

REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ

ISSN 0073-9855
RIALA6



Volume 65 número 1, 2006



GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE



GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS
INSTITUTO ADOLFO LUTZ

**REVISTA
DO
INSTITUTO ADOLFO LUTZ**

Publicação quadrimestral/ Quadri-annual publication
Solicita-se permuta/ Exchange desired

Volume 65 número 1, 2006

ISSN 0073-9855

Janeiro - Abril - 2006

INSTITUTO ADOLFO LUTZ

Diretor Responsável

Carlos Adalberto de Camargo Sannazzaro
Diretor Geral do Instituto Adolfo Lutz

Comissão de Redação

Thaís Valéria Milanez, Presidente
Adriana Bugno, Secretária
Ângela Cristina Rodrigues Ghilardi
Cecília Cristina Marques dos Santos
Cristina Takami Kanamura
Luzia Setuko Umeda Yamamoto
Raquel dos Anjos Fazioli
Sabria Aued Pimentel
Cristina Adelaide Figueiredo, Membro Convidado
Janete Alaburda, Membro Convidado
Claydes de Quadros Zamboni, Membro Emérito

Setor de Publicações

Rocely Aparecida de Souza Bueno



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

1941-2005,
2006, 65 (1)

ISSN 0073-9855
RIALA 6

CDD₁₈ 614.07205

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

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

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

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

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

1. Missão da Revista do Instituto Adolfo Lutz

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

2. Normas para Publicação

O trabalho submetido à publicação deve ser inédito, não sendo permitida a sua apresentação simultânea em outro periódico, conforme declaração a ser assinada pelos autores. Os autores deverão informar na carta de encaminhamento em qual categoria o trabalho se enquadra. Os trabalhos redigidos em língua portuguesa ou inglesa, deverão ser enviados para o Setor de Publicações do Instituto Adolfo Lutz, em três cópias impressas, sendo uma completa e as outras duas omitindo os nomes dos autores e respectivas instituições, tanto na página de rosto como nos resumos em português e inglês. Após aprovação do trabalho, será solicitado aos autores o envio do artigo completo em disquete 3 ½ acompanhado de uma cópia impressa.

3. Processo de Julgamento dos Manuscritos

Os trabalhos serão aceitos para publicação após avaliação por pareceristas indicados pela Comissão de Redação. A lista de pareceristas que colaboraram em cada volume é publicada no último fascículo do ano. A publicação de artigos na Revista está condicionada à aprovação da Comissão de Redação de Publicações Oficiais do Instituto Adolfo Lutz, que poderá sugerir ao autor alterações no original. Os manuscritos revisados serão devolvidos aos autores para as devidas correções. O novo texto deverá retornar à Comissão que notificará a aceitação ou recusa do trabalho.

4. Ética

Os trabalhos de pesquisa envolvendo seres humanos e/ou animais deverão ser encaminhados com a cópia da aprovação do Comitê de Ética, e no item Material e Métodos deverá constar o número do processo e o nome do Comitê que o aprovou.

5. Categorias

Os seguintes tipos de trabalhos serão aceitos para publicação na Revista do Instituto Adolfo Lutz.

5.1. Artigo original

Relato completo de pesquisa original ainda não publicada. Deve apresentar no máximo 20 páginas impressas, incluindo figuras, tabelas e referências.

5.2. Comunicação breve

É um artigo curto, com objetivo limitado ou cujos resultados sejam provenientes de estudos com metodologia de pequena complexidade ou rotineira, de relevância para a área de saúde pública. Deve apresentar o mesmo formato do artigo científico, contendo no máximo duas tabelas ou duas figuras ou uma tabela e uma figura, até 15 referências e 10 páginas.

5.3. Nota científica

É o relato sucinto de resultados parciais de um trabalho experimental dignos de publicação, embora insuficientes ou inconsistentes para constituírem um artigo original. Deve ser relevante e que mereça rápida divulgação. Deve apresentar no máximo duas tabelas ou duas figuras ou uma tabela e uma figura e até 15 referências. O texto deve conter todos os tópicos de um artigo científico, porém sem as divisões.

5.4. Relato de caso

Contempla principalmente a área médica, em que o resultado é anterior ao interesse de sua divulgação ou a ocorrência dos resultados não é planejada. Inclui novas técnicas, terapias, diagnóstico, patologias, materiais e soluções inovadoras para problemas especiais, fenômenos anatômicos e fisiológicos. Deve conter os tópicos: título e resumo em português e inglês, introdução, relato do caso, discussão, conclusões, referências e apresentar no máximo três páginas incluindo figuras e tabelas e até dez referências.

5.5. Artigo de revisão

Avaliação da literatura sobre determinado assunto, cuja divulgação possa contribuir para melhorar o conhecimento da área em questão. Deve ser subdividido em tópicos, conter resumos em inglês e português. O artigo deve conter um sumário e apresentar no máximo 15 páginas.

5.6. Resumos de teses e dissertações

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

6. Preparação do manuscrito ou artigo

Geral

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

Estrutura:

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

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

Palavras-chave: podem ser utilizados até seis descritores que identifiquem o conteúdo do artigo, se possível baseados no DECS

(Descritores em Ciências da Saúde), disponível no www.bireme.br terminologia em saúde e consulta ao DECS.

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

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

Resultados: devem ser claros e concisos e podem apresentar tabelas e figuras quando necessárias, que devem ser auto explicativas.

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

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

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

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

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

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

Segundo o Sistema Vancouver, deve-se evitar a utilização de resumos bem como as "observações inéditas" e as "comunicações pessoais" como referências, mas as comunicações escritas (não verbais) podem ser inseridas entre parênteses no texto. Os artigos aceitos para publicação, porém, ainda não publicados, podem ser incluídos na relação das referências, bastando indicar a revista e citar entre parêntesis "no prelo". Informações extraídas de manuscritos submetidos, porém ainda não aceitos, devem ser citados no texto como "observações inéditas" (entre parêntesis). Os títulos das revistas devem ser abreviados de acordo com o Index Medicus seja pela List of Journals Indexed in Index Medicus ou no "website" <http://www.nlm.nih.gov> ou pelo Chemical Abstracts, ISI Science Citation Index, World List of Periodicals (publicado por Butterworks, Londres).

