisfatórias e os valores médios com desvio-padrão daquelas com teores inferiores a 0,6 mg.L⁻¹ e superiores a 0,8 mg.L⁻¹ para cada município. Miracatu, Eldorado, Sete Barras e Juquiá tiveram mais da metade das amostras analisadas insatisfatórias para fluoreto, sendo que Juquiá apresentou o maior índice de amostras insatisfatórias, 68,5 %, incluídas as amostras com falta e excesso de fluoreto na água de abastecimento. Foi o município que apresentou a maior porcentagem (17,1 %) de amostras com excesso de fluoreto; particularmente, em 2010, foram 14,3 %, com níveis de 0,9 a 1,5 mg.L⁻¹. A amostra com maior concentração de fluoreto, 1,94 mg.L⁻¹, foi encontrada em 2010, no município de Sete Barras. Amostras colhidas na saída de tratamento também apresentaram altos níveis de fluoreto, foram três: em Pariquera-açu 1,59 mg.L⁻¹, em 2009 e 1,71 mg.L⁻¹, em 2010 e uma de Registro, em 2010, 1,25 mg.L⁻¹.

O excesso de fluoreto é preocupante, pois pode causar a fluorose dentária (manchas esbranquiçadas

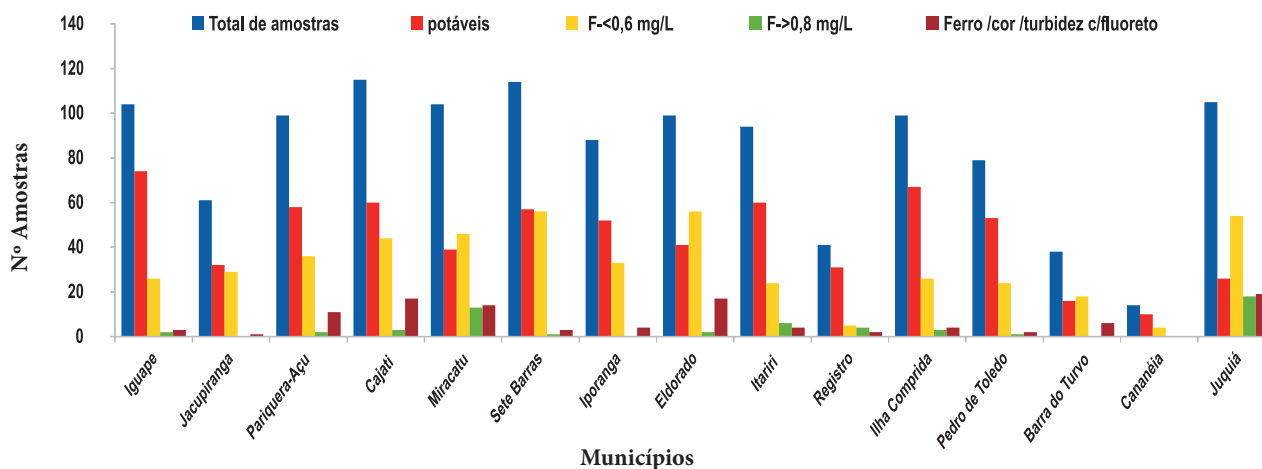


Figura 1. Avaliação da água de abastecimento da região do Vale do Ribeira, no período 2008-2010

Tabela 1. Porcentagem e média com desvio padrão das amostras dos municípios que apresentaram teor de fluoreto fora da faixa recomendada⁸ (0,6 - 0,8 mg.L⁻¹ F⁻)

Municípios	% amostras < 0,6 mg.L ⁻¹ F ⁻	Média ± dp das amostras < 0,6 mg.L ⁻¹ F ⁻	% amostras > 0,8 mg.L ⁻¹ F ⁻	Média ± dp das amostras > 0,8 mg.L ⁻¹ F ⁻
Barra do Turvo	47,3	0,45 ± 0,07	0,0	-
Cajati	38,3	0,45 ± 0,06	6,8	1,29 ± 0,33
Cananéia	28,6	0,34 ± 0,01	0,0	-
Eldorado	56,6	0,43 ± 0,10	2,0	1,52 ± 0,02
Iguape	25,0	0,50 ± 0,05	1,9	0,87 ± 0,02
Ilha Comprida	26,3	0,51 ± 0,02	3,0	1,01 ± 0,05
Iporanga	37,5	0,47 ± 0,08	0,0	-
Itariri	25,5	0,43 ± 0,13	6,4	1,11 ± 0,20
Jacupiranga	47,5	0,43 ± 0,11	0,0	-
Juquiá	51,4	0,37 ± 0,14	17,1	1,09 ± 0,22
Miracatu	44,2	0,39 ± 0,11	12,5	1,13 ± 0,22
Pariquera-açu	36,4	0,48 ± 0,06	2,0	1,79 ± 0,11
Pedro de Toledo	3,0	0,51 ± 0,02	1,3	0,89 ± 0,00
Registro	12,2	0,51 ± 0,03	9,8	1,14 ± 0,08
Sete Barras	49,1	0,47 ± 0,07	0,9	1,94 ± 0,00

F⁻ = fluoreto; dp = desvio padrão

nos dentes) principalmente em menores de oito anos de idade, que estão com esmalte dentário em formação; e até mesmo atingir o esqueleto quando a água de consumo apresentar de 3 a 6 mg de fluoreto/L¹³. Se a ocorrência de fluoreto for natural e estiver acima de 0,9 mg.L⁻¹, segundo o Decreto Federal 5440/2005¹⁴, os responsáveis pela distribuição devem alertar os consumidores.

As análises revelaram que são frequentes as amostras de água com concentração de fluoreto abaixo da faixa recomendada (Figura 1 e Tabela 1). Em Miracatu foram 44,2 %; em Eldorado foram 56,6 % e em Juquiá 51,4 % das amostras. Sete Barras apresentou 49,1 % das amostras em desacordo; em Jacupiranga foram 47,5 % e em Barra do Turvo 47,3 %. Iguape, Itariri e Registro apresentaram as menores porcentagens de desacordo.

Segundo a Sabesp, as estações de tratamento de água (ETA) do Vale do Ribeira são todas automatizadas – sistema Aqualog – que além de supervisionar as fases da produção de água, monitora e controla automaticamente bombas dosadoras de produtos químicos, entre eles o flúor, adicionado na forma de ácido fluorsilícico¹⁵. De acordo com Pestana¹⁶, a falta de treinamento do operador responsável, problemas no equipamento hidráulico e/ou variações no fluxo de água ao longo da rede de distribuição podem alterar os níveis de fluoreto, pois foi o que a autora observou estudando os teores de fluoreto na água de abastecimento apenas do município de Cananéia em 2010. Comparando a situação com levantamento realizado em 2007-2009 com os municípios das DIR III, IV e V observa-se que, de forma geral, os resultados do Vale do Ribeira são mais

impactantes¹⁷. Nos municípios da DIR III (região de Mogi das Cruzes), o desacordo quanto ao fluoreto foi de 16,8 %, mas observou-se que houve problemas pontuais como em Biritiba-Mirim e Santa Izabel, onde as maiores porcentagens de amostras insatisfatórias com os teores de fluoreto atingiram 51,2 % e 64 %, respectivamente¹⁷. Nos municípios da DIR IV (região de Franco da Rocha), apenas 7,8 % das amostras de água coletadas estavam insatisfatórias em relação ao teor de fluoreto. Na DIR V (região de Osasco), este percentual atingiu 12,3 %, mas dois municípios mostraram ter os maiores problemas de fluoretação: Juitituba, com 40,6 % de inadequação e São Lourenço, que atingiu 62,0 %, em 2008¹⁷.

Daré et al¹⁸ avaliaram de 2001 a 2005 o processo de fluoretação da água de abastecimento da região de Araçatuba e obtiveram resultados semelhantes aos nossos. De forma geral, aquela região apresentou 51,6 % de amostras fora da faixa, sendo 41 % abaixo e 11 % acima dela.

A fluoretação da água de abastecimento é eficaz na prevenção e redução da cárie dental de forma universal, quando é um processo contínuo e os níveis são mantidos dentro da faixa estabelecida¹⁹, o que não foi evidenciado neste estudo. A região do Vale do Ribeira é uma das regiões mais carentes do Estado de São Paulo³⁻⁵ e, de acordo com Barbato e Peres²⁰, a cárie dentária é mais prevalente, atinge mais pessoas e com gravidade, em grupos mais desfavorecidos, ou seja, aqueles que têm menos acesso e serviços assistenciais e preventivos, entre outros. Para tal, faz-se necessário um monitoramento, além do controle da própria empresa que faz a fluoretação. Isto no princípio do heterocontrole, pois segundo Narvai¹⁹, se um bem ou serviço implica risco ou representa fator de proteção para a saúde pública, então além do controle de produtos sobre o processo de produção, distribuição e consumo deve haver controle por parte das instituições do Estado¹⁹.

REFERÊNCIAS

1. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Diário Oficial [da] União. Brasília, DF, 04 jan 2012. Seção 1. p. 43.
2. Sabesp. Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo. [acesso 2012 Mai 04] Disponível em: [http://site.sabesp.com.br/site/interna/resultado-busca.aspx?q=vale%20do%20ribeira].
3. Hogan DJ, Carmo RL, Alves HPF, Rodrigues IA. Sustentabilidade no Vale do Ribeira (SP): conservação ambiental e melhoria das condições de vida da população. [acesso 2011 Nov 21]. Disponível em: [http://www.nepo.unicamp.br/textos/publicacoes/livros/migracao_ambiente/01pronex_08_sustentabilidade_no_vale_do_ribeira.pdf].
4. Fundação Sistema Estadual de Análise de Dados – Seade. [acesso 2013 Abr 04]. Disponível em: [http://www.seade.gov.br/produtos/imp/index.php?page=consulta&action=var_list&tabs=2&busca=A%&aba=tabela3].
5. Chabaribery D, Romão DA, Burnier DMF, Pereira LB, Matsumoto M, Carvalho M, et al. Desenvolvimento Sustentável da bacia do Ribeira de Iguape: diagnóstico das condições socioeconômicas e tipificação dos municípios. *Inf Econ*.2004;34(9):57-89.
6. Centers for Disease Control and Prevention – CDC. Nature's way to prevent tooth decay – Water Fluoridation. 2006. [acesso 2012 mai 04]. Disponível em: [http://www.cdc.gov/fluoridation/pdf/natures_way.pdf].
7. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria 635 de 26 de dezembro de 1975. Aprova normas e padrões sobre a fluoretação da água de sistemas públicos de abastecimento. Diário Oficial [da] União. Brasília, DF, 30 jan. 1976. [acesso 2011 Nov 21]. Disponível em: [http://189.28.128.100/dab/docs/legislacao/portaria635_26_12_75.pdf].
8. São Paulo. Resolução SS-250 de 15/08/1995. Define teores de concentração do íon fluoreto nas águas para consumo humano, fornecidas por sistemas públicos de abastecimento. Diário Oficial [do] estado de São Paulo, 16 ago 1995. Seção 1.
9. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação Geral de Vigilância em Saúde Ambiental. Diretriz Nacional do Plano de Amostragem da Vigilância Ambiental em Saúde relacionada à Qualidade da Água para Consumo Humano Vigiágua. Brasília, DF, maio 2005. [acesso 2010 Out 21]. Disponível em: [www.saude.mt.gov.br/.../diretriz-nacional-do-plano-de-amostragem-do-vigiagua-%5B54-090709-SES-MT%5D.pdf].
10. São Paulo. Secretaria de Estado da Saúde. Centro de Vigilância Sanitária. Manual de Coleta, Conservação e Transporte de Amostras de Água. [citado 2010 Out 22]. [acesso 2011 Nov 21]. Disponível em: [http://www.cvs.saude.sp.gov.br/download.asp?tipo=zip&arquivo=man_coleta.zip].
11. Instituto Adolfo Lutz (São Paulo-Brasil). Métodos físicos-químicos para análise de alimentos: normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. 4ª ed. Brasília (DF), ANVISA; 2005.
12. Batalha BHL, Parlatore AC, editores. Controle da qualidade da água para consumo humano. Bases Conceituais e Operacionais. São Paulo: CETESB; 1993.
13. Fawell J, Bailey K, Chilton J, Dahi E, Fewtrell L, Magara Y, editors. Fluoride in Drinking-water. World Health Organization/WHO Drinking-water Quality Series. London:World Health Organization; 2006.
14. Presidência da República. Casa Civil. Decreto Federal nº 5.440 de 04 de maio de 2005. Estabelece definições e procedimentos sobre o controle de qualidade da água de sistemas de abastecimento e institui mecanismos e instrumentos para divulgação de informação ao consumidor sobre a qualidade da água para consumo humano. Diário Oficial [da] União. Brasília, DF, 05 mai 2005. [acesso 2012 Jun 06]. Disponível em: [http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2004-2006/2005/Decreto/D5440.htm].
15. Sabesp. Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo. [acesso 2012 jun 06]. Disponível em: [http://site.sabesp.com.br/site/interna/Default.aspx?secaoId=8].

16. Pestana SRCC. Análise dos teores de flúor da água de abastecimento público do município de Cananeia – São Paulo, Brasil. [dissertação de mestrado]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2012.119p. [acesso 2012 Jun 11]. Disponível em: [<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/23/23148/tde-08052012-163158/pt-br.php>].
17. Scorsafava MA, Souza A, Sakuma H, Stofer M, Nunes CA, Milanez TV. Avaliação da qualidade da água de abastecimento no período 2007-2009. *Rev Inst Adolfo Lutz*.2011;70(3):395-403.
18. Daré F, Dall'Aglio Sobrinho M, Libânio M. Avaliação do processo de fluoretação nos sistemas de abastecimento da água da região de Araçatuba, São Paulo. *Eng Sanit Ambient*.2009;14(2):173-82.
19. Narvai PC. Cárie dentária e flúor: uma relação do século XX. *Ciênc Saúde Coletiva*.2000;5(2):381-92.
20. Barbato PR, Peres MA. Perdas dentárias em adolescentes brasileiros e fatores associados: estudo de base populacional. *Rev Saúde Pública*.2009;43(1):13-25.

Elaboração tecnológica e aceitação sensorial de bebida isotônica orgânica de tangerina (*Citrus reticulata* Blanco)

Development of an isotonic organic tangerine beverage (*Citrus reticulata* Blanco) and its sensorial acceptance

RIALA6/1547

Eliana de Souza Marques dos SANTOS*, Rômulo Manoel ALVES, Carla de Souza LIMA

*Endereço para correspondência: Setor de Agroindústria, Instituto Federal do Rio de Janeiro, Campus Nilo Peçanha, Rua José Breves, 550, Centro, Pinheiral, RJ, Brasil. CEP 27197-000. Tel: (24) 3356-6591. E-mail: eliana.santos@ifrj.edu.br
Recebido: 29.09.2012 - Aceito para publicação: 28.03.2013

RESUMO

Neste estudo, foi desenvolvida a bebida isotônica orgânica de tangerina. Após uma sequência de testes, foram obtidas três diferentes formulações de bebida isotônica, contendo diferentes concentrações de suco de tangerina orgânico: F1= 15 %, F2=10 % e F3=5 %. As bebidas foram pasteurizadas e armazenadas em embalagens plásticas à temperatura de ± 4 °C até o seu consumo. As três bebidas foram submetidas a testes de sólidos totais, acidez titulável, potencial de hidrogênio (pH) e valor osmótico. Foram realizadas análises microbiológicas iniciais de coliformes totais e fecais, e de bactérias aeróbicas mesófilas, bolores e leveduras para avaliar a estabilidade microbiológica das três bebidas durante 30 dias, conservadas a ± 4 °C. Os testes sensoriais foram realizados com 30 praticantes de atividade física, de ambos os sexos e de 18 a 40 anos de idade. As bebidas apresentaram níveis adequados de sólidos solúveis, acidez e pH, assim como nos resultados microbiológicos. Por meio de testes sensoriais, foi apontada a preferência dos consumidores para a bebida com maior teor de suco de tangerina (F1=15 %), o que indica a possível viabilidade comercial pelo seu melhor desempenho em relação à marca comercial para os atributos avaliados.

Palavras-chave. suco de fruta, isotônico, orgânico, análise sensorial.