Exemplos

Artigos em revistas

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

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

- **Número com suplemento**

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

- **Volume com suplemento**

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

- **Instituição como autor**

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

- **No prelo (forthcoming)**

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

Livros e outras monografias

- **Indivíduo como autor**

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

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

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

- **Instituição como autor e editor**

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

- **Capítulo num livro**

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

- **Resumo/Trabalho de congresso publicado**

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

- **Dissertação/Tese**

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

Material legal

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

Os elementos essenciais são: competência (país, estado ou cidade ou nome da entidade ou órgão no caso de se tratar de normas), título (especificação da legislação, número e data), ementa e título da publicação oficial, local da publicação oficial (cidade), data (dia, mês abreviado e ano), seção e paginação. Exemplos:

Brasil. Portaria nº 695 de 1998 da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 30 mar. 1998. Seção 1, nº 60-E, p. 5-6.

Brasil. Resolução nº 16, de 13 de dez. 1984 do Conselho Federal de Educação. Dispõe sobre reajustamento de taxas, .. e altera a redação do artigo 5 da Resolução n.1 de 14/1/83. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 13 dez. 1984. Seção 1, p. 190-1.

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

Conselho Nacional do Meio Ambiente [CONAMA]. Resolução n. 315, de 29 out 2002: dispõe sobre as novas etapas do Programa de controle da poluição do ar por veículos automotores (Proconve). Brasília (DF); Diário Oficial da União; 15 mar 2002.

Material Eletrônico

- Artigo de revista em formato eletrônico

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

- Monografia em formato eletrônico

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

- Arquivo de computador

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

Patente

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

Abreviaturas: devem ser evitadas ou usadas apenas as oficiais.

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

Tabelas: as tabelas devem ser encaminhadas em folhas separadas e designadas no texto como "Tabelas". A sua localização aproximada deve ser indicada no texto. Serão numeradas consecutivamente, com números arábicos e encabeçadas pelos respectivos títulos, que devem ser breves e indicar claramente o

conteúdo. Os dados apresentados em tabela não devem ser repetidos em gráficos.

Ilustrações (fotografias, gráficos, desenhos, mapas etc.): as ilustrações devem ser encaminhadas em folhas separadas e designadas no texto como "Figuras": terão numeração única e seqüencial, em algarismos arábicos e devem apresentar na sua parte inferior e fora da área de reprodução, informações breves e claras que esclareçam o conteúdo da mesma. As suas localizações aproximadas devem ser indicadas no texto. Todas as ilustrações devem ser tão claras que permitam sua reprodução com redução de 6,5 cm no sentido da largura, sem perda de nitidez ou legibilidade. As ilustrações coloridas estão sujeitas à confirmação. Se as ilustrações enviadas já tiverem sido publicadas, mencionar a fonte e a permissão para a reprodução.

Da Publicação

1. Os trabalhos destinados à publicação na **Revista do Instituto Adolfo Lutz** deverão ser encaminhados à Biblioteca do Instituto Adolfo Lutz, Setor de Publicações, Av. Dr. Arnaldo, 355, Cerqueira César, São Paulo/SP, 01246-902, a/c: Rocely Bueno.

2. Todo trabalho entregue para publicação deverá ser assinado pelo autor e trazer endereço para correspondência ou endereço eletrônico. No caso de mais de um autor, deverá ser expressamente indicado o responsável pela publicação.

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

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

5. As provas tipográficas serão revisadas pela Comissão de Redação de Publicações Oficiais do Instituto Adolfo Lutz. Essa Comissão se reserva o direito de introduzir alterações nos originais, visando a manutenção da homogeneidade e a qualidade da publicação, respeitando, porém, o estilo e as opiniões dos autores.

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

Da Distribuição

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

SUMÁRIO/CONTENTS

Artigo de Revisão/ Review

- 1053 Aplicações do dióxido de enxofre na manutenção da qualidade de sucos de frutas tropicais**
Use of sulphur dioxide for quality preservation of tropical fruit juices
Geraldo A. MAIA, Andréa S. LIMA, Claisa A. S. FREITAS 1-6
- 1054 Influência da dieta alimentar na composição de ácidos graxos em pescado: aspectos nutricionais e benefícios à saúde humana**
Influence of fish feeding diet on its fatty acid composition : nutritional aspects and benefits to human health.
Neiva Maria de ALMEIDA, Maria Regina BUENO FRANCO 7-14

Artigos Originais/ Original Articles

- 1055 Atividade antioxidante do α -tocoferol e do extrato de alecrim em óleo de soja purificado**
Antioxidant activity of α -tocopherol and rosemary extract in purified soybean oil
Valéria C. RAMALHO, Neuza JORGE 15-20
- 1056 Influência de nutrientes no crescimento fúngico e na produção de fumonisinas e aflatoxinas em grãos de milho**
The nutrients effect on mycoflora, and for fumonisins and aflatoxins production in corn grain
Regina H. HASSEGAWA, Patrícia ZORZETE2, Tatiana A. REIS, Antonio Luiz FANCELLI, Homero FONSECA, Adriana P. de ALMEIDA, Benedito CORRÊA 21-26
- 1057 Avaliação físico-química e microbiológica de suco e néctares de maçã comercializados em cidades do Estado de São Paulo**
Physical-chemical and microbiological evaluation of apple juice and nectar marketed in cities located in São Paulo State.
Maria Helena IHA, Silvia C. CASTRO, Eliana G. A. RIBEIRO, Ricardo O. ANDRADE, Myrna SABINO 27-31
- 1058 Desoxinivalenol (DON) em trigo e farinha de trigo comercializados na cidade de São Paulo.**
Deoxynivalenol (DON) in wheat: occurrence in samples commercialized in the São Paulo city.
Leda C.A.LAMARDO, Sandra A.NAVAS, Myrna SABINO 32-35
- 1059 Resistência térmica de *Salmonella Enteritidis*, *S. Panama* e *S. Infantis* em fórmula láctea infantil reconstituída.**
Salmonella Enteritidis, *S. Panama* and *S. Infantis* thermal resistance in reconstituted infant milk formula.
Ruth Estela G. ROWLANDS, Alexandra André dos S. PAPASIDERO, Ana Maria R. de PAULA, Cristiane B. CANO, Dilma S. GELLI 36-39