ABSTRACT

This study aimed at developing an isotonic organic tangerine beverage. After performing a sequence of tests, three formulations of isotonic beverage were prepared, by using different concentrations of organic tangerine juice: F1=15 %, F2=10 % and F3=5 %. The beverages were pasteurized and stored in plastic containers at ± 4 °C until being consumed. The three beverages were analyzed to determine the total solids, acidity, potential of hydrogen (pH) and osmotic value. The initial microbiological analyses were performed for total and fecal coliforms; and mesophilic aerobic bacteria, yeasts and molds for assessing the microbiological stability of three beverages for 30 days at ± 4 °C. The sensorial characteristics were evaluated by 30 persons practicing physical activity, of both sexes and aged from 18 to 40 years. The beverages showed appropriate soluble solids contents, acidity and pH, and microbiological quality. By means of sensory testing, the consumers chose the beverage containing the highest concentration of tangerine juice (F1=15 %). The formulated beverages showed commercial potential, demonstrating the feasibility of developing an organic beverage.

Keywords. fruit juice, isotonic, organic, sensory analysis.

INTRODUÇÃO

Isotônicos ou repositores hidroeletrólíticos são bebidas especialmente formuladas para praticantes de atividades físicas, com o objetivo de reposição hídrica e eletrolítica¹. A bebida isotônica é a que apresenta concentração de substâncias ou minerais semelhantes à encontrada nos fluidos orgânicos, permitindo agilidade de absorção e, conseqüentemente, rápida hidratação após seu consumo².

Tradicionalmente, os isotônicos são preparados utilizando-se corantes e aromatizantes artificiais, além de conservadores³. De acordo com estes autores, na conservação das bebidas isotônicas podem ser considerados quatro obstáculos atuantes, isolada ou conjuntamente, que garantem a estabilidade e segurança microbiológica do produto, sendo elas a alta acidez (pH < 4,6), o tratamento térmico (pasteurização), a adição de conservadores químicos e a assepsia e adequação da embalagem.

A adição de sucos de frutas orgânicas na produção de isotônicos traz inúmeras vantagens que vão desde o incremento nutritivo ao maior sabor à bebida.

As tangerinas fazem parte da dieta dos brasileiros. Além de serem importante fonte de vitaminas e fibras, recentemente vêm sendo reconhecidos por conterem metabólitos secundários incluindo antioxidantes como ácido ascórbico, compostos fenólicos, flavonoides, limonoides que são importantes para a nutrição humana, apresentando assim grande potencial no incremento da bebida isotônica⁴. Segundo Gouveia⁵, a tendência atual é uma alimentação saudável, com substituição de alimentos convencionais por orgânicos, o que fez ter aumentado a procura por esses alimentos livres de agrotóxicos, hormônios e aditivos químicos artificiais, principalmente pelo público praticante de esporte, o qual apresenta a preocupação com a alimentação e hábitos saudáveis.

A agricultura orgânica exclui a adoção de agroquímicos, bem como de todo e qualquer tipo de material que possa produzir no solo funções estranhas às desempenhadas pelo ecossistema. Por meio de agricultura orgânica, procura-se utilizar os recursos locais, na busca de se obter a máxima reciclagem dos nutrientes existentes⁶.

No cenário brasileiro, os alimentos orgânicos vêm aumentando sua participação em termos de produção, comercialização e consumo. A expressiva e

rápida elevação da demanda interna, impulsionada pelo crescente número de consumidores que têm procurado alimentos mais saudáveis, de melhor sabor e que preservem o meio ambiente, sinalizam para o aumento do consumo interno e da produção nacional⁷.

Segundo o Projeto Organics Brasil, que reúne empresas exportadoras de produtos e insumos orgânicos, o mercado de orgânicos em geral cresceu 40 % em 2010 e a expectativa é de ampliação nas vendas domésticas com as novas regras para produção. Da mesma forma, o mercado externo de orgânicos também cresceu em 2010⁸. Atualmente, entre os principais produtos orgânicos do Brasil, destacam-se: açúcar mascavo, café, cereais (milho, arroz, trigo), dendê, erva-mate, frutas como o caju, banana e citros como a tangerina, hortaliças, leguminosas (feijão, amendoim), plantas medicinais e soja⁹.

O objetivo deste trabalho foi elaborar uma bebida isotônica orgânica de tangerina e caracterizar suas propriedades físico-químicas, sensorial e microbiológica comparando com a bebida isotônica comercial sabor tangerina.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

As frutas foram adquiridas nos meses de junho e julho em uma propriedade rural, a qual produz alimentos orgânicos, localizada na cidade de Pinheiral, no Sul Fluminense/RJ. Os demais ingredientes utilizados no preparo da bebida foram açúcar cristal orgânico (Native®), citrato de sódio dihidratado (Quimesp Química Ltda), cloreto de sódio (Cisne®), maltodextrina sem sabor (Peter Food®) e ácido cítrico anidro (Quimesp Química Ltda). A água utilizada no preparo da bebida foi deionizada em laboratório de bioquímica.

Formulação e preparo da bebida

O preparo da formulação base da bebida isotônica procedeu-se por dissolução dos ingredientes em água deionizada, a saber: 40 g de sacarose, 0,2 g citrato de sódio, 22 g de maltodextrina sem sabor e 0,7 g de ácido cítrico para cada litro da bebida. A partir da formulação base foram preparadas três formulações de bebida isotônica com diferentes concentrações de suco de tangerina orgânico, a saber: F1=15 %, F2=10 % e F3=5 % de suco de tangerina orgânico. A formulação e preparo da bebida isotônica foram realizados na planta piloto de agroindústria do Instituto Federal do

Rio de Janeiro, campus Nilo Peçanha/RJ (IFRJ-CANP). Posteriormente, as formulações foram submetidas à pasteurização lenta (66 °C/30 min) em cubas de alumínio, sob agitação manual e em banho-maria com um termômetro acoplado. O envase foi realizado com a bebida ainda quente em embalagens plásticas sanitizadas, as quais foram vedadas e submetidas ao resfriamento em água clorada a 30 °C. Posteriormente, as garrafas que não foram submetidas às análises sensorial, microbiológica (em tempo zero) e físico-química foram armazenadas por 30 dias, sob temperatura ± 4 °C para a realização das análises de estabilidade microbiológica.

Características físico-químicas da bebida isotônica

A determinação do teor de sólidos solúveis totais das três formulações foi realizada utilizando um refratômetro manual e sua leitura foi dada em °Brix. O teor total de acidez titulável (ATT) foi determinado por titulação com solução de hidróxido de sódio 0,1 N padronizada. O potencial de hidrogênio (pH) foi obtido pelo uso de potenciômetro digital (marca Digimed, modelo DM-22). Todas as análises foram realizadas em triplicata. Os dados foram tabulados e analisados por ANOVA e teste de Tukey para comparação de médias ($p < 0,05$), utilizando o programa BIOESTAT 2.0.

Analisou-se também a eficiência da bebida isotônica com relação ao seu valor osmótico em osmômetro de pressão de vapor. Assim, após confirmação dos níveis de osmolalidade de todas as bebidas estarem entre 270 a 300 mOsm/L¹⁰ procedeu-se com os testes sensoriais.

Estudo sobre a estabilidade microbiológica das bebidas isotônicas orgânica de tangerina

Para o estudo da qualidade microbiológica das bebidas F1, F2 e F3, foram realizadas análises microbiológicas iniciais de coliformes totais e coliformes fecais. Para o estudo da estabilidade microbiológica das três bebidas isotônicas, as mesmas foram submetidas à análise microbiológica de bactérias aeróbicas mesófilas, bolores e leveduras, sendo estas avaliadas em tempo zero, 15 e 30 dias de armazenamento sob a temperatura de ± 4 °C.

Teste sensorial de aceitação das bebidas isotônicas

As três bebidas formuladas neste estudo foram avaliadas sensorialmente no tempo zero, ou seja, imediatamente após o processamento. Uma quarta

amostra de bebida isotônica de marca comercial com sabor e aroma artificial de tangerina foi analisada juntamente com as três formulações propostas neste estudo.

Os testes de aceitação foram realizados por 30 consumidores, voluntários, de ambos os sexos e com idade entre 18 e 40 anos, praticantes de atividade física e habituados ao consumo de isotônicos. Cada consumidor recebeu de forma monádica as quatro amostras da bebida em copos descartáveis e codificados com números de três dígitos à temperatura de ± 4 °C. Utilizou-se a escala hedônica não estruturada de nove centímetros ancorada em seus extremos “desgostei extremamente” a “gostei extremamente”. Ao fim do teste sensorial, os dados foram tabulados e analisados por ANOVA e teste de Tukey para comparação de médias ($p < 0,05$), utilizando o programa BIOESTAT 2.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise físico-química

Na Tabela 1, estão apresentadas as médias e desvios padrões das características físico-químicas das bebidas isotônicas orgânica de tangerina. Conforme observado, o °Brix de todas as bebidas ficou entre 5,79 a 5,91 não diferindo significativamente entre si ($p < 0,05$). O °Brix presente na bebida isotônica expressa a quantidade de sólidos solúveis totais presentes no produto, constituindo numa relação importante para a qualidade do produto final. De Marchi et al¹¹ avaliaram o teor de °Brix em isotônico natural de maracujá, tanto na bebida fresca como na pasteurizada (92 °C/4 seg.) e constataram não haver alteração nos valores finais de °Brix entre os dois tipos de processamento, o que indica que o método de pasteurização não interfere na manutenção da qualidade final da bebida em níveis de sólidos e solúveis. Com relação à acidez titulável, expressa em porcentagem de ácido cítrico por 100 mL de isotônico, observou-se que todas as amostras não diferiram estatisticamente ($p < 0,05$) entre si, apresentando níveis de acidez entre 0,13 a 0,21 %. Os valores do °Brix e de acidez titulável estão próximos aos valores encontrados na bebida isotônica desenvolvida no estudo de Petrus e Faria³, variando entre 5,9 a 6,8 °Brix e 0,1 % de acidez titulável.

Em relação ao pH das bebidas, observou-se que todas apresentaram níveis desejáveis de pH entre 3,1 e 3,3. Analisando os valores de pH obtidos para as bebidas isotônicas, observa-se que todas as amostras tiveram seus

pH abaixo de 4,0. Esse valor de pH garante a segurança da bebida, a qual não se encontra susceptível à proliferação de bactérias patogênicas, inclusive *Clostridium botulinum*, pois o pH mínimo para multiplicação das cepas varia entre 4,8 e 5,0¹². Os valores de pH encontrados neste estudo estão de acordo com os resultados de pH obtidos nos estudos de Petrus¹³ e De Marchi et al¹¹ para bebidas isotônicas.

Tabela 1. Características físico-químicas das bebidas isotônicas de tangerina orgânica

Parâmetros avaliados	Tipos de bebidas isotônicas		
	F1=15 %ST	F2=10 %ST	F3=5 %ST
°Brix	5,91 ± 0,11 ^a	5,90 ± 0,15 ^a	5,79 ± 0,01 ^a
Acidez titulável (%)	0,21 ± 0,01 ^a	0,17 ± 0,13 ^a	0,13 ± 0,01 ^a
pH	3,2 ± 0,00 ^a	3,3 ± 0,05 ^a	3,1 ± 0,01 ^a

Médias seguidas pela mesma letra, na respectiva linha, indicam não haver diferença significativa entre os resultados, a 5 % de probabilidade, pelo Teste de Tukey; e ± desvio padrão

Análise microbiológica

Os resultados microbiológicos de coliformes totais e coliformes fecais, bolores e leveduras apresentaram ausência de elementos em todas as amostras e em todos os tempos de armazenamento. Os resultados microbiológicos de bactérias aeróbicas mesófilas das três bebidas estudadas apresentaram em todos os tempos avaliados valores inferiores a 2 UFC/mL. Ressalta-se que não há portaria que estabelece padrões microbiológicos para repositores hidroeletrólitos. Entretanto, a Portaria 451/97, do Ministério da Saúde¹⁴, estabelece os valores máximos permitidos de 10⁴ UFC/mL para a contagem de bolores e leveduras e de 1 NMP/g para coliformes totais pautados aos sucos concentrados adicionados ou não de conservadores. Desta forma, os resultados demonstraram qualidade microbiológica favorável, evidenciando boas condições higiênico-sanitárias em todas as etapas de processamento, assim como estabilidade microbiológica quanto ao crescimento de microrganismos em 30 dias, uma vez que a principal matéria-prima foi o suco natural de tangerina. Estudo semelhante foi realizado por Martins et al¹⁵, no qual os autores elaboraram um isotônico à base de fruta e hortaliças. O presente estudo obteve estabilidade microbiológica no tempo de prateleira de até 30 dias utilizando o congelamento. Desta forma, posteriores estudos poderão ser realizados com isotônicos à base de frutas *in natura*, avaliando tempo maior de estocagem.

Análise sensorial de aceitação

Na Tabela 2 estão apresentadas a média e desvio-padrão de aceitação do consumidor para as bebidas isotônicas orgânica de tangerina e bebida isotônica comercial. Pode-se observar que, quanto ao atributo aroma, a bebida F1 obteve maior média (7,47 = gostei moderadamente) em relação às demais bebidas analisadas, as quais obtiveram médias inferiores a 7,0 da escala hedônica. Já as amostras F2, F3 e F4 apresentaram médias inferiores, demonstrando aroma pouco aceitável.

Com relação ao atributo cor, observou-se que todas as bebidas não diferiram significativamente ($p < 0,05$). Embora a amostra F1 tenha obtido média superior a 6,0, de acordo com a escala hedônica, a mesma não apresentou diferença estatística das amostras F2, F3 e F4, as quais não agradaram os consumidores em relação à cor, obtendo médias 5,23; 4,9 e 5,39, respectivamente. A cor, no entanto, mostrou-se variada de acordo com a porcentagem de fruta utilizada na formulação, ou seja, as bebidas com maior quantidade do teor de fruta obtiveram resultados melhores.

Quanto ao sabor, foi observado que a amostra de maior aceitação foi a bebida F1, ou seja, a bebida com o maior teor de suco de tangerina natural, entretanto, a mesma não diferiu significativamente da bebida comercial avaliada. É importante ressaltar que esta bebida foi constituída de produtos naturais e orgânicos. Tradicionalmente, os isotônicos têm sido preparados utilizando-se corantes e aromatizantes artificiais, além de conservadores¹¹. As bebidas F2 e F3 não diferiram entre si, sendo classificadas pelos consumidores como “nem gostei, nem desgostei”.

Quando avaliada a qualidade global das quatro bebidas estudadas, observou-se que a bebida F1, mais uma vez, obteve maiores médias de suas notas em relação às demais bebidas, embora não tenha diferido estatisticamente da amostra da bebida comercial (F4) e da bebida F2. Ressalta-se que a bebida isotônica comercial usufrui da utilização de corantes e aromatizantes, podendo chamar mais a atenção visual do consumidor. A bebida F3 diferiu de todas as outras obtendo a classificação sensorial “nem gostei, nem desgostei”, ou seja, foi indiferente quando analisados pelos consumidores.

Martins et al¹⁵ realizaram análise sensorial de aceitação para dois tipos de bebida isotônica elaborada com suco concentrado de frutas e hortaliças sendo avaliados os atributos de cor, odor, sabor, textura e aspecto global. Ambas as bebidas isotônicas obtiveram notas mínima em torno de 4,92 e máxima de 6,78

Tabela 2. Aceitação do consumidor para as bebidas isotônicas de tangerina orgânica e bebida isotônica comercial

Parâmetros avaliados	Tipos de bebidas isotônicas			
	F1=15 %ST	F2=10 %ST	F3=5 %ST	F4 (Isotônico comercial)
Aroma	7,47 ± 1,11 ^a	6,23 ± 0,98 ^b	5,71 ± 1,81 ^b	6,35 ± 1,05 ^b
Cor	6,09 ± 1,87 ^a	5,23 ± 2,01 ^a	4,9 ± 2,37 ^a	5,39 ± 2,37 ^a
Sabor	7,72 ± 1,03 ^a	5,97 ± 1,42 ^b	5,78 ± 1,82 ^b	6,94 ± 0,90 ^a
Qualidade Global	7,64 ± 1,11 ^a	6,14 ± 1,30 ^a	5,45 ± 1,93 ^b	6,65 ± 1,23 ^a

Escores: 1 = desgostei extremamente, 5 = nem gostei, nem desgostei, 9 = gostei extremamente; Médias seguidas pela mesma letra, na respectiva linha, indicam não haver diferença significativa entre os resultados, a 5 % de probabilidade, pelo Teste de Tukey; e ± desvio padrão

para todos os atributos, não diferindo estatisticamente ($p < 0,05$).

Foi observado que a bebida F1 foi a melhor avaliada em todos os atributos (sabor, aroma, cor e qualidade global). A bebida F4, representada pela amostra comercial, obteve médias pouco inferiores à bebida F1. Já as bebidas F3 e F2 apresentaram perfis sensoriais semelhantes.

De modo geral, os resultados encontrados no presente estudo sugerem que a amostra F1, com maior teor do suco de tangerina *in natura* (15 %) obteve, na maioria dos parâmetros avaliados, médias de notas superiores a todas as outras bebidas estudadas, podendo ser classificada como a bebida isotônica de maior preferência segundo o julgamento dos consumidores. Estudos realizados por Dr ¹¹ revelaram por meio de estudos sensoriais com bebidas isotônica natural de maracujá boa aceitação por parte dos consumidores quando estocadas por até 141 dias sob conservação em refrigeração e aceitação às bebidas isotônicas naturais quando estocadas à temperatura ambiente num período máximo de 30 dias.

CONCLUSÃO

Os resultados das análises físico-químicas e microbiológicas estão de acordo com os parâmetros para a bebida isotônica, sendo o produto formulado seguro ao consumo humano.

A avaliação da análise sensorial demonstrou que houve boa aceitação da bebida com maior teor do suco de tangerina *in natura* (ou seja, 15 %). Com isso, mostra-se a possibilidade da utilização de um isotônico à base de fruta orgânica, sendo direcionado a atletas que querem tornar sua vida ainda mais natural pelo consumo de alimentos com nível reduzido de aditivos e agrotóxicos.

REFERÊNCIAS

1. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº 222, de 24 de março de 1998. Aprova o Regulamento Técnico referente a Alimentos para Praticantes de Atividade Física. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 24 mar. 1998.
2. Varnam AH, Sutherland JP. Technology, chemistry and microbiology. v.2. London: Chapman & Hall;1994.
3. Petrus RR, Faria JAF. Processamento e avaliação de estabilidade de bebida isotônica em garrafa plástica. *Ciênc Tecnol Aliment*.2005;25(8):518-24.
4. Jayaprakasha GK, Patil BS. In vitro evaluation of the antioxidant activities in fruit extracts from citron and blood orange. *Food Chem*.2007;101(1):410-8.
5. Gouveia F. Indústria de alimentos: no caminho da inovação e de novos produtos. *Inov Uniemp*.2006;2(5):32-7. [acesso 2013 jan 10]. Disponível em: [http://inovacao.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1808-23942006000500020&lng=es].
6. Santos JO, Santos RMS, Borges MGB, Ferreira RTFV, Salgado AB, Segundo OAS. A evolução da agricultura orgânica. *Rev Bras Gest Ambient*.2012;6(1):35-41.
7. Nascimento KO, Marques EC, Costa SRR, Takeiti CY, Barbosa MINJ. A importância do estímulo à certificação de produtos orgânicos. *Acta Tecnol*.2012;7(2):55-64.
8. Brazilian Organic and Sustainable Producers – Organics Brasil. Os orgânicos conquistam consumidores e ganham força nas prateleiras do mundo. [acesso 2013 jan 10]. Disponível em: [http://www.organicsbrasil.org/sou-imprensa-producaoorganica].
9. Kathounian CA. A reconstrução ecológica da agricultura. Botucatu(SP): Agroecológica;2010.
10. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Alimento para Atletas (Brasília - Brasil). Consulta Pública nº60, de 13 de novembro de 2008. Brasília (DF): ANVISA; 2008. 7F. [acesso 2012 set 19]. Disponível em: [http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP%5B24416-1-0%5D.PDF].
11. De Marchi R, Monteiro M, Cardello HMAB. Avaliação da Vida-de-Prateleira de um Isotônico Natural de Maracujá (*Passiflora edulis Sims. f. flavicarpa* Deg.). *Braz J Food Technol*.2003;6:291-300.
12. Banwart GJ. Basic food Microbiology. 2ª ed. New York:VN Rheinhold; 1989.
13. Petrus RR. Desenvolvimento de processo e avaliação de estabilidade de bebida isotônica acondicionada em garrafa

- asséptica [dissertação de mestrado]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas;2000.
14. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº 451, de 19 de setembro de 1997. Aprova Regulamento Técnico Princípios Gerais para o Estabelecimento de Critérios e Padrões Microbiológicos para Alimentos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 19 set. 1997. Seção I, p.21005-12.
15. Martins RC, Chiapetta SC, Paula FD, Gonçalves ECBA. Avaliação da vida de prateleira de bebida isotônica elaborada com suco concentrado de frutas e hortaliças congelado por 30 dias. *Alim Nutr*.2011;22(4):623-29.

Microbiota contaminante em bebidas lácteas fermentadas comerciais

Contaminant microbiota in commercial fermented dairy beverages

RIALA6/1548

Janaína Alves dos REIS*, Ana Lúcia Barretto PENNA, Fernando Leite HOFFMANN

*Endereço para correspondência: IBILCE, Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”/UNESP. Rua Cristóvão Colombo, 2265, Jd. Nazareth, CEP 15054-000, São José do Rio Preto, SP, Brasil. E-mail: reisja@yahoo.com.br

Recebido: 26.07.2012 - Aceito para publicação: 18.03.2013

RESUMO

Nos últimos anos, houve aumento da popularidade das bebidas lácteas fermentadas em virtude de benefícios nutricionais, praticidade de seu consumo e baixo custo do produto para o fabricante e consequente redução do preço final para o consumidor. Durante o processo de fabricação, estes produtos podem estar sujeitos a fontes de contaminação microbiana. Neste estudo foi investigada a microbiota contaminante em bebidas lácteas fermentadas produzidas por pequenas e médias empresas, empregando-se análises de contagem de fungos filamentosos e leveduriformes, determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e termotolerantes, pesquisa de *Escherichia coli* e de *Salmonella* spp. e determinação dos valores de pH. Apesar de ausência de *Salmonella* spp., houve elevada frequência de fungos filamentosos e leveduriformes, tendo sido detectada *E. coli* em cinco amostras (16,67 %); e as amostras foram classificadas como “produtos em condições sanitárias insatisfatórias”. Por conseguinte, sugere-se que programas de qualidade, como as Boas Práticas de Fabricação (BPF) e Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) sejam introduzidas e empregadas pelos produtores de alimentos, para prevenir riscos de contaminação, a fim de oferecer produtos seguros para o consumidor.

Palavras-chave. qualidade microbiológica, produtos lácteos, coliformes, fungos filamentosos e leveduriformes.

ABSTRACT

Lately, the acceptability of fermented dairy beverages has been increased, due to the nutritional benefits, the practical consumption and the low cost of product for the manufacturers, and consequently for final market price to the consumers. During the manufacturing process, these products can be susceptible to microbiological contamination. The present study investigated the contaminant microbiota in fermented dairy beverages produced by small- and medium-sized companies, by means of analyses on moulds and yeasts counting, determination of the Most Probable Number (MPN) of total and thermo tolerant coliforms, *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. detection, and determination of pH value. In spite of the absence of *Salmonella* spp., a high counts of yeasts and moulds were found, and *E. coli* was detected in five samples (16.67 %); and the sample were classified as “products in poor sanitary conditions”, because they showed thermo-tolerant coliforms counting higher than the standard established by the legislation in force. Therefore, quality programs such as Good Manufacturing Practices (GMP) and Hazard Analysis and Critical Control Points (HACCP) should be employed to prevent any contamination risk, in order to provide safe products to consumers.

Keywords. microbiological quality, dairy products, coliforms, yeasts and moulds.

INTRODUÇÃO

No Brasil, dentre os inúmeros derivados lácteos, as bebidas lácteas fermentadas são os mais comercializados e apresentam características sensoriais semelhantes às do iogurte¹. De acordo com o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Bebidas Lácteas, pautado na Instrução Normativa n. 16, de 23 de agosto de 2005 (MAPA), as bebidas lácteas fermentadas são produtos resultantes da fermentação, por cultivos específicos e/ou adição de leites fermentados, da mistura do leite (*in natura*, pasteurizado, esterilizado, UHT, reconstituído, concentrado, em pó, integral, semidesnatado ou parcialmente desnatado e desnatado) e soro de leite (líquido, concentrado e em pó), adicionado ou não de gordura vegetal ou substâncias alimentícias e isento de tratamento térmico após a fermentação. A base láctea deve representar pelo menos 51,0 % (massa/massa) do total de ingredientes do produto. A contagem total de bactérias lácticas viáveis deve ser no mínimo de 10^6 UFC/g, no produto final, para o(s) cultivo(s) láctico(s) específico(s) empregado(s), durante todo o prazo de validade. As bebidas lácteas podem conter em sua formulação, além do soro do leite e dos cultivos de bactérias lácticas, acidulantes, aromatizantes, espessantes, emulsificantes, corantes, conservantes, pedaços, polpa ou sucos de fruta e mel².

Devido à simplicidade do processo de fabricação pela utilização de equipamentos básicos disponíveis nas indústrias, as pequenas e médias empresas laticinistas possuem a infraestrutura necessária para a produção de bebidas lácteas fermentadas. Porém, diversos fatores podem resultar em contaminação dos produtos, especialmente de origem microbiana, tais como: colaboradores pouco capacitados, descuidos com a higiene pessoal, instalações industriais inadequadas, falhas na higienização dos equipamentos e acessórios, poucos recursos ou ainda condições escassas para a implantação das Boas Práticas de Fabricação (BPF)³.

As bebidas lácteas, assim como a maioria dos produtos de origem animal, apresentam grande susceptibilidade ao desenvolvimento microbiano. Entretanto, as bebidas lácteas fermentadas são alimentos ácidos, com valores de pH variando entre 4,0 e 4,5. Apesar de não proporcionar condições adequadas para o desenvolvimento de coliformes

totais e termotolerantes, estudos relatam a presença desse grupo de micro-organismos em bebidas lácteas fermentadas^{3,4}, que são indicadores de más condições higiênico-sanitárias durante o processamento. Com relação aos fungos filamentosos e leveduriformes, estes encontram condições ótimas de desenvolvimento, o que faz desse produto um excelente meio para sua proliferação^{3,5,6}.

O estudo da microbiota contaminante em alimentos pode fornecer um diagnóstico importante da necessidade de implantação de medidas preventivas e corretivas nos programas de qualidade, atendendo às recomendações de BPF e Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC).

Neste estudo, o objetivo foi investigar a microbiota contaminante em bebidas lácteas fermentadas, produzidas por pequenas e médias empresas, por meio da enumeração de fungos filamentosos e leveduriformes, determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e termotolerantes, pesquisa de *Escherichia coli* e de *Salmonella* spp. e a determinação dos valores de pH.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção das amostras

Foram adquiridas 30 amostras de bebidas lácteas fermentadas, embaladas em sacos de polietileno de 1000 mL, de 11 diferentes marcas e diversos sabores, produzidas por pequenas e médias empresas, comercializadas na região de São José do Rio Preto, SP (Tabela 1). Todas as amostras se encontravam dentro do prazo de validade e foram acondicionadas em caixas isotérmicas contendo cubos de gelo e transportadas de imediato ao laboratório para análise⁷.

Enumeração de fungos filamentosos e leveduriformes

Inicialmente foram realizadas as diluições decimais seriadas até 10^{-10} , sendo empregadas as diluições pares (10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} , 10^{-8} e 10^{-10}). Foi pipetado asepticamente 1,0 mL das diluições empregadas, em placas de Petri esterilizadas e identificadas. A seguir, foram adicionados aproximadamente 20,0 mL de ágar batata dextrose acidificado com ácido tartárico a 10,0 % (pH = 4,0), ambos esterilizados. Após solidificação do meio de cultura, as placas foram incubadas a 25 °C por 120 horas. Os valores de UFC foram calculados segundo as diluições empregadas⁷.

Determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes totais e termotolerantes

Foi utilizada a técnica dos tubos múltiplos, empregando-se o caldo lauril triptose com incubação a 35 °C durante 48 horas e o caldo *Escherichia coli* (EC) com incubação em banho-maria a 45 °C durante 24 horas. A determinação do NMP de coliformes totais e termotolerantes foi realizada empregando-se a tabela de Hoskins⁷.

Pesquisa de *Escherichia coli*

A partir dos tubos considerados positivos em caldo EC, usados na quantificação de coliformes a 45 °C, uma alçada foi inoculada por estrias em placas de Petri contendo ágar eosina azul de metileno e incubadas a 35 °C por 48 horas. As colônias suspeitas foram identificadas utilizando-se os testes bioquímicos de indol/vermelho de metila/Voges-Proskauer/citrato – IMViC^{7,8}.

Pesquisa de *Salmonella* spp.

Vinte e cinco mililitros de cada amostra de bebida láctea fermentada foram adicionados em 225 mL de caldo lactosado e de água peptonada a 1,0 %, agitados para a obtenção de uma solução homogênea e incubados a 35 °C por 24 horas; em seguida, 1 mL de cada cultivo foi transferido para tubos de ensaio contendo 10 mL de caldo selenito cistina e incubados a 35 °C. Após 24, 48 e 120 horas foram realizadas semeaduras em placas de Petri, contendo ágar *Salmonella Shigella* e ágar verde brilhante; as colônias suspeitas foram submetidas aos testes bioquímicos e sorológicos⁹.

Determinação dos valores de pH

Os valores de pH foram determinados por medição direta em potenciômetro, introduzindo-se o eletrodo diretamente nas amostras.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores de pH das amostras apresentaram uma variação de 3,90 a 4,76 (Tabela 1), considerados como não apropriados para este tipo de produto¹⁰.

Os valores de pH têm sua importância relacionada com o aspecto visual do produto final. Os valores maiores do que 4,6 favorecem o processo de sinérese, isso porque a estrutura do gel não é suficientemente formada. Por outro lado, se o valor do pH apresentar-se abaixo de 4,0 haverá contração

do coágulo, devido à redução da hidratação das proteínas, causando o dessoramento. Sendo assim, é fundamental que haja controle rigoroso do valor de pH para evitar a acidificação elevada, em função do tempo de fermentação. Isso evita que ocorra a separação de fases e alterações nas características sensoriais durante sua conservação em temperaturas baixas, que poderão tornar o produto indesejável¹⁰.

Apesar da inexistência de um padrão microbiológico para fungos filamentosos e leveduriformes em bebidas lácteas fermentadas¹¹, estes micro-organismos foram encontrados nas 30 amostras analisadas, variando de < 1 a 3,7 x 10⁹ UFC/mL. O desenvolvimento desses micro-organismos se deve às suas características intrínsecas, tais como: a fermentação ou a assimilação de lactose, a produção de enzimas proteolíticas e lipolíticas, a assimilação de ácido lático e ácido acético, o desenvolvimento em baixas temperaturas e valores de pH¹². Tal contaminação pode estar diretamente associada à adição de frutas, assim como práticas inadequadas de higiene durante o envase do produto³.

Considerando todas as amostras de bebidas lácteas analisadas, as de sabor de coco apresentaram os maiores índices de contaminação por fungos filamentosos e leveduriformes (Tabela 1). De maneira geral, as polpas de frutas utilizadas pelos laticínios são adquiridas de terceiros. Provavelmente as características intrínsecas das polpas de coco e as condições de obtenção e de preparo resultem em maior incidência de fungos. Essa contaminação também pode ser atribuída aos elevados teores de carboidratos, de ácidos graxos saturados e de outros nutrientes de fácil assimilação, normalmente presentes nessas polpas, além de elevada atividade de água¹³.

O coco apresenta características próprias de um meio de cultura altamente nutritivo e pH favorável à ação microbiana, o que acarreta problemas em sua conservação logo após a abertura do fruto. A polpa de coco até o momento da extração do fruto é considerada um produto estéril, porém, o contato com o ambiente, utensílios, equipamentos e manipuladores sem a devida higienização podem tornar o produto, ao qual será adicionado, impróprio para o consumo, diminuindo sua qualidade, possibilitando, inclusive, ser uma fonte em potencial de contaminação microbiana¹³.