- 1060 **Enxaguatórios bucais: avaliação da eficácia antimicrobiana de produtos comercialmente disponíveis**
Mouthwashes: antimicrobial efficacy assessment in commercially available products
Adriana BUGNO , Maria Aparecida NICOLETTI , Adriana A. B. ALMODÓVAR , Tatiana C. PEREIRA,
Mariângela T. AURICCHIO 40-45
- 1061 **Surto de intoxicação alimentar estafilocócica no município de Birigüi, São Paulo**
Food-borne staphylococcal intoxication outbreak in Birigüi municipality, São Paulo State
Aparecida de Fátima MICHELIN, Luiz Simeão do CARMO, Iracilda Zeppone CARLOS 46-49
- 1062 **Aspectos morfológicos e morfométricos do cérebro de ratos na intoxicação crônica pelo organofosforado metamidofós**
Morphological and morphometric aspects of rats brain in chronic organophosphate intoxication
Nilda M. PEREZ ,Edenilson E. CALORE , Liz VILELA-DE-ALMEIDA, Emerson S. NARCISO, Flávio R.
PUGA 50-53
- 1063 **Polysaccharide production of *Neisseria meningitidis* serogroup C varying inoculum and initial glucose concentration**
Produção de polissacarídeo de *Neisseria meningitidis* sorogrupo C variando o inóculo e a concentração inicial de glicose
Luciana Juncioni de ARAUZ, Júlia BARUQUE-RAMOS, Haroldo HISS, Rose Leila MOTA, Maria Esther RICCI-SILVA, Isaias RAW 54-58
- 1064 **Avaliação da sensibilidade de *Daphnia magna* Straus, 1820 (Cladóceras, Crustácea) ao dicromato de potássio**
Evaluation of sensitivity *Daphnia magna* Straus, 1820 (Cladóceras, Crustácea) to the potassium dichromate
Ana Claudia B. ALVES, Jacira SILVANO 59-61
- 1065 **Exame direto no diagnóstico de *Paracoccidioides brasiliensis* realizados nos Laboratórios Regionais do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brasil**
Use of direct microscopic examination for *Paracoccidioides brasiliensis* diagnosis at Instituto Adolfo Lutz (IAL) Regional Laboratories Network, state of São Paulo, Brazil
Sérgio S. MOREIRA, Jaqueline O. SILVA, Maria do Carmo A. M. MEIRA, Leonilda C. GALLE, Elizabete C. A. RODRIGUES, Milena Z. GARCIA, Jane P. SANTOS, Maria Cecília B. SOARES, Aguida MARIA, Rosana Bellan de OLIVEIRA E SILVA 62-65
- Comunicação Breve/ Short Communication
- 1066 **A determinação de nitrato em águas por espectrofotometria UV: usos e precauções**
Nitrate determination in water by means of UV spectrophotometry: uses and precautions
Marco A. M. SOUTO, Marina M. OKADA, Isaura A. OKADA, Sérgio DOVIDAUSKAS 66-70

RESUMOS DE TESES E DISSERTAÇÕES

- Nasal immunization in rabbits with *Neisseria lactamica*: the importance of the cross reactive antigens**
Imunização nasal em coelhos com *Neisseria lactamica* : importância dos antígenos de reatividade cruzada.
Tunes, C. F 71
- Ação antioxidante do α -tocoferol e do extrato de alecrim em óleo de soja submetido à termoxidação**
Antioxidant action of α -tocopherol and rosemary extract in soybean oil under thermoxidation.
Ramalho V. C 72

Aplicações do dióxido de enxofre na manutenção da qualidade de sucos de frutas tropicais

Use of sulphur dioxide for quality preservation of tropical fruit juices

RIALA6/1053

Geraldo A. MAIA^{1*}, Andréa S. LIMA¹, Claisa A. S. FREITAS¹

* Endereço para correspondência: Universidade Federal do Ceará, Departamento de Tecnologia de Alimentos, caixa postal 12168, CEP 60356-000, Fortaleza/CE. e-mail: frutos@ufc.br

^{1*} Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE.

Recebido: 04/01/2005 – Aceito para publicação: 04/08/2005

RESUMO

A qualidade dos sucos de frutas tropicais é influenciada por fatores microbiológicos, enzimáticos e químicos, que podem comprometer suas características sensoriais, nutricionais e a saúde do consumidor. Para a conservação de sucos de frutas a legislação brasileira permite o uso do dióxido de enxofre como um aditivo alimentar. O presente trabalho apresenta uma revisão sobre o uso do dióxido de enxofre e seus respectivos sais na manutenção da qualidade de sucos de frutas tropicais industrializados, com ênfase em seu modo de ação e aspectos toxicológicos.

Palavras-Chave. sucos de frutas tropicais, dióxido de enxofre, conservador, vida-de-prateleira.

ABSTRACT

Microbiological, enzymatic and chemical factors interfere on the quality of tropical fruit juices, and impairments can be caused on their sensory and nutritional characteristics, and also on consumers health. The Brazilian legislation allows the use of sulphur dioxide as a food additive for fruit juice conservation. The present paper presents a revision on the use of sulphur dioxide and their respective salts for preserving the quality of industrialized tropical fruit juices, and gives emphasis on their mode of action, and on toxicological aspects.

Key Words. tropical fruit juices, sulphur dioxide, preservative, shelf life.

SUMÁRIO

Introdução	1
Aspectos gerais	2
Atividade antimicrobiana	2
Controle do escurecimento enzimático	3
Controle do escurecimento não enzimático	4
Aspectos toxicológicos	4
Legislação	5
Considerações finais	5
Referências	5

INTRODUÇÃO

Os sucos de frutas são consumidos e apreciados em todo o mundo, não só pelo seu sabor, mas, também, por serem fontes naturais de carboidratos, carotenóides, vitaminas, flavonóides, minerais e outros componentes importantes. A inclusão na dieta de componentes encontrados em frutas e suco de frutas pode ser importante na prevenção de doenças e para uma vida mais saudável^{1,2,3}.

A produção de sucos no cenário do agronegócio nacional e internacional é vista como uma das atividades mais promissoras no ramo alimentar⁴. Segundo Agriannual⁵, a produção mundial de sucos é de cerca de 20 bilhões de litros/ano. O Brasil tem a liderança mundial das exportações de sucos de laranja e cítricos, e ocupa a 8ª posição no ranking dos exportadores de sucos de frutas tropicais⁶. Os novos hábitos modernos, induzindo ao consumo de produtos naturais, justificam a demanda crescente deste produto no mercado internacional.