Das 30 amostras analisadas, 25 (83,33 %) atenderam aos padrões estabelecidos pela legislação em vigor¹¹, exceto 5 (16,67 %) referentes às marcas C

Tabela 1. População de fungos filamentosos e leveduriformes, coliformes totais e termotolerantes, *E. coli* e valor de pH de bebidas lácteas fermentadas

Bebidas lácteas fermentadas (marca/sabor)	pH	Fungos filamentosos e leveduriformes (UFC/mL)	Coliformes totais (NMP/mL)	Coliformes termo-tolerantes (NMP/mL)	<i>E. coli</i> (confirmativo)	<i>Salmonella</i> spp. (-/+)
A						
Ameixa preta	4,10	<1	< 3	< 3	-	-
Coco	4,10	2,4 x 10 ⁴	< 3	< 3	-	-
Frutas vermelhas	3,90	<1	< 3	< 3	-	-
Mamão com laranja	4,00	<1	< 3	< 3	-	-
Morango	4,10	< 1	< 3	< 3	-	-
Pêssego	4,10	1,8 x 10 ³	< 3	< 3	-	-
Salada de frutas	3,90	9,7 x 10 ³	< 3	< 3	-	-
B						
Coco	4,10	1,3 x 10 ³	< 3	< 3	-	-
Morango	3,90	1,1 x 10 ³	< 3	< 3	-	-
Pêssego	3,90	<1	< 3	< 3	-	-
Vitamina: banana, maçã e mamão	4,00	2,7 x 10 ¹	< 3	< 3	-	-
C						
Coco	4,16	4,7 x 10 ⁷	< 3	< 3	-	-
Morango	4,18	5,6 x 10 ⁴	43	15	+	-
Pêssego	4,15	1,2 x 10 ⁵	< 3	< 3	-	-
Salada de frutas	4,08	4,3 x 10 ⁵	23	23	+	-
D						
Coco	4,30	1,5 x 10 ⁴	< 3	< 3	-	-
Morango	4,00	<1	< 3	< 3	-	-
Pêssego	4,10	5,0 x 10 ²	< 3	< 3	-	-
E						
Coco	4,28	6,4 x 10 ⁴	1100	15	+	-
Morango	4,76	3,2 x 10 ⁶	> 1100	> 1100	+	-
Pêssego	4,41	7,5 x 10 ³	460	15	+	-
F						
Coco	3,97	3,1 x 10 ⁸	< 3	< 3	-	-
Morango	4,00	<1	< 3	< 3	-	-
Salada de frutas	4,00	<1	< 3	< 3	-	-
G						
Mamão, banana e maçã	4,00	2,6 x 10 ³	< 3	< 3	-	-
Morango	4,00	7,5 x 10 ²	< 3	< 3	-	-
H						
Coco	4,38	3,7 x 10 ⁹	< 3	< 3	-	-
I						
Morango	4,05	<1	< 3	< 3	-	-
J						
Morango	4,01	5,0 x 10 ²	< 3	< 3	-	-
K						
Morango	4,00	2,9 x 10 ²	< 3	< 3	-	-
Variação	3,90 a 4,76	< 1 a 3,7 x 10⁹	< 3 a > 1100	< 3 a > 1100	- / +	-
Padrão Federal ⁹			NMP/mL	Máximo 10/mL		Ausência em 25 mL

(+) = positivo/presença; (-) = negativo/ausência

(sabores: salada de frutas e morango) e E (sabores: coco, morango e pêssego) (Tabela 1), o que revela uma situação preocupante, uma vez que esses produtos estavam disponíveis no comércio. Além disso, mostra que as duas indústrias (marcas C e E) e a fiscalização não foram eficazes na detecção de falhas no processo produtivo. Por outro lado, quando os alimentos são produzidos seguindo as BPF e APPCC, estas situações podem ser evitadas.

O número mais provável (NPM) de coliformes termotolerantes variou de 15 a > 1100 por mL (Tabela 1), sendo que a legislação prescreve limite máximo de 10 por mL. Normalmente, os coliformes são um grupo de micro-organismos utilizados como indicadores das condições higiênico-sanitárias em produtos lácteos. A presença deles ocorreu nas amostras que apresentaram os maiores valores de pH, o que proporciona condições para o seu desenvolvimento (Tabela 1). Práticas inadequadas durante o processamento por parte dos manipuladores, a má qualidade da água, higienização inadequada dos equipamentos e procedências duvidosas dos aditivos e de outras matérias-primas podem ser causas de contaminação, comprometendo a vida de prateleira dos produtos ou até tornando-os veículos em potencial para a transmissão de doenças^{14,15}.

Sendo assim, as elevadas contagens observadas nas amostras podem ser indícios de condições sanitárias deficientes durante o processamento e/ou utilização de matérias-primas contaminadas, comprometendo a vida de prateleira do produto. Recomenda-se, portanto, como fundamental o cumprimento das BPF e APPCC, ou seja, o contínuo monitoramento das diferentes etapas envolvidas no processo de elaboração desses produtos, desde a seleção das matérias-primas, bem como em todas as etapas do processamento até a estocagem e distribuição do produto, a fim de garantir a segurança durante a vida de prateleira, bem como para minimizar os danos à saúde do consumidor.

Em todas as amostras analisadas não houve isolamento de *Salmonella* spp. em 25 mL, portanto, em acordo com o estabelecido pela legislação vigente¹¹.

Algumas pequenas e médias indústrias ainda não transmitem para o colaborador todas as informações necessárias para a execução de seu trabalho. O conhecimento dos conceitos de qualidade, BPF e APPCC pelo colaborador é de grande importância, uma vez que esse é o principal envolvido na manipulação do alimento durante seu processamento. Essa falta de conhecimento pode ser também uma das razões pela incidência de

contaminação acima dos limites legais nas amostras das bebidas lácteas das marcas C e E.

Os relatos da realidade das pequenas e médias indústrias brasileiras mostram que são poucas as possibilidades de investimentos que têm retorno em curto prazo, e em função da alta tributação que incide sobre os produtos alimentícios, especialmente os lácteos, poucos recursos são utilizados para a melhoria da infraestrutura, especialmente na área de transportes e de financiamento e para mão-de-obra qualificada¹⁵.

De maneira geral, nas indústrias de alimentos, a implementação das BPF, por meio do controle de qualidade da água, da higienização das superfícies e utensílios, da qualidade do ar ambiental, bem como o treinamento dos manipuladores, é de fundamental importância para a segurança e a qualidade microbiológica dos produtos finais.

CONCLUSÃO

Das amostras avaliadas, 16,67 % foram classificadas como “produtos em condições sanitárias insatisfatórias”, por apresentarem valores acima do padrão microbiológico preconizado pela legislação vigente para a pesquisa de coliformes termotolerantes, o que revela uma situação preocupante, uma vez que esses produtos estavam disponíveis no comércio.

REFERÊNCIAS

1. Santos CT, Costa AR, Fontan GCR, Fontan RCI, Bonomo RCF. Influência da concentração de soro na aceitação sensorial de bebida láctea fermentada com polpa de manga. *Alim Nutr*.2008;19(1):55-60.
2. Brasil. Instrução normativa nº 16, de 23 de agosto de 2005. Regulamento técnico de identidade e qualidade de bebida láctea. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 23 de agosto de 2005.
3. Reis JA, Gonçalves TMV, Hoffmann FL. Qualidade microbiológica de bebidas lácteas fermentadas, com adição de polpas de frutas, comercializadas na região de São José do Rio Preto, SP. *Rev Hig Alim*.2010;24(180/181):157-61.
4. Lima RMT, Ferraz LPS, Lima RCT, Araújo GT, Paiva JE, Shinohara NKS et al. Análise microbiológica e físico-química de bebidas lácteas comercializadas no Recife - PE. IX Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão - JEPEX 2009, IV Semana Nacional de Ciência e Tecnologia; outubro de 2009; Pernambuco [acesso 2011 mai 12]. Disponível em: [http://www.eventosufupe.com.br/jepepx2009/cd/lista_area_14.htm]
5. Hoffmann FL. Fatores limitantes à proliferação de microorganismos em alimentos. *Brasil Alim*. 2001;9:23-30.
6. Álvarez-Martín P, Flórez AB, Hernández-Barranco A, Mayo B. Interaction between dairy yeasts and lactic acid bacteria strains during milk fermentation. *Food Control*.2008;19(1):62-70.

7. International Commission on Microbiological Specifications for Foods - ICMSE. Microorganisms in foods: their significance and methods of enumeration. Canada: 2^a ed. (UTP1). University of Toronto Press, v. 1; 1978.
8. Vandergart C, Splittstoesser D.F. Compendium of Methods for thew microbiological examination of foods. 3^a ed. Whashington (DC): APHA;
9. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa n. 62, de 26 de agosto de 2003. Oficializa os métodos analíticos para análises microbiológicas para produtos de origem animal e água. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 18 set 2003. Seção 1, p. 4.
10. Brandão SCC. Tecnologia da produção de iogurte. *Rev Leite Deriv*.1995;5(25):24-38.
11. Brasil. Resolução RDC n. 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 10 jan. 2001. Seção 1, p. 45-53.
12. Kesekas H, Akbulut N. Yeasts as ripening adjunct cultures in Turkish white brined cheese production. *Turkey J Vet Anim Sci*.2008;32(5):327-33.
13. Sousa CL, Lourenço LFH, Francês JMO, Soares YPP, Araújo EAF, Pena RS. Avaliação microbiológica, físico-química e das condições de fabricação de bombom de chocolate com recheio de frutas. *Alim Nutr*.2010;21(2):305-10.
14. Papademas P, Bintsis T. Food safety management systems (FSMS) in the dairy industry: a review. *Int J Dairy Technol*.2010;63(1-4):1-15.
15. Karaman AD, Cobanoglu F, Tunalioglu R, Ova G. Barriers and benefits of the implementation of food safety management systems among the Turkish dairy industry: A case study. *Food Control*.2012;25(1):732-9.

Listeria monocytogenes em hortaliças: isolamento e sorotipagem

Listeria monocytogenes in green vegetables: isolation and serotyping

RIALA6/1549

Marcelo Luiz Lima BRANDÃO*, Fernanda Corredeira da Paixão BISPO, Davi de Oliveira ALMEIDA, Carla de Oliveira ROSAS, Sílvia Maria Lopes BRICIO, Victor Augustus MARIN

*Endereço para correspondência: Laboratório de Microbiologia de Produtos, Setor de Alimentos, Departamento de Microbiologia, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. Av. Brasil, 4365. Manguinhos, Rio de Janeiro – RJ, Brasil, CEP 21040-900. Tel (21) 3865-5161. E-mail: marcelo.brandao@incqs.fiocruz.br
Recebido: 15.05.2012 - Aceito para publicação: 19.02.2013

RESUMO

A ingestão de alimentos contaminados com *Listeria monocytogenes* representa um risco à saúde humana. A pesquisa de *L. monocytogenes* por meio de técnica de enriquecimento seletivo foi efetuada em 97 amostras de hortaliças, comercializadas no Estado do Rio de Janeiro. Foram analisadas 35 hortaliças *in natura*, 32 minimamente processadas e 30 pratos de saladas cruas prontas para consumo. Os isolados foram sorotipados por soroaglutinação clássica utilizando-se antissoro policlonal flagelar e somático. Sete amostras (7,2 %) apresentaram *L. monocytogenes*, sendo duas hortaliças *in natura* e cinco em forma de salada. Todos os isolados foram identificados como sorovar 1/2a. Em virtude da ocorrência de contaminação de hortaliças *in natura* com *L. monocytogenes*, é fundamental que os consumidores estejam esclarecidos quanto à possível presença deste patógeno nesse tipo de alimento, e fiquem cientes quanto à realização de corretos procedimentos de sanitização e de cuidados para evitar a contaminação cruzada com outros alimentos. A presença de *L. monocytogenes* em saladas prontas para consumo representa um risco à saúde dos consumidores, principalmente para indivíduos pertencentes ao grupo de risco.

Palavras-chave. *Listeria monocytogenes*, hortaliças, sorotipagem.

ABSTRACT

Consumption of food contaminated with *Listeria monocytogenes* poses as a risk to human health. Ninety-seven samples of green leafy vegetables marketed in the state of Rio de Janeiro were analyzed for detecting *L. monocytogenes* by selective enrichment. Thirty-five *in natura* green vegetables, 32 minimally processed samples and 30 ready-to-eat raw salads samples were assessed. The isolates were serotyped by means of classical seroagglutination technique using somatic and flagellar polyclonal antisera. Seven samples (7.2 %) showed to be contaminated with *L. monocytogenes*, being two *in natura* samples and five ready-to-eat salads. All isolates were identified as serovar 1/2a. Considering these findings on the contamination of *in natura* green vegetables with *L. monocytogenes*, the consumers should be advised regarding to the possibility of this kind of product to be contaminated with this pathogen, and also to imply vigilance in observing the proper sanitization procedures to avoid the cross-contamination with other foods. Occurrence of *L. monocytogenes* in ready-to-eat salad samples denotes a health hazard to consumers, especially to those who belong to risk groups.

Keywords. *Listeria monocytogenes*, leafy green vegetables, serotyping.

INTRODUÇÃO

Hortaliças são importantes componentes de uma dieta saudável, provendo vitaminas, minerais e fitonutrientes. Pesquisas científicas das últimas duas décadas têm demonstrado que uma dieta rica em vegetais pode prevenir o surgimento de quadros de câncer e diminuir a ocorrência de doenças coronarianas. Devido a estes benefícios em potencial, órgãos governamentais de todo o mundo têm incentivado o consumo de vegetais na prevenção de doenças¹. Contudo, em paralelo ao elevado consumo destes produtos, um aumento dos casos de doenças de origem alimentar veiculadas por hortaliças e saladas prontas para o consumo tem ocorrido². No encontro de especialistas relativo aos perigos microbiológicos associados com produtos frescos, promovido pela Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura e pela Organização Mundial da Saúde em 2008, as hortaliças foram identificadas como os produtos de maior preocupação do ponto de vista de segurança de alimentos².

Dentre os micro-organismos patogênicos que podem ser transmitidos por hortaliças está a bactéria *Listeria monocytogenes*¹⁻³. Esta espécie encontra-se amplamente distribuída na natureza e apresenta habilidade de sobreviver por longos períodos de tempo no ambiente, colonizando vegetais, solo, águas superficiais e alimentos⁴. *L. monocytogenes* se diferencia de outros patógenos alimentares pela capacidade de crescer a temperaturas baixas, de resistir a condições adversas, como ambientes com baixo pH, altas concentrações de NaCl e baixa tensão de oxigênio⁵. É um patógeno intracelular facultativo que causa infecções severas, com quadros de aborto, meningite e septicemia, acometendo principalmente gestantes, crianças, idosos e adultos com o sistema imunológico comprometido, que formam o grupo de risco para listeriose³. Constitui um problema de saúde pública devido à gravidade da listeriose e a alta taxa de mortalidade, entre 20 a 30 %^{3,4}. Devido à sua capacidade de se multiplicar sob temperatura de refrigeração, alimentos prontos para o consumo, como as hortaliças minimamente processadas, são veículos comuns de infecção por este patógeno^{1,2}.

No Brasil, a legislação vigente que regulamenta os padrões microbiológicos para alimentos⁶ preconiza a ausência de *Salmonella* spp. em amostras de vegetais, não citando *L. monocytogenes* como critério. Contudo, surtos causados por *L. monocytogenes* associados ao consumo

de hortaliças já foram reportados, sendo esta espécie considerada como um perigo microbiológico em vegetais folhosos².

Diante da crescente preocupação mundial com o papel de *L. monocytogenes* em infecções de origem alimentar e a indicação das hortaliças como veículos deste patógeno, o objetivo deste estudo foi investigar a contaminação de hortaliças por *L. monocytogenes* e identificar o sorovar dos isolados por soro aglutinação convencional.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem

Um total de 97 amostras de hortaliças foi analisado, incluindo 35 *in natura* (uma de acelga, uma de agrião, 29 de alface, duas de chicória e duas de couve), 32 minimamente processadas (MP) (uma de acelga, três de agrião, 21 de alface, uma de chicória, duas de couve, três de espinafre e uma de rúcula) e 30 de saladas de alface de serviços de alimentação. As amostras foram coletadas de forma aleatória, em diferentes estabelecimentos (feiras-livres, quitandas, supermercados e restaurantes) nos municípios do Rio de Janeiro, Niterói, Nova Iguaçu e Volta Redonda, do Estado do Rio de Janeiro, Brasil, no período de outubro de 2010 a setembro de 2011. A escolha das amostras e das marcas foi de acordo com a disponibilidade no comércio do Estado do Rio de Janeiro durante o período de análises. As amostras foram acondicionadas em embalagens estéreis individuais para transporte e mantidas sob temperatura de refrigeração (4-8 °C) até o momento da análise. As análises foram realizadas no Setor de Alimentos do Departamento de Microbiologia do Instituto Nacional de Controle de Qualidade da Fundação Oswaldo Cruz, localizado no município do Rio de Janeiro, RJ.

Análises microbiológicas

A pesquisa de *L. monocytogenes* foi realizada conforme descrito por Hitchins e Jinneman⁴. Vinte e cinco gramas da amostra foram homogeneizadas com caldo de enriquecimento tamponado para *Listeria* (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra). O homogenato foi incubado a 30 °C por 4 h. Após este período, foram adicionados os agentes seletivos (acriflavina, ácido nalidíxico e ciclohexamina). A incubação a 30 °C foi mantida por um total de 48 h. Para o isolamento foi utilizado o *Chromogenic Listeria Agar* (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra). As colônias

características foram submetidas aos testes morfológicos e fenotípicos, dentre eles, a coloração de Gram, fermentação de carboidratos (glicose, esculina, maltose, ramnose, manitol e xilose), produção de catalase, hemólise em ágar sangue de carneiro e motilidade.

Sorotipagem dos isolados de *L. monocytogenes*

As culturas foram semeadas em ágar tripticaseína de soja contendo extrato de levedura (Merck, Darmstadt, Germany) e enviadas ao Laboratório de Zoonoses Bacterianas/IOC/Fiocruz para identificação e sorotipagem convencional por aglutinação segundo Seeliger e Höhne⁷.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De 97 amostras de hortaliças analisadas, sete (7,2 %) apresentaram contaminação por *L. monocytogenes*, duas amostras de alface *in natura* e cinco amostras de saladas de alface de serviços de alimentação (Tabela 1). Todos os isolados foram identificados como pertencentes ao sorovar 1/2a.

A ocorrência de *L. monocytogenes* nas amostras de hortaliças *in natura* observada neste estudo (5,7 %), foi superior ao relatado por De Giusti et al⁸, que detectaram

L. monocytogenes em apenas uma (0,4 %) amostra de alface em 265 vegetais inteiros analisados pelo sistema Bax PCR. Esses autores não obtiveram confirmação pelo método de cultivo. Outros autores reportaram a ausência deste patógeno em amostras de vegetais *in natura*⁹⁻¹¹.

A ausência de *L. monocytogenes* nas amostras minimamente processadas observada neste estudo é corroborada pela pesquisa de Tressler et al¹⁰, que não detectaram esse patógeno ao analisarem 126 amostras de hortaliças MP comercializadas na cidade de Fortaleza - CE. Fröder et al¹² relataram baixa ocorrência de *L. monocytogenes* em vegetais MP comercializados na cidade de São Paulo - SP. Os autores isolaram a bactéria em apenas uma amostra de espinafre (0,6 %) de um total de 181 vegetais analisados. Em outros países, Abadias et al⁹ observaram uma ocorrência de 3,4 e 0,8 % em amostras de alface e saladas MP contendo hortaliças variadas comercializadas na Espanha. Cordano e Jacquet¹³ não detectaram *L. monocytogenes* em 154 amostras de vegetais MP analisadas no Chile. Na Itália, De Giusti et al⁸ analisaram 699 amostras de vegetais MP pelo sistema Bax PCR e detectaram *L. monocytogenes* em duas (0,3 %) amostras de saladas mistas contendo alface, porém não conseguiram isolar o patógeno nestas mesmas amostras pelo método de cultivo. Como as hortaliças

Tabela 1. Resultados da pesquisa de *L. monocytogenes* nas amostras de hortaliças

Classe da amostra	Tipo de hortaliça (nº de amostras)	Nº de amostras positivas (%)
<i>In natura</i>	Acelga (1)	0 (0)
	Agrião (1)	0 (0)
	Alface (29)	2 (6,9)
	Chicória (2)	0 (0)
	Couve (2)	0 (0)
	Total (35)	2 (5,7)
Minimamente processada	Acelga (1)	0 (0)
	Agrião (3)	0 (0)
	Alface (21)	0 (0)
	Chicória (1)	0 (0)
	Couve (2)	0 (0)
	Espinafre (3)	0 (0)
	Rúcula (1)	0 (0)
Total (32)	0 (0)	
Saladas de serviços de alimentação	Alface (30)	5 (16,7)
Total de amostras de hortaliças	97	7 (7,2)

minimamente processadas são produtos submetidos a procedimentos de higienização e sanitização, é esperado que a contaminação por patógenos seja inexistente ou muito baixa caso os procedimentos tenham sido realizados de forma eficaz¹.

Das 30 amostras de pratos prontos comercializadas em serviços de alimentação, *L. monocytogenes* foi detectada em cinco amostras de alface (16,7 %). Em um estudo realizado por Little et al¹⁴, foi avaliada a prevalência de *L. monocytogenes* em saladas mistas contendo carne ou frutos do mar. Os autores relataram uma prevalência de 47,2 e 52,8 % nas amostras contendo carne e frutos do mar, respectivamente. A prevalência superior ao observado no presente estudo pode estar relacionada à presença dos produtos cárneos nas saladas.

Todas as cepas de *L. monocytogenes* isoladas foram classificadas como pertencentes ao sorovar 1/2a. Esse resultado foi concordante com dados da literatura, que destacam este sorovar como um dos mais prevalentes em amostras de alimentos^{13,14}. Da mesma forma, na avaliação de amostras de saladas prontas para consumo contendo carne ou frutos do mar, realizado por Little et al¹⁴, o sorovar 1/2a foi o mais prevalente, sendo identificado em 67,3 % dos isolados. Cordano e Jacquet¹³ também relataram maior prevalência do sorovar 1/2a em amostras de salada de vegetais comercializadas em supermercados na cidade de Santiago, Chile.

Tendo em vista os resultados obtidos neste estudo, a presença de *L. monocytogenes* em amostras de hortaliças *in natura* sugere a possibilidade de estas terem sido contaminadas durante a produção no campo pelo solo, água contaminada, mão de manipuladores, podendo a contaminação também ter ocorrido nos estabelecimentos de venda. A contaminação das amostras de saladas prontas para o consumo com *L. monocytogenes* pode estar relacionada à contaminação por parte dos manipuladores, ou a contaminação cruzada com outros alimentos. A eficácia dos procedimentos de lavagem e desinfecção é essencial para a eliminação de micro-organismos patogênicos presentes nos vegetais. Em um estudo recente comparando diferentes procedimentos de lavagem e desinfecção realizados em serviços de alimentação no sudeste do Brasil, a utilização de solução de hipoclorito de sódio a 200 ppm por 15 min foi considerado o procedimento mais recomendado para descontaminação de alface¹⁵. Assim, programas de esclarecimento relacionados a procedimentos de sanitização de hortaliças frescas devem ser elaborados

e repassados aos consumidores. Da mesma forma, os responsáveis pelos serviços de alimentação devem estar atentos quanto ao uso e adequação do Manual de Boas Práticas de Higiene nos seus estabelecimentos.

CONCLUSÃO

L. monocytogenes foi detectada em amostras de alface de pratos prontos para consumo, o que representa um risco à saúde dos consumidores, principalmente para indivíduos pertencentes ao grupo de risco. Este patógeno também foi isolado em amostras de alface *in natura*, logo consumidores devem ser esclarecidos com relação à possibilidade da contaminação deste micro-organismo em hortaliças, estando assim atentos quanto à realização de corretos procedimentos de sanitização e de cuidados para evitar a contaminação cruzada com outros alimentos.

AGRADECIMENTOS

Ao INCQS/Fiocruz pelo financiamento deste estudo, ao CNPq por concessão de bolsa PIBIC a Fernanda Corredeira da Paixão Bispo, às Vigilâncias Sanitárias Municipais e Estadual do Rio de Janeiro pela coleta das amostras e ao Dr. Ernesto Hofer (Laboratório de Zoonoses Bacterianas do IOC/Fiocruz) pela sorotipagem dos isolados de *L. monocytogenes*.

REFERÊNCIAS

1. Mecanoglu TB, Halkman AK. Do leafy green vegetables and their ready-to-eat [RTE] salads carry a risk of foodborne pathogens? *Anaerobe*. 2011;17(6):286-7.
2. Food and Agricultural Organization/World Health Organization – FAO/WHO. Microbiological hazards in fresh leafy vegetables and herbs. Meeting Report. Rome: WHO, 2008. 151p. Microbiological Risk Assessment Series Nº 14. [acesso 2012 Abr 26]. Disponível em: [http://ftp.fao.org/docrep/fao/011/i0452e/i0452e00.pdf].
3. Newell DG, Koopmans M, Verhoef L, Duizer E, Aidara-Kane A, Sprong H et al. Food-borne diseases – The challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. *Int J Food Microbiol*. 2010;139(Supl. 1):S13-5.
4. Hitchins AD, Jinneman K. Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes* in Foods. In: Bacteriological analytical manual Online, Charper 10. [S.l.]; FDA. 2011. [acesso 2012 Abr 26]. Disponível em: [http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm071400.htm].
5. Swaminaphan B, Cabanes D, Zhang W, Cossart P. *Listeria monocytogenes*. In: Doyle MP, Beuchat LR. Food Microbiology Fundamentals and Frontiers. 3rd Ed. Washington DC: ASM Press, 2007. p. 457-91.

6. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC n.º12, de 2 de janeiro de 2001. Aprova regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para alimentos e seus anexos I e II. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, n.7-E, 10 jan. 2001. Seção1, p. 45.
7. Seeliger HPR, Höhne K. Serotyping of *Listeria monocytogenes* and related species. *Meth Microbiol*.1979;13:31-49.
8. De Giusti M, Aurigemma C, Marinelli L, Tufi D, Medici D, Pasquale S, et al. The evaluation of the microbial safety of fresh ready-to-eat vegetables produced by different technologies in Italy. *J Appl Microbiol*.2010;109:996-1006.
9. Abadias M, Usall J, Anguera M, Solsona C, Viñas I. Microbiological quality of fresh, minimally-processed fruit and vegetables, and sprouts from retail establishments. *Int J Food Microbiol*.2008;123:121-9.
10. Tresseler JFM, Figueiredo EAT, Figueiredo RW, Machado TF, Delfino CM, Sousa PHM. Avaliação da qualidade microbiológica de hortaliças minimamente processadas. *Ciênc Agrotecnol*.2009;33(Edição Especial):1722-7.
11. Oliveira M, Usall J, Viñas I, Anguera M, Gatiús F, Abadias M. Microbiological quality of fresh lettuce from lettuce from organic and conventional production. *Food Microbiol*.2010;27:679-84.
12. Fröder H, Martins CG, Souza KLO, Landgraf M, Franco BDGM, Destro MT. Minimally Processed Vegetable Salads: Microbial Quality Evaluation. *J Food Protect*.2007;70(5):1277-80.
13. Cordano AM, Jacquet C. *Listeria monocytogenes* isolated from vegetables salads sold at supermarket in Santiago, Chile: Prevalence and strain characterization. *Int J Food Microbiol*.2009;132:176-9.
14. Little CL, Taylor FC, Sagoo SK, Gillespie IA, Grant K, McLauchlin J. Prevalence and level of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* species in retail pre-packaged mixed vegetable salads in the UK. *Food Microbiol*.2007;24:711-7.
15. Oliveira ABA, Ritter AC, Tondo EC, Cardoso MI. Comparison of Different Washing and Disinfection Protocols Used by Food Services in Southern Brazil for Lettuce (*Lactuca sativa*). *Food Nutr Sci*.2011;3:28-33.

***Listeria* spp., coliformes, bactérias mesófilas e psicotróficas no leite *in natura* e pasteurizado tipo C**

Listeria spp., coliforms, mesophilic and psychrotrophic bacteria in raw and type C pasteurized milks

RIALA6/1550

Viramy Marques de ALMEIDA, Lidiane Soares PEREIRA, Francisca Neide COSTA*

*Endereço para correspondência: Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Água, Departamento de Patologia, Curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual do Maranhão, UEMA, Cidade Universitária Paulo VI, Caixa Postal 09, Tirirical, São Luís, MA/Brasil, CEP 65055-970. E-mail: franeidec@yahoo.com.br ; francisca.costa@pq.cnpq.br

Recebido: 06.06.2012 - Aceito para publicação: 14.02.2013

Financiamento: Bolsista FAPEMA.

RESUMO

A qualidade microbiológica de 30 amostras de leite *in natura* e 30 de leite pasteurizado tipo C, provenientes da bacia leiteira do Médio Mearim/MA, foi avaliada por meio de análises de coliformes a 35 °C e 45 °C, contagem de bactérias aeróbias mesófilas e psicotróficas e pesquisa de *Listeria* spp. O leite *in natura* apresentou contagem elevada de coliformes a 35 °C e 45 °C ($1,5 \times 10^2$ a $>1,1 \times 10^3$ NMP/mL; <3 a $>1,1 \times 10^3$ NMP/mL), bactérias mesófilas ($2,8 \times 10^4$ a $2,2 \times 10^6$ UFC/mL) e psicotróficas ($5,2 \times 10^4$ a 2×10^6 UFC/mL). *Listeria* spp. foi observada em 10 % (n=03) das amostras. As amostras de leite pasteurizado tipo C, 96,66 % (n=29) e 86,66 % (n=26) mostraram discordância com a Instrução Normativa 51, respectivamente, para coliformes a 35 °C e 45 °C. Para as bactérias mesófilas, 100 % das amostras estavam em acordo com a legislação. As contagens de bactérias psicotróficas foram expressivas com valores de $1,5 \times 10^2$ a $2,5 \times 10^4$ UFC/mL e ausência de *Listeria* spp. Os resultados sugerem que o leite *in natura* e o pasteurizado tipo C foram produzidos e processados sob condições higiênico-sanitárias insatisfatórias, com risco de veiculação de *Listeria* spp. por meio de leite *in natura*.

Palavras-chave. leite *in natura*, leite pasteurizado, qualidade microbiológica.

ABSTRACT

The microbiological quality of 30 samples of raw and 30 type C pasteurized milks, from the dairy region of the Medium Mearim/MA, was assessed by analyzing coliforms at 35 °C and 45 °C, mesophilic aerobic and psychrotrophic bacteria counting, and *Listeria* spp. detection. The raw milk showed higher counts for coliforms at 35 °C and 45 °C (15×10^2 to $>1.1 \times 10^3$ MPN/mL; <3 to $>1.1 \times 10^3$ MPN/mL), mesophilic bacteria (2.8×10^4 to 2.2×10^6 CFU/mL) and psychrotrophic bacteria (5.2×10^4 to 2×10^6 CFU/mL). *Listeria* spp. was found in 10 % (n=03) of samples. Among the type C pasteurized milk samples, 96.66 % (n=29) and 86.66 % (n=26) did not comply with IN 51 for coliforms at 35 °C and 45 °C, respectively. For mesophilic bacteria, 100 % of samples were in agreement with the legislation. Psychrotrophic bacteria counts were significant with values from 1.5×10^2 to 2.5×10^4 CFU/mL, and no *Listeria* spp. was detected. These findings suggest that the both raw and type C pasteurized milks were produced and processed under unsatisfactory sanitary conditions, with risk of transporting *Listeria* spp. through the raw milk.

Keywords. raw milk, pasteurized milk, microbiological quality.

INTRODUÇÃO

No Brasil, na cadeia produtiva, a obtenção do leite ainda enfrenta obstáculos, especialmente em relação às condições higiênico-sanitárias que comprometem a qualidade final do produto, acarretando problemas econômicos, assim como riscos à saúde pública, principalmente quando consumido sem tratamento térmico¹.

A qualidade microbiológica do leite *in natura* produzido em várias regiões do país, em geral, apresenta elevadas contagens de coliformes e aeróbios mesófilos, indicando deficiência na higiene de produção². A pasteurização é um processo importante, pois inativa os micro-organismos patogênicos, porém não recupera um leite de má qualidade, permanecendo uma microbiota viável de 0,1 a 0,5 % da contagem inicial. Assim, quanto maior a contaminação microbiana antes da pasteurização, maior será sua microbiota residual³.

Portanto, o controle higiênico-sanitário dos rebanhos e da ordenha até a pasteurização é fundamental para garantir a composição ideal do leite e reduzir o risco de doenças transmitidas por alimentos (DTA). A listeriose é uma das doenças que pode ser transmitida pelo leite *in natura* e pasteurizado, quando contaminado por bactérias do gênero *Listeria* spp., principalmente pela espécie *L. monocytogenes*. Entretanto, são bactérias pouco competitivas e os casos de listeriose no Brasil são subnotificados⁴. A doença pode causar infecções graves em humanos, como meningite, encefalite, endocardite e pneumonia. Em gestantes pode causar abortamento, morte fetal, nascimento prematuro, septicemia ou meningite neonatal⁵.