No Brasil, diversas indústrias de sucos de frutas tropicais utilizam um método de conservação misto, associando a aplicação do processo térmico de pasteurização com a adição de aditivos químicos, que atuam como conservadores inibindo o crescimento microbiano, a atividade enzimática e as reações químicas que ocasionam alterações indesejáveis nas características microbiológicas, nutricionais e sensoriais do suco. Os conservadores químicos normalmente usados pelas indústrias do setor são combinações de ácido benzóico e dióxido de enxofre na forma de seus respectivos sais de sódio e potássio.

O dióxido de enxofre (SO₂) atua como branqueador e conservador sendo o mais utilizado e eficaz em alimentos e reconhecido como GRAS pelo Food and Drug Administration (FDA)^{7,8}, ou seja, é considerado geralmente seguro para uso em alimentos quando usado de acordo com as boas práticas de manufatura e dentro dos níveis recomendados para cada alimento^{8,9}.

Considerando a grande tendência e potencial de crescimento do mercado de sucos de frutas tropicais e a importância dos conservadores químicos para a preservação destes produtos, procurou-se, nesta revisão, reunir informações sobre o uso do dióxido de enxofre e seus respectivos sais na manutenção da qualidade de sucos de frutas industrializados.

Aspectos gerais

O dióxido de enxofre é um dos mais antigos conservadores utilizados nas indústrias de alimentos¹⁰. É um gás incolor, não inflamável, de odor sufocante, que se liquefaz a - 10°C¹¹. Devido às dificuldades no seu manuseio e solubilidade são utilizados sais derivados em substituição, tais como: sulfito de potássio, bissulfito de sódio, metabissulfito de sódio e metabissulfito de potássio¹². Em soluções aquosas (Figura 1), o dióxido de enxofre e sais derivados formam ácido sulfuroso (H₂SO₃), íons sulfito (SO₃⁼) e bissulfito (HSO₃⁻), sendo que a proporção relativa de cada forma depende do pH do meio, força iônica e concentração^{8,10,13}.

Os sulfitos têm diversas funções nos alimentos e bebidas, atuando como agentes sanitizantes⁷, antioxidantes,

antimicrobiano e inibidores do escurecimento^{7,8,14,15,16,17,18}. Segundo Taylor¹⁹, os sulfitos são os mais úteis de todos os conservadores usados em alimentos em face do seu amplo espectro de ação e por serem considerados seguros. As propriedades físicas e químicas do dióxido de enxofre e sais derivados são apresentadas na Tabela 1.

Atividade antimicrobiana

Embora se conheça pouco sobre o mecanismo de ação do dióxido de enxofre e derivados sobre os microrganismos, acredita-se que a forma não dissociada do ácido sulfuroso (H₂SO₃) seja responsável pela atividade antimicrobiana, devido a maior facilidade de penetração através das membranas celulares. Tal fato é sustentado pela maior eficiência destes compostos a baixo pH^{10,20,21}. Uma outra hipótese é que a atividade antimicrobiana seja devida ao seu forte poder redutor, com esses compostos reduzindo a tensão de oxigênio a um ponto abaixo do requerido pelos microrganismos aeróbios ou pela ação direta sobre o sistema enzimático²⁰.

O pH do produto é provavelmente a propriedade que mais influencia a ação antimicrobiana do dióxido de enxofre e sais derivados. Baixos pHs potencializam a atividade antimicrobiana deste conservador²², pois em meio ácido há uma maior predominância da forma não dissociada do ácido sulfuroso. A Figura 2 apresenta as proporções de H₂SO₃, HSO₃⁻ e SO₃⁼ em solução aquosa em função dos valores de pH²³.

Na faixa de pH dos sucos de frutas (3,0 - 4,5), o íon bissulfito (HSO₃⁻) e o ácido sulfuroso (H₂SO₃), são as formas predominantes e, possivelmente, as formas ativas no controle

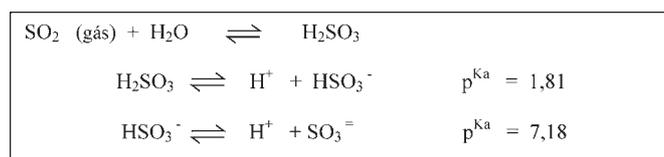


Figura 1. Dissolução do dióxido de enxofre e sais derivados.

Tabela 1. Propriedades físicas e químicas do dióxido de enxofre e sais derivados.

Composto	Características
Dióxido de enxofre (SO₂)	Gás incolor, não inflamável, de odor sufocante, que se liquefaz a - 10°C. Quando aplicado na água dissolve-se, originando o ácido sulfuroso (H ₂ SO ₃) e seus íons sulfito (SO ₃ ⁼) e bissulfito (HSO ₃ ⁻).
Sulfito de sódio (Na₂SO₃)	Pó branco a castanho, inodoro, 1g dissolve-se em 4 ml de água, dando origem a H ₂ SO ₃ em pH baixo.
Sulfito de potássio (K₂SO₃)	Pó branco, inodoro, 1g dissolve-se em 3,5 ml de água.
Bissulfito de sódio (NaHSO₃)	Pó branco, cristalino, com odor de SO ₂ , 1g dissolve-se em 3,5 ml de água.
Bissulfito de potássio (KHSO₃)	Pó branco, cristalino, com odor de SO ₂ , bastante solúvel em água.
Metabissulfito de sódio (Na₂S₂O₅)	Pó ou cristal branco, com odor de SO ₂ , altamente solúvel em água.
Metabissulfito de potássio (K₂S₂O₅)	Pó ou cristal branco, com odor de SO ₂ , altamente solúvel em água.

Fonte: Leitão³¹. (pág. 4 no texto)

de bolores, leveduras e bactérias. Em pH maior que 4,5, o bissulfito (HSO_3^-) inibe bactérias mas não leveduras. De acordo com Lindsay¹⁰ e Luck²¹, o mecanismo de inibição do bissulfito na célula se explica por meio das seguintes reações: redução de ligações bissulfídricas essenciais em enzimas; formação de compostos de adição que interferem na cadeia respiratória; reações com aminoácidos, pirimidinas e nucleosídeos. Então, a ação mais patente dos sulfitos contra microrganismos é seu ataque a distintos pontos da estrutura enzimática da célula. Há bastante tempo, se conhece a ação inibidora dos sulfitos sobre as enzimas com o grupo SH²⁴. A grande sensibilidade destas enzimas aos sulfitos está relacionada com o efeito inibitório primário nas reações dependentes do NAD⁺¹⁶. Segundo Wong²⁵, a atividade antimicrobiana dos sulfitos depende da penetração do SO₂ molecular através da membrana celular. Tem-se sugerido que o dióxido de enxofre ativa um sistema ATPase localizado na membrana celular. Uma vez no interior da célula, o SO₂ pode interagir com diversos compostos celulares, como cofatores, coenzimas, aminoácidos, pirimidinas e nucleosídeos. De acordo com Simão²⁶, o dióxido de enxofre reage também com o DNA, formando ligações cruzadas com resíduos de ácidos nucleicos. A peroxidação de lipídeos devido à presença do SO₂ causa danos nas membranas celulares, que podem avariar o sistema de transporte de nutrientes dos microrganismos.

A concentração mínima de dióxido de enxofre necessária para a inibição de microrganismos varia, dependendo de fatores como tipo de microrganismo, substrato e pH do meio¹⁶.

Os valores apresentados nas Tabelas 2 e 3 equivalem às quantidades mínimas de sulfito de sódio necessárias quando se utiliza apenas este conservador químico como agente antimicrobiano. No entanto, os sucos de frutas tropicais são formulados com teores de dióxido de enxofre inferiores aos valores referidos por Luck e Jager¹⁶, pois apresentam baixo pH

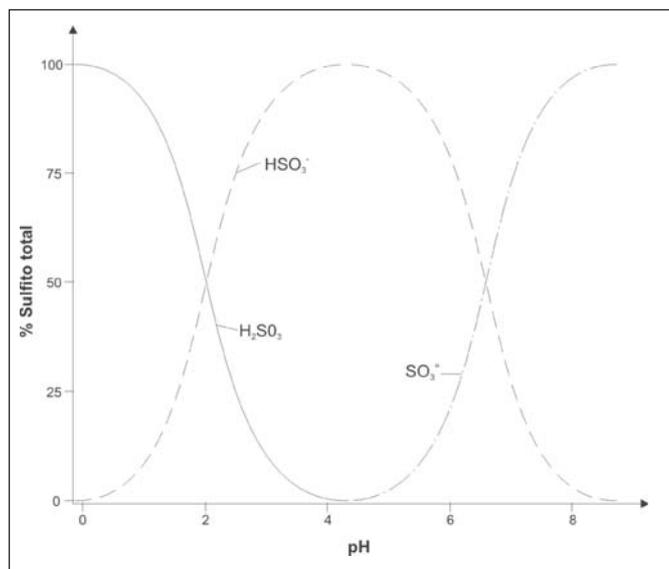


Figura 2. Proporções de ácido sulfuroso (H_2SO_3), íons sulfito (SO_3^{2-}) e bissulfito (HSO_3^-) em solução aquosa. (pág. 5 no texto)³

e podem ter também adição de ácido benzóico.

O ácido benzóico apresenta atividade contra fungos, leveduras e bactérias, sendo mais eficiente contra bactérias e leveduras do que contra fungos^{22,27}. Entretanto, o ácido benzóico utilizado em alimentos ácidos age essencialmente inibindo fungos e leveduras, uma vez que valores de pH menor que 4,5 são geralmente suficientes para prevenir o crescimento bacteriano neste tipo de alimento^{28,29,30}. Como agente antimicrobiano o ácido benzóico apresenta ação sinérgica com dióxido de enxofre^{22,31}. Este ácido é considerado substância GRAS (“Generally Recognized as Safe”) pelo Food and Drug Administration (FDA), o que torna seguro o seu uso nas concentrações recomendadas para adição nos alimentos^{32,33}.

Controle do escurecimento enzimático

As enzimas envolvidas no processamento de frutas que causam alterações na cor dos alimentos são de natureza oxidativa

Tabela 2. Ação inibidora do dióxido de enxofre frente às bactérias (pH 6,0).

Microrganismo	Concentração mínima de sulfito de sódio (ppm)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	500
<i>Pseudomonas effusa</i>	500
<i>Pseudomonas ovalis</i>	1000
<i>Staphylococcus aureus</i>	800
<i>Lactobacillus casei</i>	1000
<i>Lactobacillus arabinosus</i>	550
<i>Escherichia coli</i>	1000 - 2000
<i>Aerobacter aerogenes</i>	1000
<i>Bacillus subtilis</i>	500
<i>Bacillus megatherium</i>	500
<i>Bacillus cereus var. mycoídes</i>	500

FONTE: Luck e Jager³⁵.

Tabela 3. Ação inibidora do dióxido de enxofre frente às leveduras e bolores.

Microrganismos	pH	Concentração mínima de sulfito de sódio (ppm)
Leveduras		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4,0	800 - 1600
<i>Saccharomyces ellipsoideus</i>	2,5 - 3,5	200 - 800
<i>Zygosaccharomyces nussbanmii</i>	4,0	2000
<i>Hansenula anomala</i>	5,0	2400
Bolores		
<i>Mucor species</i>	2,5 - 3,5	300 - 600
<i>Penicillium glaucum</i>	4,5	2800
<i>Penicillium species</i>	5,0	1600 - 4000
<i>Penicillium species</i>	2,5 - 3,5	200 - 600
<i>Aspergillus niger</i>	4,5	2200

FONTE: Luck e Jager³⁵.

e atuam sobre os substratos naturais encontrados nas frutas, produzindo substâncias coloridas e podendo ocasionar alterações no sabor, no aroma e no valor nutritivo^{34,35}.