Dessa forma, considerando a importância do leite à saúde humana, presente na alimentação de indivíduos de todas as idades e classes sociais, destacando-se principalmente na dieta de crianças e idosos, que não devem consumi-lo com concentrações de micro-organismos capazes de causar agravos à saúde, este trabalho teve como objetivo avaliar a qualidade microbiológica do leite *in natura* e pasteurizado tipo C, provenientes da bacia leiteira do Médio Mearim/MA.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta das amostras

Foram coletadas 30 amostras de leite *in natura* em um posto de captação que recebia leite de diversos

produtores e 30 amostras de leite pasteurizado tipo C em um posto de distribuição, localizados no município de Bacabal/MA.

As amostras de leite *in natura* foram obtidas somente de produtores do município de Bacabal. As amostras de leite pasteurizado foram coletadas da produção leiteira de cinco diferentes municípios da região do Médio Mearim/MA (Pedreiras, Bacabal, Vitorino Freire, Igarapé Grande e São Luiz Gonzaga), cujo leite foi transportado em caminhão tanque refrigerado até o Município de Itapecuru-Mirim, onde ocorreu a pasteurização, sendo então distribuído para as microrregiões de origem.

As amostras foram acondicionadas em caixas isotérmicas e transportadas ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Água da Universidade Estadual do Maranhão para a realização das análises microbiológicas.

Análises microbiológicas

Para a determinação do número mais provável de coliformes a 35 °C e 45 °C e para a pesquisa de bactérias aeróbias mesófilas e psicrotróficas, utilizou-se a metodologia indicada pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento/MAPA⁶.

Para os coliformes, foi realizada a técnica dos tubos múltiplos, utilizando-se o caldo verde brilhante bile lactose 2 % e incubados a 35 °C por 24 a 48 horas. A partir dos tubos de caldo verde brilhante positivos, foram transferidas alíquotas para tubos contendo caldo *Escherichia coli*, sendo incubados a 45,5 °C em banho-maria por 24 a 48 horas. O número de tubos positivos determinou o NMP/mL.

Para a pesquisa de bactérias aeróbias mesófilas e psicrotróficas utilizou-se a técnica de *pour-plate* em ágar padrão. As placas foram incubadas a 35 °C por 48 horas e as colônias formadas foram enumeradas. O resultado da contagem foi corrigido de acordo com a diluição considerada e expresso em UFC/mL.

Para a pesquisa de *Listeria* spp. foi utilizado o Visual Immunoprecipitate Assay (VIP) método preconizado pela Association of Official Analytical Chemists – AOAC⁷, segundo especificações do fabricante. O resultado positivo do teste VIP para a presença de *Listeria* spp. é caracterizado pelo aparecimento de uma linha cinza no dispositivo reagente, devido à presença de antígenos flagelares da bactéria, que são liberados após inativação térmica. As amostras positivas no teste

foram inoculadas em placas contendo ágar cloreto de lítio feniletanol moxalactam seletivo para *Listeria* spp..

Os dados obtidos foram analisados segundo o programa Biostata 3.0, de domínio público. Os resultados das variáveis qualitativas foram expressos em percentual e das quantitativas em valores mínimos e máximos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 podem ser observados os resultados microbiológicos de todos os micro-organismos avaliados nas amostras de leite *in natura*. Foi observado considerável nível de contaminação pelos micro-organismos indicadores, onde a maioria das amostras apresentaram contagens superiores a $1,1 \times 10^3$ NMP/mL para os coliformes a 35 °C e 45 °C. Estes resultados foram semelhantes ao verificado por Maciel et al⁸, que também observaram excessiva contaminação por coliformes ao avaliarem 30 amostras de leite cru obtidas em três pontos de venda no município de Itapetinga/BA, com 100 % das amostras contaminadas, apresentando valores entre $1,5 \times 10^3$ a $2,4 \times 10^5$ NMP/mL e $1,5 \times 10^3$ a $9,3 \times 10^4$ NMP/mL para os coliformes a 35 °C e 45 °C, respectivamente.

Apesar da legislação⁹ não indicar padrões de coliformes a 35 °C e 45 °C no leite *in natura*, a presença excessiva revela deficiência no controle sanitário do rebanho e higiene inadequada dos utensílios e do transporte, bem como a ausência de boas práticas de manipulação, o que leva à contaminação ambiental e fecal do leite. Portanto, o tratamento dos animais doentes, a limpeza e sanitização rotineira dos equipamentos utilizados e a higiene pessoal do ordenhador são fatores cruciais para a melhora da qualidade bacteriológica do leite *in natura*.

Para as bactérias aeróbias mesófilas, o leite *in natura* apresentou contagem máxima de 2×10^6 UFC/mL e 10 % (03) das amostras estavam fora dos padrões, considerando o limite de 10^6 UFC/mL estabelecido pela legislação⁹ (Tabela 1). Diferente desta pesquisa, um estudo avaliando a população de aeróbios mesófilos em amostras de leite cru provenientes de tanques individuais e coletivos da Zona da Mata Mineira observou que todas as amostras estavam fora dos padrões estabelecidos, com contagem mínima de $1,4 \times 10^6$ UFC/mL¹⁰.

É muito importante a conservação adequada do leite *in natura* por meio do resfriamento, o nível elevado de mesófilos pode indicar falhas na temperatura de

armazenamento e deficiências higiênicas no processo de obtenção do leite.

A contagem de bactérias psicotróficas no leite *in natura* também apresentou máxima de 2×10^6 UFC/mL (Tabela 1). Apesar das contagens expressivas, não existe padrão estabelecido para esses micro-organismos. Entretanto, o número de bactérias psicotróficas presentes no leite cru indica as condições higiênicas da obtenção e o tempo e temperatura em que o leite foi armazenado. Pinto et al¹⁰ ressaltam que apesar de não existir regulamentação específica quanto as bactérias psicotróficas no leite cru, é imprudente a fabricação de produtos a partir desta matéria-prima com contagem de psicotróficos superior a $5,0 \times 10^6$ UFC/mL, pois estes micro-organismos podem provocar alterações bioquímicas indesejáveis que limitam a vida de prateleira dos produtos elaborados.

Quanto à pesquisa de *Listeria* spp. no leite *in natura*, a Tabela 1 mostra que 10 % (03) das amostras apresentaram contaminação por esse micro-organismo. Barancelli et al⁵ afirmam que a presença de *Listeria* no leite cru é preocupante, pois existe o hábito de consumi-lo ou utilizá-lo na produção de derivados sem nenhum tratamento térmico, principalmente quando contaminado por espécies de risco à saúde pública, como no caso de *L.monocytogenes*.

O controle rigoroso dessa bactéria, pela adoção de medidas corretas de higienização e sanitização nas plataformas de recepção do leite, pasteurização do produto, bem como a implantação e manutenção de controle dos pontos críticos em toda cadeia produtiva, deve evitar que este micro-organismo seja incorporado ao produto final, assegurando um alimento de qualidade ao consumidor.

Os resultados das análises das amostras de leite pasteurizado estão descritos na Tabela 2. As amostras também apresentaram contaminação por coliformes a 35 °C e 45 °C, com contagens superiores a $1,1 \times 10^3$ NMP/mL para ambos os grupos de coliformes. Esses resultados sugerem falhas no sistema de pasteurização, no que se refere ao binômio tempo e temperatura, ou contaminação do leite após o processo térmico.

Com a elevada contaminação encontrada por micro-organismos indicadores, ressalta-se a importância da adoção de medidas corretas de higiene e manipulação após a pasteurização, assim como a verificação da temperatura do pasteurizador para garantir que o leite esteja recebendo a temperatura adequada para eliminar ou

Tabela 1. Contagem de coliformes a 35 °C e 45 °C, bactérias aeróbias mesófilas, bactérias psicrotróficas e pesquisa de *Listeria* spp. nas amostras de leite *in natura* da região do Médio Mearim/MA

Micro-organismos	Leite <i>in natura</i>		Amostras fora dos padrões*
Coliformes a 35 °C ¹	1,5 x 10 ² a 2,1 x 10 ²	1,1 x 10 ³ a >1,1 x 10 ³	SP
n (%)	03 (10)	27 (90)	
Coliformes a 45 °C ¹	<3 a 2,44 x 10 ²	1,1 x 10 ³ a >1,1 x 10 ³	SP
n (%)	11 (36,66)	19 (63,34)	
Aeróbios mesófilos ²	2,8 x 10 ⁴ a 1 x 10 ⁵	>1 x 10 ⁵ a 2 x 10 ⁶	03 (10)
n (%)	26 (86,66)	04 (13,34)	
Bactérias psicrotróficas ²	5,2 x 10 ⁴ a 1,9 x 10 ⁵	>1,9 x 10 ⁵ a 2 x 10 ⁶	SP
n (%)	29 (96,66)	01 (3,34)	
<i>Listeria</i> spp	Presença	Ausência	SP
n (%)	03 (10)	27 (90)	

*Brasil (2002); ¹NMP/mL; ²UFC/mL; SP: sem padrão estabelecido pela legislação

diminuir a carga microbiana inicial presente na matéria-prima. Além disso, o manipulador é outro elemento-chave na qualidade final do leite, pois representa uma das principais fontes de veiculação de micro-organismos.

Catão e Ceballos¹¹ encontraram resultados semelhantes a esta pesquisa ao analisarem 45 amostras de leite cru e 30 de leite pasteurizado tipo C, observando elevada contaminação por coliformes a 35 °C e 45 °C. Todas as amostras de leite pasteurizado tipo C avaliadas estavam fora dos padrões para os dois grupos de coliformes. Após a adoção de medidas adequadas de higiene, houve significativa redução do número de amostras desconformes, com 22,2 % e 44,4 % das amostras de leite pasteurizado fora dos padrões para coliformes a 35 °C e a 45 °C, respectivamente.

Para as bactérias mesófilas, o leite pasteurizado tipo C apresentou contagem máxima de 3,8 x 10⁴ UFC/mL, divergindo dos resultados de Freitas et al¹² em Belém/PA, que ao analisarem amostras de leite pasteurizado quanto a pesquisa de aeróbios mesófilos, relataram contagem máxima de 10⁷ UFC/mL, com 41,9 % das amostras com valores acima do limite estabelecido.

Embora todas as amostras de leite pasteurizado tipo C avaliadas nesta pesquisa tenham apresentado contagens dentro dos limites exigidos para as bactérias mesófilas, os valores observados podem significar matéria-prima com elevada contaminação, equipamentos não sanitizados e pasteurização deficiente, indicando, mais uma vez, a ocorrência de falhas higiênicas e tecnológicas no processamento do leite.

Em relação às bactérias psicrotróficas, as amostras de leite pasteurizado tipo C apresentaram

contagens que variaram entre 1,5 x 10 a 2 x 10⁵ UFC/mL (Tabela 2), superando os valores máximos verificados no leite *in natura*. Apesar da legislação⁹ também não estabelecer padrão para as bactérias psicrotróficas no leite pasteurizado, Adams e Moss¹³ ressaltam que esses micro-organismos na quantidade de 1,0 x 10⁴ UFC/mL, podem produzir enzimas termoestáveis responsáveis pelo odor e sabor desagradáveis e coagulação do produto, diminuindo a vida útil do mesmo. Moraes et al¹⁴ ressaltam que o leite com valores elevados de bactérias psicrotróficas, constitui um risco para o consumidor não somente pela deterioração da matéria-prima, mas principalmente pela provável presença de alguns gêneros de bactérias como *Pseudomonas* e *Listeria*.

Este trabalho não evidenciou a presença de *Listeria* spp. nas amostras de leite pasteurizado tipo C (Tabela 2), semelhante aos achados de Padilha et al¹⁵ ao avaliar 250 amostras de leite pasteurizado em Recife/PE. Os dados obtidos nesta pesquisa e em outros trabalhos corroboram com a posição dos pesquisadores de listeriose de origem alimentar da Organização Mundial de Saúde que consideram a pasteurização um tratamento eficiente para redução de *Listeria* no leite¹². No entanto, existem estudos que têm evidenciado a presença de *Listeria* spp. no leite pasteurizado, como na pesquisa de Catão e Ceballos¹¹ que constataram a presença da bactéria em 30 % das amostras, indicando um processo de pasteurização ineficiente ou contaminação pós-processamento do leite, ou ainda, a ocorrência de ambos os fenômenos. Os autores relatam que a falta de notificações de casos de listeriose no Brasil, em particular, os associados a alimentos na região Nordeste,

Tabela 2. Contagem de coliformes a 35 °C e 45 °C, bactérias aeróbias mesófilas, bactérias psicrotróficas e pesquisa de *Listeria* spp. nas amostras de leite pasteurizado tipo C da região do Médio Mearim/MA

Micro-organismos	Leite pasteurizado tipo C		Amostras fora dos padrões*
Coliformes a 35 °C ¹	4 a 4,6 x 10 ²	>4,6 x 10 ² a >1,1 x 10 ³	29 (96,66)
n (%)	22	08	
Coliformes a 45 °C ¹	<3 a 4,6 x 10 ²	>4,6 x 10 ² a >1,1 x 10 ³	26 (86,66)
n (%)	25	05	
Aeróbios mesófilos ²	2 x 10 ² a 2,6 x 10 ³	>2,6 x 10 ³ a 3,8 x 10 ⁴	00
n (%)	23	07	
Bactérias psicrotróficas ²	1,5 x 10 ² a 1,5 x 10 ⁴	>1,5 x 10 ⁴ a 2 x 10 ⁵	SP
n (%)	20	10	
<i>Listeria</i> spp.	Presença	Ausência	00
n (%)	00	30 (100)	

*Brasil (2002); ¹NMP/mL; ²UFC/mL; SP: sem padrão estabelecido pela legislação

tornam interessante a pesquisa de *Listeria* spp., com a comparação de sua presença em relação à qualidade sanitária do produto, utilizando-se como indicadores os coliformes a 35 °C e 45 °C.

Apesar de não ter sido isolada *Listeria* spp. no leite pasteurizado tipo C avaliado nesta pesquisa, esse fato não exime a possibilidade da presença desta bactéria, já que é pouco competitiva em meio a outros micro-organismos, principalmente quando estes se apresentam em índices elevados, como observado nos resultados para os coliformes que deixou a maioria das amostras de leite pasteurizado tipo C em situação desconforme com a legislação⁹.

CONCLUSÃO

Os resultados microbiológicos do leite *in natura* sugerem que a sua produção e obtenção são realizadas sob precárias condições de higiene e manipulação.

Igualmente, a carga microbiana encontrada no leite pasteurizado tipo C e o fato da maioria das amostras encontrarem-se fora dos padrões para os coliformes, sugerem condições higiênico-sanitárias inadequadas desde a ordenha até o processo de pasteurização. Indicando, ainda, que a matéria-prima apresentava elevada contaminação diante do tratamento térmico que não foi suficiente para diminuir a carga microbiológica.

O leite *in natura* e pasteurizado tipo C da região do Médio Mearim/MA apresentaram qualidade microbiológica insatisfatória para consumo ou utilização na elaboração de derivados, com risco à saúde do consumidor diante da elevada contaminação observada.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Virtual do Maranhão, à Fundação de Amparo a Pesquisa e ao Desenvolvimento Tecnológico do Maranhão – FAPEMA e a Prefeitura Municipal de Bacabal/MA.

REFERÊNCIAS

1. Freitas JA, Oliveira JP, Galindo GAR. Avaliação da qualidade higiênico-sanitária do leite exposto ao consumo na região metropolitana de Belém-PA. Rev Inst Adolfo Lutz.2005;264(2):212-8.
2. Franco RM, Cavalcanti RM, Wood PCB, Loretti VP, Gonçalves PMR, Oliveira LAT. Avaliação da qualidade higiênico-sanitária de leite e derivados. Hig Aliment.2000;14(68/69):70-7.
3. Oliveira AX, Delfino NC, Neves TBS, Silva MH, Caetano A, Jesus NM, et al. Enumeração de coliformes totais e bactérias mesófilas em leite pasteurizado tipo “C” comercializado na cidade de Salvador-BA. Hig Aliment.2006;21(150):235.
4. Brito JR, Santos EMP, Arcuri EF, Lange CC, Brito MAVP, Souza GN, et al. Retail survey of brazilian milk and minas frescal cheese and a contaminated dairy plant to establish prevalence, relatedness, and sources of *Listeria monocytogenes* isolates. Appl Environ Microb.2008;74(15):4954-61.
5. Barancelli GV, Silva-Cruz JV, Porto E, Oliveira CAF. *Listeria monocytogenes*: ocorrência em produtos lácteos e suas implicações em saúde pública. Arq Inst Biol.2011;78(1):155-68.
6. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria n.10, de 11 de agosto de 1993. Aprova e oficializa os métodos analíticos para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes – métodos microbiológicos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, 17 ago.1993. Seção 1, p.11.937.
7. AOAC International. Official methods of analysis of AOAC International. 17ª ed. Washigton (DC); 2002.
8. Maciel JE, Carvalho EA, Santos LS, Araujo JB, Nunes VS. Qualidade microbiológica do leite cru comercializado em Itapetinga. Rev Bras Saúde Prod Anim.2008;9(3):443-8.

9. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002. Aprova e oficializa o regulamento técnico de identidade e qualidade de leite cru refrigerado. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF. 2002. Seção 1, n. 172, p.13-22.
10. Pinto CLO, Martins ML, Vanetti MCD. Qualidade microbiológica de leite cru refrigerado e isolamento de bactérias psicotróficas proteolíticas. *Ciênc Tecnol Alim*.2006;26(3):645-51.
11. Catão RMR, Ceballos BSO. *Listeria* spp, coliformes totais e fecais e *E.coli* no leite cru e pasteurizado de uma indústria de laticínios, no estado da Paraíba. *Ciênc Tecnol Alim*.2001;21(3):281-7.
12. Freitas JA, Oliveira JP, Sumbo FD, Carvalho RCE, Amorim Júnior B, Moraes RJ, et al. Características físico-químicas e microbiológicas do leite fluido exposto ao consumo na cidade de Belém, Pará. *Hig Alim*.2002;16(100):89-96.
13. Adams RR, Moss YMO. *Food microbiology*. Cambridge: Royal Society of Chemistry; 2000.
14. Moraes CR, Fuentefria AM, Zaffari CB, Conte M, Rocha JPAV, Spanamberg A, et al. Qualidade microbiológica de leite cru produzido em cinco municípios do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Acta Sci Vet*.2005;33(3):259-64.
15. Padilha MRE, Fernandes ZFF, Leal TCAL, Leal NC, Almeida AMP. Pesquisa de bactérias patogênicas em leite pasteurizado tipo C comercializado na cidade do Recife, Pernambuco, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop*.2001;34(2):161-71.

Resíduos de bifenilos policlorados em arroz e feijão do estado do Rio Grande do Sul

Cocco, R. **Residues of polychlorinated biphenyl in rice and beans in the state of Rio Grande do Sul.**

Santa Maria, RS. [Dissertação de Mestrado – Área de Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria – UFSM]. Orientadora: Ijoni Hilda Costabeber.

Bifenilos Policlorados (PCBs) de uso industrial vêm tendo seus resíduos espalhados no ambiente. São compostos persistentes e não biodegradáveis que contaminam água e solo e afetam organismos da cadeia alimentar. A exposição humana aos PCBs se dá especialmente pelo consumo de alimentos contaminados. Cereais e leguminosas, entre os quais o arroz e o feijão, são essenciais e têm grande destaque na alimentação humana. Por isto ganha relevância a detecção de resíduos de PCBs nesses alimentos. Assim, o objetivo geral deste trabalho foi identificar e quantificar resíduos de PCBs indicadores em amostras de arroz e feijão obtidas no Rio Grande do Sul, em 2010. Objetivou-se ainda calcular a ingestão diária estimada (IDE) de resíduos de PCBs e determinar o teor de gordura para correlacionar com os níveis destes compostos. A determinação dos resíduos de PCBs foi realizada por cromatógrafo a gás acoplado a espectrometria de massas (GC-MS), após a extração dos compostos através do método QuEChERS. Nas amostras de arroz foram encontrados valores médios de 0,05 ng.g⁻¹ para o PCB 28, 0,67 ng.g⁻¹ para o PCB 52, 0,24 ng.g⁻¹ para o PCB 101, 0,27 ng.g⁻¹ para o PCB 118, 1,28 ng.g⁻¹ para o PCB 138, 1,43 ng.g⁻¹ para o PCB 153 e 0,45 ng.g⁻¹ para o PCB 180. O PCB 52 foi o mais freqüente, sendo detectado em 72,7 % das amostras de arroz, seguido dos PCBs 153 (54,5 %), 138 (50,0 %), 101 e 180 (13,6 %), 118 (9,0 %) e 28 (0,0 %). Nas amostras de feijão foram encontrados valores médios de 0,14 ng.g⁻¹ para o PCB 52, 1,63 ng.g⁻¹ para o PCB 101, 1,33 ng.g⁻¹ para o PCB 118, 0,92 ng.g⁻¹ para o PCB 138 e 0,05 ng.g⁻¹ para os PCBs 28, 153 e 180. O PCB 118 foi o mais freqüente, sendo detectado em 22,2 % das amostras de feijão, seguido dos PCBs 138 (11,0 %), 52 e 101 (5,5 %), e 28, 153 e 180 (0,0 %). Observou-se que o arroz apresentou níveis médios de PCBs superiores aos do feijão. A ingestão diária estimada de PCBs foi de 7,82 ng.Kg⁻¹ e de 3,14 ng.Kg⁻¹ de peso corporal por dia, para o arroz e o feijão, respectivamente. Em relação ao percentual de gordura, o arroz apresentou teor de 0,32 % e o feijão de 1,10 %. Concluiu-se que ainda existem resíduos de PCBs em alimentos do Rio Grande do Sul, o que justifica novas pesquisas.

Palavras-chave. bifenilos policlorados; arroz; feijão; ingestão diária estimada; GC-MS.

Dissertação disponível na Biblioteca do Centro de Ciências Rurais
da Universidade Federal de Santa Maria – UFSM.
E-mail: betadavet@hotmail.com

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

A Revista do Instituto Adolfo Lutz (RIAL), iniciada em 1941, é uma publicação trimestral com a missão de divulgar resultados de investigações científicas relacionadas às ações de promoção à saúde, prevenção e controle de agravos e doenças de interesse em saúde pública, além de incentivar a produção de artigos científicos nas áreas de vigilância epidemiológica e sanitária e de proporcionar a atualização e aprimoramento de profissionais da área em âmbito nacional e internacional. A RIAL é inter e multidisciplinar, arbitrada, aberta a contribuições de autores nacionais e estrangeiros. Publica prioritariamente pesquisas originais com contribuições relevantes na área laboratorial em saúde pública, realizadas com rigor científico e que possam ser replicadas e generalizadas.

POLÍTICA EDITORIAL

Editada nos formatos impresso e eletrônico, a RIAL tem interesse por trabalhos originais em todas as áreas laboratoriais em saúde pública. São também publicadas outras contribuições inéditas, desde que sobre temas atuais e importantes – revisões de literatura, comunicações breves e notas científicas – além de resumos de teses e dissertações.

Os manuscritos devem destinar-se exclusivamente à RIAL, não sendo permitida sua apresentação simultânea a outro periódico. As contribuições podem ser apresentadas em português ou inglês.

Os manuscritos submetidos são analisados inicialmente pelos editores quanto ao atendimento aos padrões da RIAL e às normas para o envio dos originais. Aqueles manuscritos selecionados são encaminhados para avaliação por pares externos de área pertinente, sempre de instituições distintas àquela da origem do manuscrito, sendo garantido o anonimato e a confidencialidade durante todo o processo de avaliação. Após receber os pareceres, o Corpo Editorial, que detém a decisão final sobre a publicação ou não do texto, avalia a aceitação do texto sem modificações, a recusa ou a devolução ao autor com as sugestões apontadas pelos relatores.

Os manuscritos submetidos devem atender à política editorial da RIAL e às Instruções aos Autores, que seguem os *Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Writing and Editing for Biomedical Publication* (<http://www.icmje.org>), além dos critérios éticos da pesquisa humana e animal.

Os autores devem explicitar em MÉTODOS que a pesquisa foi conduzida dentro dos padrões exigidos pela Resolução 466 de 12 de dezembro de 2012 do Ministério da Saúde – Conselho Nacional da Saúde, em caso de ética humana, e pela Lei Federal 11.794 de 08 de outubro de 2008, pela Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos - DBCA de 2013 e pelas Resoluções Normativas Nº 12, Nº 13 e Nº 14 no caso de experimentação animal. A pesquisa deverá ser aprovada por comissão de ética humana (CEP) reconhecida pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) – vinculada ao Conselho Nacional de Saúde (CNS), bem como registro dos estudos de ensaios clínicos em base de dados, conforme recomendação aos editores da Lilacs e Scielo, disponíveis em: <http://bvsmodelo.bvsalud.org/site/lilacs/homepage.htm>. No caso de experimentação animal o projeto deverá ser aprovado por Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) reconhecida pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal do Ministério de Ciência e Tecnologia e Inovação (CONCEA). O nome da base de dados, sigla e/ou número do ensaio clínico, assim como o número do processo e o nome da comissão de ética que aprovou o projeto, deverão ser colocados ao final do RESUMO. Nos casos de ensaios envolvendo animais, estes deverão atender a Lei Federal 9605 contra crimes ambientais, a Lei federal 6638/76 e a Lei 11.794/08, que normatiza a utilização de animais em pesquisa científica. Os autores deverão ter em seu poder todos os documentos referentes a este procedimento, que poderão ser solicitados em qualquer momento pelos editores.

Os autores serão responsáveis por reconhecer e revelar conflitos financeiros, de interesse comercial e/ou associativo, relacionados ao material de trabalho ou outros que possam influenciá-los, apresentando uma declaração sobre a existência ou não de tais conflitos. Os relatores também devem revelar aos editores qualquer conflito que possa influir ou impedir as suas avaliações.

Os manuscritos publicados são de propriedade da RIAL. A transferência de direitos autorais será solicitada após a aprovação do manuscrito para publicação.

INFORMAÇÕES GERAIS

Os manuscritos submetidos à publicação na RIAL devem ser apresentados de acordo com as Instruções aos Autores.

São aceitos manuscritos nos idiomas: português e inglês.

O manuscrito deve ser encaminhado em formato eletrônico (e-mail) ou impresso, aos cuidados do editor-chefe da RIAL, no seguinte endereço:

Revista do Instituto Adolfo Lutz (RIAL)

Núcleo de Acervo

Av. Dr. Arnaldo, 355 - Cerqueira César - São Paulo - SP - Brasil - CEP: 01246-902

Ou por meio eletrônico em rial@saude.sp.gov.br

Pormenores sobre os itens exigidos para apresentação do manuscrito estão descritos a seguir.

1. CATEGORIA DE ARTIGOS

1.1 ARTIGOS ORIGINAIS: Incluem estudos relacionados à prevenção e controle de agravos e à promoção à saúde. Devem ser baseados em novos dados ou perspectivas relevantes para saúde pública. Cada artigo deve conter objetivos e hipóteses claras, desenho e métodos utilizados, resultados, discussão e conclusões.

INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES:

- Devem ter até 20 laudas impressas, excluindo resumos, tabelas, figuras e referências.
- As tabelas, figuras, gráficos e fotos, limitadas a 05 no conjunto, devem incluir apenas os dados imprescindíveis. As figuras não devem repetir dados já descritos em tabelas. Devem ser apresentadas em arquivo separado.

▪ As referências bibliográficas, limitadas a 40, devem incluir apenas aquelas estritamente pertinentes e relevantes à problemática abordada. Deve-se evitar a inclusão de número excessivo de referências numa mesma citação. Citações de documentos não publicados e não indexados na literatura científica (teses, relatórios e outros) devem ser evitadas.

▪ Os resumos em português e em inglês (abstract) devem ter até 200 palavras, com a indicação de 3 a 6 palavras-chave (keywords).

A estrutura dos artigos originais de pesquisa é a convencional: Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão e Conclusão, embora outros formatos possam ser aceitos, mas respeitando a lógica da estrutura de artigos científicos.

1.2 ARTIGOS DE REVISÃO: Dedicados à apresentação e à discussão de temas de interesse científico e de relevância para a saúde pública. Devem apresentar formulação clara de um objeto científico de interesse, argumentação lógica, crítica teórico-metodológica dos trabalhos consultados e síntese conclusiva. Devem ser elaborados por pesquisadores com experiência no campo em questão ou por especialistas de reconhecido saber.

Informações complementares:

▪ Devem ter até 25 laudas impressas, excluindo resumos, tabelas, figuras e referências.

▪ As tabelas, figuras, gráficos e fotos, limitadas a 03 no conjunto, devem incluir apenas os dados imprescindíveis. As figuras não devem repetir dados já descritos em tabelas. Devem ser apresentadas em arquivo separado.

▪ As referências bibliográficas, limitadas a 50, devem incluir apenas aquelas estritamente pertinentes e relevantes à problemática abordada. Deve-se evitar a inclusão de número excessivo de referências numa mesma citação. Citações de documentos não publicados e não indexados na literatura científica (teses, relatórios e outros) devem ser evitadas.

▪ Os resumos em português e em inglês (abstract) devem ter até 200 palavras, com a indicação de 3 a 6 palavras-chave (keywords).

1.3 COMUNICAÇÕES BREVES: São relatos sucintos destinados à rápida divulgação de eventos significativos no campo da pesquisa de interesse em saúde pública e que não comportam uma análise mais abrangente.

Informações complementares:

▪ Devem ter até 10 laudas impressas, excluindo resumos, tabelas, figuras e referências.

▪ As tabelas, figuras, gráficos e fotos, limitadas a 02 no conjunto, devem incluir apenas os dados imprescindíveis. As figuras não devem repetir dados já descritos em tabelas. Devem ser apresentadas em arquivo separado.

▪ As referências bibliográficas, limitadas a 15, devem incluir apenas aquelas estritamente pertinentes e relevantes à problemática abordada. Deve-se evitar a inclusão de número excessivo de referências numa mesma citação. Citações de documentos não publicados e não indexados na literatura científica (teses, relatórios e outros) devem ser evitadas.

▪ Os resumos em português e em inglês (abstract) devem ter até 200 palavras e devem ter entre 3 a 6 palavras-chave (keywords).

▪ Sua apresentação deve acompanhar as mesmas normas exigidas para artigos originais.

1.4 NOTAS CIENTÍFICAS: São relatos sucintos destinados à rápida divulgação de eventos relevantes de uma pesquisa experimental que justifique a publicação de resultados parciais.

Informações complementares:

▪ Devem ter até 06 laudas impressas, excluindo resumos, tabelas, figuras e referências.

▪ As tabelas, figuras, gráficos e fotos, limitadas a 02 no conjunto, devem incluir apenas os dados imprescindíveis. As figuras não devem repetir dados já descritos em tabelas. Devem ser apresentadas em arquivo separado.

▪ As referências bibliográficas, limitadas a 10, devem incluir apenas aquelas estritamente pertinentes e relevantes à problemática abordada. Deve-se evitar a inclusão de número excessivo de referências numa mesma citação. Citações de documentos não publicados e não indexados na literatura científica (teses, relatórios e outros) devem ser evitadas.

▪ Os resumos em português e em inglês (abstract) devem ter até 200 palavras e devem ter entre 3 a 6 palavras-chave (keywords).

▪ Sua apresentação deve acompanhar as mesmas normas exigidas para artigos originais, porém na forma de texto único.

1.5 RELATOS DE CASO: São textos que contemplam principalmente a área médica, em que o resultado é anterior ao interesse de sua divulgação ou a ocorrência dos resultados não é planejada.

Informações complementares:

▪ Devem ter até 03 laudas impressas, excluindo resumos, tabelas, figuras e referências.

▪ As tabelas, figuras, gráficos e fotos, limitadas a 02 no conjunto, devem incluir apenas os dados imprescindíveis. As figuras não devem repetir dados já descritos em tabelas. Devem ser apresentadas em arquivo separado.

▪ As referências bibliográficas, limitadas a 10, devem incluir apenas aquelas estritamente pertinentes e relevantes à problemática abordada. Deve-se evitar a inclusão de número excessivo de referências numa mesma citação. Citações de documentos não publicados e não indexados na literatura científica (teses, relatórios e outros) devem ser evitadas.

- Os resumos em português e em inglês (abstract) devem ter até 200 palavras e devem ter entre 3 a 6 palavras-chave (keywords).
- Devem apresentar Introdução, Relato de caso, Discussão e Conclusão, na forma de texto único.

1.6 RESUMOS DE TESES E DISSERTAÇÕES: São aceitos resumos de teses e dissertações até um ano após a defesa.

Informações complementares:

- Devem ter até 400 palavras e devem ter entre 3 a 6 palavras-chave (keywords).
- Sua apresentação deve conter o nome do autor e do orientador, título do trabalho em português e em inglês, nome da instituição em que foi apresentado, área de concentração e ano da defesa.