As principais enzimas relacionadas com o escurecimento enzimático de sucos de frutas são a polifenoloxidase (PPO), ácido ascórbico oxidase e peroxidase (POD). A polifenoloxidase, na presença do oxigênio, pode catalisar muitas reações envolvendo compostos fenólicos naturalmente encontrados em muitas frutas. Dentre os compostos naturais, encontrados nas frutas, mais susceptíveis à ação da polifenoloxidase se destacam o catecol, a tirosina, os ácidos clorogênico, caféico, gálico e ascórbico, as hidroquinonas, as antocianidinas e os flavonóides^{34,35}. Esta enzima, na presença de oxigênio, catalisa a hidroxilação de monofenóis aos correspondentes orto-dihidroxifenóis (atividade cresolase) oxidando-os a orto-quinonas (atividade catecolase)^{36,37,38,39,40}. A reação do escurecimento prossegue através de oxidações não enzimáticas ocorrendo, finalmente, a polimerização das quinonas a pigmentos melânicos de cor escura, os quais quimicamente são polímeros amorfos, insolúveis e altamente estáveis, que podem interagir com outros constituintes do meio, particularmente as proteínas, formando complexos coloridos^{17,25,36,38,40,41}. A peroxidase catalisa a oxidação de um aceptor (geralmente um composto fenólico) por meio da água oxigenada, formando tetraguaiacol, um composto amarelo escuro ou marrom. A peroxidase tem-se mostrado a enzima mais termorresistente, e sua inativação térmica constitui, em certas condições, um processo reversível. Sua atividade pode ser restituída total ou parcialmente durante o período de estocagem, a temperaturas baixas ou mesmo em condições ambientes. O ácido ascórbico, na presença de oxigênio, pode ser oxidado pela enzima ácido ascórbico oxidase, originando ácido diidroascórbico que poderá dar origem ao ácido α -cetogulônico e ao furfural e posteriormente a polímeros escuros³⁴. Estas enzimas podem não ser totalmente inativadas durante o processamento dos sucos, uma vez que o alto teor de polpa presente, em geral, nos sucos de frutas tropicais dificulta a ação do processo térmico de inativação destas enzimas.

Os agentes sulfitantes podem prevenir o escurecimento por sua capacidade redutora, agindo competitivamente com o oxigênio, por ação direta sobre a polifenoloxidase ou por combinação irreversível com as orto-quinonas, formando produtos incolores e prevenindo a condensação até melanoidinas^{13,19,36,40,42,43,44,45,46}. A adição de sulfito previne a destruição do ácido ascórbico durante o processamento e estocagem do produto, por evitar a oxidação causada pela enzima ácido ascórbico oxidase¹³.

Controle do escurecimento não enzimático

Os sucos de frutas apresentam características de cor, aroma e sabor bastante peculiares. Estas características tendem a sofrer modificação durante o processamento e estocagem dos mesmos, conduzindo a degradação geral do produto.

Os três mecanismos de escurecimento não enzimático mais importantes nos sucos de frutas são: 1 - reação de Maillard que ocorre entre açúcares redutores e grupos \pm -amino de

aminoácidos, peptídeos e proteínas resultando na formação de melanoidinas (pigmentos marrons); 2 - oxidação do ácido ascórbico (vitamina C) a furfural e ácido alfa-cetogulônico, os quais, na presença de compostos nitrogenados, geram pigmentos marrons escuros; além de gerar pela simples polimerização do furfural formado, pigmentos marrons claros; 3 - caramelização de açúcares que ocorre pela ação de ácidos sobre açúcares, levando à formação de hidroximetilfurfural que se polimeriza gerando as melanoidinas, pigmentos de coloração marrom⁴⁷. As reações de escurecimento não enzimático resultam na destruição de nutrientes tais como aminoácidos essenciais e ácido ascórbico, reduz a digestibilidade de proteínas, inibe a ação de enzimas digestivas e interfere na absorção de minerais por promover a complexação de íons metálicos. Produtos potencialmente tóxicos mutagênicos podem ser formados devido à reação de Maillard¹⁹.

Em geral, o escurecimento não enzimático pode ser inibido ou controlado de várias formas, utilizando-se baixas temperaturas de armazenamento, removendo o oxigênio da embalagem e usando inibidores químicos como os sulfitos⁴⁷. O dióxido de enxofre é provavelmente o mais eficaz dos inibidores do escurecimento não enzimático em alimentos¹⁰. Segundo Riedel⁴⁸, este aditivo possibilita a uniformização da cor e aumenta o prazo de conservação de sucos de frutas industrializados.

O mecanismo químico pelo qual o dióxido de enxofre inibe o escurecimento não enzimático não está totalmente esclarecido, acreditando-se que se trata de reações do bissulfito com os grupos carbonila ativos das moléculas de açúcares e vitamina C¹⁰. Segundo Araújo¹³, o SO₂ atua como inibidor da reação de escurecimento, bloqueando a carbonila e prevenindo a condensação destes compostos pela formação irreversível de sulfonatos interrompendo a seqüência de reações que levaria a formação de melanoidinas. Entretanto, o uso do dióxido de enxofre pode levar a sabor e aroma desagradáveis⁴⁹, bem como a destruição da vitamina B1 no alimento^{8,49,50,51,52}.

O sulfito interage com vários constituintes presentes nos alimentos, incluindo: açúcares redutores, aldeídos, cetonas, proteínas e antocianinas⁵³, sendo que o sulfito na forma ligada é reduzido em alimentos ácidos. A extensão da reação depende do pH, temperatura, concentração de sulfito e componentes reativos presentes no produto. A reatividade do dióxido de enxofre é muito alta, e durante o processamento e estocagem do produto freqüentemente ocorrem perdas consideráveis de SO₂^{7,16}.

Aspectos toxicológicos

Um dos princípios que regulam o emprego de aditivos alimentares é sua inocuidade, porém, é impossível determinar uma prova absoluta da sua toxicidade para todos os seres humanos. Os ensaios toxicológicos se referem aos efeitos fisiológicos em animais experimentais em relação a um determinado coeficiente de ingestão.

O FDA (Food and Drug Administration) há muito tempo incluiu o dióxido de enxofre, sulfito, bissulfito e metabissulfito

de sódio e potássio na lista GRAS (“Generally Recognized as Safe”). O JECFA (Comitê Conjunto FAO/OMS de Peritos em Aditivos Alimentares) também considera os sulfitos seguros para uso em alimentos e estabeleceu uma ingestão diária aceitável de 0,7 mg/Kg de peso corpóreo¹⁹.

Por solicitação do FDA, a Federação das Sociedades Americanas para Experimentos Biológicos (FASEB) criou um Comitê “*ad hoc*” em 1984 para se examinar o status “GRAS” para sulfitos. Referido grupo concluiu que os sulfitos não são teratogênicos, mutagênicos ou cancerígenos em animais de laboratório. Não encontraram também nenhum dado toxicológico ou metabólico significativo⁵⁴.

Os sulfitos costumavam ser populares com os proprietários de restaurantes para uso em saladas porque mantinham as frutas e os vegetais crus com aparência fresca, mas seu uso foi banido depois que algumas pessoas sofreram reações alérgicas perigosas. O FDA agora proíbe o uso de sulfito em alimentos que serão ingeridos crus, com exceção de uvas⁵⁵, e exige que produtos contendo mais de 10 ppm de dióxido de enxofre declarem seu uso no rótulo⁵⁶. Vale ressaltar que em alimentos ácidos sulfitados (pH < 4,0) o SO₂ pode ser volatilizado e perdido. Portanto, em muitos alimentos somente uma pequena fração do sulfito adicionado permanece na forma livre no produto final¹⁸.

Segundo Sizer e Whitney⁵⁵, para a maioria das pessoas os sulfitos não impõem um risco nas quantidades normalmente usadas, mas de acordo com Pizzoferrato et al.⁸ os sulfitos apresentam efeitos antinutricionais, interagindo com algumas vitaminas, como piridoxal, nicotinamida, tiamina e ácido fólico, reduzindo a qualidade nutricional dos alimentos processados. No entanto, Bragagnolo et al.⁵⁷ afirma que os efeitos biológicos dos agentes sulfitantes não estão completamente elucidados.

O dióxido de enxofre e os sulfitos são biotransformados a sulfatos e excretados na urina sem qualquer dano patológico^{15,20,51,58}. A biotransformação do sulfito consiste da sua oxidação para sulfato, pela ação da enzima sulfito oxidase localizada na mitocôndria presente nos tecidos, principalmente, do coração, fígado e rins. No organismo humano, esta enzima também converte de aminoácidos sulfurosos (cisteína e metionina) em sulfitos. Esse processo metabólico normal controla o excesso desses aminoácidos, oxidando-os a sulfatos, os quais são facilmente eliminados. Em todas as espécies estudadas, a maioria do sulfito ingerido é rapidamente excretada na forma de sulfato, o qual pode interagir com proteínas, formando complexo proteína-tiosulfonato que pode persistir no organismo. Indivíduos asmáticos e deficientes em sulfito oxidase toleram até uma determinada quantidade de sulfito sem apresentarem sensibilidade. Existe uma outra enzima não tão específica que oxida também sulfito a sulfato, a xantina oxidase²¹. De acordo com Taylor¹⁹, o único efeito adverso associado com sensibilidade ao sulfito é a asma embora somente uma pequena porcentagem de asmáticos sejam sensíveis ao sulfito.

Legislação

Denomina-se aditivo alimentar qualquer ingrediente adicionado intencionalmente aos alimentos, sem propósito de nutrir, com o objetivo de modificar as características físicas, químicas, biológicas ou sensoriais, durante a fabricação, processamento, preparação, tratamento, embalagem, acondicionamento, armazenagem, transporte ou manipulação de um alimento⁵⁹. No entanto, o conceito de aditivo alimentar é bastante variável de país para país. Uma determinada substância pode ser utilizada como aditivo por um país e ter seu uso proibido no outro⁶⁰.

No Brasil, os aditivos estão classificados em 23 classes funcionais entre as quais está a dos conservadores, definidos como substâncias que impedem ou retardam a alteração dos alimentos provocada por microrganismos ou enzimas. O dióxido de enxofre e seus derivados estão enquadrados como conservadores⁵⁹.

A Resolução nº 04/88 do Conselho Nacional de Saúde (CNS), do Ministério da Saúde⁶¹ permite a adição de no máximo 200 mg/Kg de dióxido de enxofre em sucos de frutas. Entretanto, no caso específico do suco de caju se faz necessário o emprego de níveis mais elevados de dióxido de enxofre que o utilizado para outros sucos de frutas, de modo a se evitem as reações de escurecimento e perda das características de aroma, sabor e valor nutritivo. A Resolução nº 12/02 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), do Ministério da Saúde⁶², estabelece o limite máximo de dióxido de enxofre no suco de caju com alto teor de polpa em 300 mg/100ml, devendo-se considerar que este deverá ser diluído com água na proporção 1:9 antes do consumo.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A conservação de sucos de frutas tropicais pela adição do dióxido de enxofre seguida de tratamento térmico é o método mais utilizado pelas indústrias processadoras, visto que este aditivo apresenta comprovada ação no controle de microrganismos e do escurecimento enzimático e não-enzimático, contribuindo significativamente na manutenção da qualidade dos sucos industrializados, por um maior período de tempo. Além disso, este aditivo é considerado seguro sob o ponto de vista toxicológico, desde que não exceda os limites permitidos pela legislação brasileira.

REFERÊNCIAS

1. Blenford DE. Winner drinks: use of amino acids and peptides in sports nutrition. *Int Food Ingrid* 1996; 3: 20-5.
2. Broek AVD. Functional Foods: The japanese approach. *Int Food Ingrid* 1993; 5: 4-10.
3. Shils ME, Olson JA, Shike M. *Modern nutrition in health and disease*. 8th ed. Philadelphia: Lea & Febiger; 1994. 210 p.