2. APRESENTAÇÃO DO MANUSCRITO: Os textos devem ser redigidos em processador de texto Word for Windows 2003 ou compatível, no formato A4, espaço duplo, fonte Times New Roman, tamanho 12. Devem ser evitados arquivos compactados. A estrutura do manuscrito deve estar em conformidade com as normas do Sistema Vancouver – Título; Autores e Instituições; Resumo e Abstract; Introdução; Material e Métodos; Resultados; Discussão; Conclusão; Agradecimentos; Referências; Tabelas; Figuras e Fotografias.

2.1 PÁGINA DE IDENTIFICAÇÃO: Deve constar:

Título em português e em inglês: O título deve ser conciso, completo e conter informações. Se o manuscrito for submetido em inglês, deve ser fornecido um título em português.

Autores: De acordo com o International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE), são considerados autores aqueles que contribuíram substancialmente para a concepção e planejamento, ou análise e interpretação dos dados; contribuíram significativamente na elaboração do rascunho ou na revisão crítica do conteúdo e participaram da aprovação da versão final do mesmo. Somente a aquisição de financiamento, a coleta de dados ou supervisão geral de grupos de pesquisa não justificam autoria – maiores esclarecimentos sobre autoria podem ser encontrados na página do ICMJE (<http://www.icjme.org>). Deve constar o nome completo, sem abreviações e com último sobrenome em caixa alta (exemplo: Ana Maria Camargo da SILVA) e o e-mail do autor responsável. O autor responsável para troca de correspondência deve estar assinalado com asterisco (*) e apresentar também o endereço completo.

Afiliação: Deve ser indicada a instituição à qual cada autor está afiliado, na seguinte ordem de hierarquias institucionais de afiliação: laboratório, setor, seção, serviço, divisão, departamento, instituto, faculdade e universidade.

Financiamento da pesquisa: Se a pesquisa foi subvencionada, indicar o tipo de auxílio, o nome da agência financiadora e o respectivo número do processo.

Apresentação prévia: Quando baseado em tese ou dissertação, indicar o nome do autor, título, ano, nome do programa de pós-graduação e instituição onde foi apresentada. Quando apresentado em evento científico, indicar o nome do evento, local e ano da realização.

2.2 PREPARO DO MANUSCRITO:

Resumo/Abstract: Todos os textos deverão ter resumos em português e inglês, dimensionados para ter até 200 palavras. Como regra geral, o resumo deve incluir objetivos do estudo, principais procedimentos metodológicos, principais resultados e conclusões.

Palavras-chave/keywords: Devem ser indicados entre 3 a 6 descritores do conteúdo, extraídos do vocabulário Descritores em Ciências da Saúde (DeCS) da Bireme (disponível em <http://www.bireme.br>) nos idiomas português e inglês. Em inglês, com base no Medical Subject Headings (MeSH).

Caso não sejam encontrados descritores adequados para a temática do manuscrito, poderão ser indicados termos não existentes nos conjuntos citados.

Estrutura do texto:

A) Introdução: Deve ser breve, relatando o contexto e a justificativa do estudo, apoiados em referências pertinentes ao objetivo do manuscrito, sintetizando a importância e destacando as lacunas do conhecimento abordadas. Não deve incluir dados ou conclusões do estudo em referência

B) Material e Métodos: Os procedimentos adotados devem ser descritos claramente, bem como as variáveis analisadas, com a respectiva definição, quando necessária, e a hipótese a ser testada. Devem ser descritas a população e a amostra, instrumentos de medida, com a apresentação, se possível, de medidas de validade e conter informações sobre a coleta e processamento de dados. Deve ser incluída a devida referência para os métodos e técnicas empregados, inclusive os métodos estatísticos; métodos novos ou substancialmente modificados devem ser descritos, justificando as razões para seu uso e mencionando suas limitações.

Os critérios éticos da pesquisa devem ser respeitados; os autores devem explicitar que a pesquisa foi conduzida dentro de padrões éticos e foi aprovada por comitê de ética, indicando o nome do comitê de ética, número e data do registro.

C) Resultados: Devem ser apresentados em uma sequência lógica, iniciando-se com a descrição dos dados mais importantes. Tabelas e figuras devem ser restritas àquelas necessárias para argumentação e a descrição dos dados no texto deve ser restrita aos mais importantes. Os gráficos devem ser utilizados para destacar os resultados mais relevantes e resumir relações complexas. Dados em gráficos e tabelas não devem ser duplicados nem repetidos no texto. Os resultados numéricos devem especificar os métodos estatísticos utilizados na análise.

D) Discussão: A partir dos dados obtidos e resultados alcançados, os novos e importantes aspectos observados devem ser interpretados à luz da literatura científica e das teorias existentes no campo. Argumentos e provas baseadas em comunicação de caráter pessoal ou divulgadas em documentos restritos não podem servir de apoio às argumentações do autor. Tanto as limitações do trabalho quanto suas implicações para futuras pesquisas devem ser esclarecidas. Incluir somente hipóteses e generalizações baseadas nos dados do trabalho. As conclusões podem finalizar esta parte, retomando o objetivo do trabalho ou serem apresentadas em item separado.

E) Agradecimentos: Este item é opcional e pode ser utilizado para mencionar os nomes de pessoas que, embora não preencham os requisitos de autoria, prestaram colaboração ao trabalho. Será preciso explicitar o motivo do agradecimento, por exemplo, consultoria científica, revisão crítica do manuscrito, coleta de dados etc. Deve haver permissão expressa dos nomeados e o autor responsável deve anexar a Declaração de Responsabilidade pelos Agradecimentos. Também pode constar desta parte apoio logístico de instituições.

2.3 CITAÇÃO NO TEXTO: A exatidão das referências é de responsabilidade dos autores. Devem ser indicadas pelo seu número na listagem, na forma de expoente, sem uso de parênteses, colchetes e similares. Nos casos em que há citação do nome do autor, o número da referência deve ser colocado a seguir do nome do autor. Trabalhos com dois autores devem fazer referência aos dois autores ligados por “e”. Nos outros casos apresentar apenas o primeiro autor (seguido de et al, em caso de autoria múltipla).

Exemplos: Nos Estados Unidos e Canadá, a obrigatoriedade da declaração dos nutrientes no rótulo do alimento é mais antiga e foram desenvolvidos métodos hidrolíticos, como o AOAC 996.06¹, de extração e determinação da GT por cálculo a partir dos AG obtidos por cromatografia gasosa com detector de ionização em chama (GC/DIC)^{2,3}.

Segundo Chang et al³¹, o aumento do tamanho das partículas resulta numa redução da área de superfície conferindo uma melhora na retenção e estabilidade das mesmas.

2.4 REFERÊNCIAS: Listadas ao final do texto, devem respeitar a quantidade definida para cada categoria de artigos aceitos pela RIAL. As referências devem ser normalizadas de acordo com o estilo Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Writing and Editing for Biomedical Publication, numeradas consecutivamente na ordem em que foram mencionadas a primeira vez no texto.

Os títulos de periódicos devem ser referidos de forma abreviada, de acordo com o Medline, disponível no endereço <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=journals>. Para consultar periódicos nacionais e latino-americanos: <http://portal.revistas.bvs.br/main.php?home=true&lang=pt>.

No caso de publicações com até seis autores, citam-se todos; acima de seis, citam-se os seis primeiros, seguidos da expressão latina “et al”. Referências de um mesmo autor devem ser organizadas em ordem cronológica crescente.

Exemplos:

Artigos de periódicos:

Aued-Pimentel S, Zenebon O. Lipídios totais e ácidos graxos na informação nutricional do rótulo dos alimentos embalados: aspectos sobre legislação e quantificação. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2009;68(2):121-6.

Weihrauch JL, Posati LP, Anderson BA, Exler J. Lipid conversion factors for calculating fatty acids contents of foods. *J Am Oil Chem Soc*. 1977;54:36-40.

Henington EA. Acolhimento como prática interdisciplinar num programa de extensão. *Cad Saude Coletiva* [Internet]. 2005;21(1):256-65. Disponível em: [<http://www.scielo.br/pdf/csp/v21n1/28.pdf>].

Livros:

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

Lopez D, organizador. *Estudos epidemiológicos qualitativos*. São Paulo: James Martim; 2009.

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

Foley KM, Gelband H, editors. *Improving palliative care for cancer*. Washington: National Academy Press 2001 [acesso 2003 Jul 13]. Disponível em: [http://www.nap.edu/catalog.php?record_id=10149].

Capítulos de livro:

Wirdh L. História da Epidemiologia. In: Lopez D, organizador. *Estudos epidemiológicos qualitativos*. São Paulo: James Martim; 2009.p.64-76.

Dissertações, teses e monografias:

Santos EP. Estabilidade química da manteiga da terra [dissertação de mestrado]. Bananeiras (PB): Universidade Federal da Paraíba;1995.

Moreschi ECP. Desenvolvimento e validação de métodos cromatográficos e avaliação da estabilidade de vitaminas hidrossolúveis em alimentos [tese de doutorado]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo; 2006.

Trabalhos de congressos, simpósios, encontros, seminários e outros:

Barboza et al. Descentralização das políticas públicas em DST/AIDS no Estado de São Paulo. III Encontro do Programa de Pós-Graduação em Infecções e Saúde Pública; agosto de 2004; São Paulo: Rev Inst Adolfo Lutz. p. 34 [resumo 32-SC].

Dados eletrônicos:

Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo – SABESP. O que fazemos/Qualidade da água. [acesso 2008 Set 17]. Disponível em: [http://www.sabesp.com.br/CalandraWeb/CalandraRedirect/?temp=4&proj=sabesp&pub=T&db=&doci].

Legislação:

Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. Diário Oficial [da] Republica Federativa do Brasil. Brasília, DF, 10 jan. 2001. Seção 1, nº7-E. p.45-53.

Autoria institucional:

Instituto Adolfo Lutz (São Paulo - Brasil). Métodos físico-químicos para análise de alimentos: normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. 4ª ed. [1ª ed. digital]. São Paulo (SP): Instituto Adolfo Lutz; 2008. Disponível em: [http://www.ial.sp.gov.br/index.php?option=com_remository&Itemid=7&func=select&orderby=1&Itemid=7].

Organización Mundial de la Salud – OMS. Como investigar el uso de medicamentos em los servicios de salud. Indicadores seleccionados del uso de medicamentos. Ginebra; 1993. (DAP. 93.1).

Patente:

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

Casos não contemplados nesta instrução devem ser citados conforme indicação do Committee of Medical Journals Editors (Grupo Vancouver), disponível em: <http://www.cmje.org>.

Referências a documentos não indexados na literatura científica mundial, em geral de divulgação circunscrita a uma instituição ou a um evento (teses, relatórios de pesquisa, comunicações em eventos, dentre outros) e informações extraídas de documentos eletrônicos, não mantidas permanentemente em sites, se relevantes, devem figurar no rodapé das páginas do texto onde foram citadas.

2.5 Números de figuras e tabelas: A quantidade de figuras e tabelas de cada manuscrito deve respeitar a quantidade definida para cada categoria de artigos aceitos pela RIAL. Todos os elementos gráficos ou tabulares apresentados serão identificados como figura ou tabela, e numerados sequencialmente a partir de um, e não como quadros, gráficos etc.

A) Tabelas: Devem ser redigidas em processador de texto Word for Windows 2003 ou compatível e serem apresentadas em arquivos separados, numeradas consecutivamente com algarismos arábicos, na ordem em que foram citadas no texto. A cada uma deve-se atribuir um título breve, não se utilizando traços internos horizontais ou verticais. As notas explicativas devem ser limitadas ao menor número possível e colocadas no rodapé das tabelas e não no cabeçalho ou título. Se houver tabela extraída de outro trabalho, previamente publicado, os autores devem solicitar formalmente autorização da revista que a publicou, para sua reprodução.

B) Figuras: As ilustrações (fotografias, desenhos, gráficos etc.) devem ser citadas como Figuras, apresentadas em arquivos separados e numeradas consecutivamente com algarismos arábicos na ordem em que foram citadas no texto. Devem conter título e legenda apresentados na parte inferior da figura. Só serão admitidas para publicação figuras suficientemente claras e com qualidade digital que permitam sua impressão, preferencialmente no formato vetorial. No formato JPEG, a resolução mínima deve ser de 300 dpi. Figuras em cores serão publicadas quando for necessária à clareza da informação e os custos deverão ser cobertos pelos autores. Se houver figura extraída de outro trabalho, previamente publicado, os autores devem solicitar autorização, por escrito, para sua reprodução.

3. DECLARAÇÕES E DOCUMENTOS SOLICITADOS: Em conformidade com as diretrizes do International Committee of Medical Journal Editors, são solicitados alguns documentos e declarações do(s) autor(es) para a avaliação de seu manuscrito. Observe a relação dos documentos abaixo e, nos casos em que se aplique, anexe o documento ao processo. O momento em que tais documentos serão solicitados é variável:

Documento/declaração	Quem assina	Quando anexar
Carta de Apresentação	Todos	Submissão
Responsabilidade pelos Agradecimentos	Autor responsável	Aprovação
Transferência de Direitos Autorais	Todos	Aprovação

A carta de Apresentação do manuscrito, assinada por todos os autores, deve conter:

▪ Um parágrafo declarando a responsabilidade de cada autor: ter contribuído substancialmente para a concepção e planejamento ou análise e interpretação dos dados; ter contribuído significativamente na elaboração do rascunho ou na revisão crítica do conteúdo; e ter participado da aprovação da versão final do manuscrito. Para maiores informações sobre critérios de autoria, consulte a página do ICMJE (<http://www.icjme.org>).

Um parágrafo contendo a declaração de potenciais conflitos de interesses dos autores.

Um parágrafo contendo a declaração que o trabalho não foi publicado, parcial ou integralmente, em outro periódico. Todos os autores devem ler, assinar e enviar documento transferindo os direitos autorais. O artigo só será liberado para publicação quando esse documento estiver de posse da RIAL.

4. VERIFICAÇÃO DOS ITENS EXIGIDOS NA SUBMISSÃO:

1. Nome e instituição de afiliação de cada autor, incluindo e-mail e telefone do autor responsável.
2. Título do manuscrito, em português e inglês.
3. Texto apresentado em letras Times New Roman, corpo 12, em formato Word ou similar (doc, txt, rtf).
4. Resumos em dois idiomas, um deles obrigatoriamente em inglês.
5. Carta de Apresentação assinada por todos os autores.
6. Nome da agência financiadora e número(s) do processo(s).
7. No caso de artigo baseado em tese/dissertação, indicar o nome da instituição/Programa, grau e o ano de defesa.
8. Referências normalizadas segundo estilo Vancouver, ordenadas pela citação no texto e numeradas, e se todas estão citadas no texto.
9. Tabelas numeradas sequencialmente, com título e notas, e no máximo com 12 colunas, em formato Word ou similar (doc, txt, rtf).
10. Figura no formato vetorial ou em pdf, ou tif, ou jpeg ou bmp, com resolução mínima 300 dpi.

5. REVISÃO DA REDAÇÃO CIENTÍFICA: Para ser publicado, o manuscrito aprovado é submetido à revisão da redação científica, gramatical e de estilo. A RIAL se reserva o direito de introduzir alterações nos originais, visando a manutenção da homogeneidade e qualidade da publicação, respeitando, porém, o estilo e as opiniões dos autores. Inclusive a versão em inglês do artigo terá esta etapa de revisão.

6. PROVAS: Após sua aprovação pelos editores, o manuscrito será revisado quanto à redação científica. O autor responsável pela correspondência receberá as provas gráficas para revisão por correio eletrônico em formato pdf (portable document format). O prazo máximo para a revisão da prova é de dois dias. É importante cumprir os prazos de revisão para garantir a publicação no fascículo programado. Atrasos nesta fase poderão resultar em remanejamento do artigo para fascículos subsequentes.

7. PUBLICAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO: Os artigos serão publicados em ordem cronológica de aprovação. As datas de recebimento e de aprovação do artigo constarão obrigatoriamente no mesmo.

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, de conformidade com a legislação sobre os direitos autorais.

A Revista do Instituto Adolfo Lutz é distribuída gratuitamente a entidades governamentais, culturais ou em permuta de periódicos nacionais ou estrangeiros.

Assessoria Editorial:

TIKINET

www.tiki.net.br/tiki



SECRETARIA
DA SAÚDE