4. Associação das Indústrias Processadoras de Frutas Tropicais. Relatório sobre exportações de sucos de frutas. Aracaju; 2001. [http://tropicaljuice.com.br]. 20 maio 2002.
5. Agrianual. Anuário da agricultura brasileira. São Paulo: FNP Consultoria & Comércio; 2004. 545 p.
6. Tropical Juice. Cenário Mundial. Mercados externos para sucos tropicais. [http://www.tropicaljuice.net/port/mbd_indice.html]. 14 fevereiro 2004.
7. Behre LM. Sulfite food additives: to ban or not ban? *Dairy Food Sanit* 1986; 6: 386-90.
8. Pizzoferrato L, Di Lullo G, Quattrucci E. Determination of free, bound and total sulphites in foods by indirect photometry-HPLC. *Food Chem* 1998; 63: 275-9.
9. Fazio T, Warner CR. A review of sulphites in foods: analytical methodology and reported findings. *Food Addit Contam* 1990; 7: 433-54.
10. Lindsay RC. Química de los alimentos. In: Fennema OR, editor. Aditivos alimentar. Zaragoza: Acribia; 1993. p.709-773.
11. Leitão MF. Microbiologia de sucos, polpas e produtos ácidos. In: Leitão MF, editor. Industrialização de frutas. ITAL: Campinas; 1988. p.47- 76.
12. Nisida ALC. Fatores envolvidos na sulfitação/dessulfitação de sucos. *Colet ITAL* 1991; 21: 12-20.
13. Araújo JMA. Química de Alimentos: teoria e prática. 2ed., Viçosa: UFV; 1999. 350p.
14. Adams JB. Food additive-additive interactions involving sulphur dioxide and ascorbic and nitrous acids - a review. *Food Chem* 1997; 59: 401-9.
15. Lindsay RC. Food chemistry. In: Fennema OR, editor. Food additives. 3rd ed. New York: Basel; 1996. p.767-823.
16. Luck E, Jager M. Antimicrobial food additives: Characteristics uses effects. 2nd ed. New York: Springer; 1995. 200 p.
17. Sapers GM. Browning of foods: control by sulfites, antioxidants and other means. *Food Technol* 1993; 47: 75-84.
18. Walker R. Sulphiting agents in foods: some risk/benefit considerations. *Food Addit Contam* 1985; 2: 15-24.
19. Taylor S.L. Why Sulfite Alternatives? *Food Technol* 1993; 47: 14-5.
20. Franco BDGM, Landgraf M. Microbiologia de alimentos. São Paulo: Atheneu; 1996. 182 p.
21. Luck E. Conservación química de los alimentos. Zaragoza: Acribia; 1981. 107 p.
22. Sofos JN. Antimicrobial agents. In: Maga JA, Tu AT, editores. *Food Addit. Toxicol.*, New York: Marcel Dekker Inc.; 1995. p.501-29.
23. King A, Ponting J, Sanschuck D, Jackson R, Mihara K. Factors affecting death of yeast by sulphur dioxide. *J Food Prot* 1981; 49: 92-7.
24. Araújo JMA. Conservadores químicos em alimentos. *Bol SBCTA* 1990; 24: 192-210.
25. Wong DWS. Química de los alimentos: Mecanismos y teoría. Zaragoza: Acribia; 1995. 476 p.
26. Simão AM. Aditivos para alimentos sob o aspecto toxicológico. 2nd ed. São Paulo: Nobel; 1989. 161 p.
27. Klimble C.H. Chemical food preservatives. In: Block SS, editor. *Disinfection, sterilization and preservation*. Philadelphia: Lea & Febiger; 1977. p.834-58.
28. Chipley, JR. Sodium benzoate and benzoic acid. In: Davidson PM, Branen AL, editores. *Antimicrobials in foods*. New York: Marcel Dekker; 1993. p.11-48.
29. Tfouni SAV, Toledo MCF. Conservadores ácido benzóico e ácido sórbico - uma revisão. *Bol SBCTA* 2001; 35: 41-53.
30. Wagner MK, Moberg LJ. Present and future use of traditional antimicrobials. *Food Technol* 1989; 43: 143-7.
31. Smith J. *Food Additive User's Book*. London: Blackie Academic & Professional; 1997. 346 p.
32. Frias I, Alvarez R, Sierra AH. Aspectos bromatológicos y toxicológicos de los conservantes benzoico y sorbico. *Aliment* 1996; 96: 109-14.
33. Robach MC Use of preservatives to control microorganisms in food. *Food Technol* 1980; 34: 81-4.
34. Laderoza M, Draetta IS. Enzimas e pigmentos: Influencias e alterações durante o processamento. In: Soler MP, editor. *Manual de industrialização de frutas*. ITAL: Campinas; 1991. p.17-30.
35. Menezes HC, Draetta IS. Bioquímica das frutas tropicais. In: Menezes HC, Draetta IS, editores. *Alguns aspectos tecnológicos das frutas tropicais e seus produtos*. São Paulo: ITAL - Série Frutas Tropicais n.10; 1980. p. 9-17.
36. Galeazzi MAM. Comportamento das polifenoloxidasas em alimentos. *Arch Lat Amer Nutr* 1984; 34: 269-89.
37. Macheix JJ, Sapis JC, Fleuriet A. Phenolic compounds and polyphenoloxidase in relation to browning in grapes and wines. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1991; 30: 441-86.
38. Mendonça SC, Guerra NB. Métodos físicos e químicos empregados no controle do escurecimento enzimático de vegetais. *Bol SBCTA* 2003; 37: 113-8.
39. Nicolas JJ, Richard-Forget FC, Goupy PM, Amiot MJ, Aubert SY. Enzymatic browning reactions in apple and apple products. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1994; 34: 109-57.
40. Vámos-Vigyázó L. Polyphenoloxidase and peroxidase in fruits and vegetables. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1981; 15: 49-127.
41. Fennema OR. Química de los alimentos. Zaragoza: Acribia; 1992. 1095 p.
42. Embs RJ, Markakis P. The mechanism of sulfite inhibition of browning caused by polyphenol oxidase. *J Food Sci* 1965; 30: 753-8.
43. Gould GW, Russell NJ. Food preservatives. In: Russell NJ, Gould GW, editores. *Sulphite*. New York: AVI book published; 1991. p.72-88.
44. Haisman DR. The effect of sulfur dioxide on oxidising enzyme systems in plant tissues. *J Sci Food Agric* 1974; 25: 803-10.
45. Mayer AM, Harel E. Polyphenol oxidases in plants. *Phytochem* 1979; 18: 193-215.
46. Valero E, Varón R, García-Carmona F. A kinetic study of irreversible enzyme inhibition by an inhibitor that is rendered unstable by enzymic catalysis. *Biochem* 1991; 277: 869-74.
47. Perera CO, Baldwin EA. Biochemistry of fruits and its implication on processing. In: Arthey D, Ashurst PR, editores. *Fruit processing: nutrition, products and quality management*. 2nd ed. Garthersburg-Maryland: An Aspen Publication; 2001. p. 19-33.
48. Riedel G. Controle sanitário dos alimentos. 2nd ed. São Paulo: Atheneu; 1992. 320 p.
49. Bobbio PA, Bobbio FO. Introdução à química de alimentos. 2nd ed, São Paulo: Varela; 1992. 223 p.
50. Anônimo. Conservantes: técnicas alternativas contra bactérias. *Aditivos & Ingredientes*; 2002. 18 p.
51. Furia TE. *Handbooks of food additives*. 2nd ed, Cleveland: CRC Press; 1981. 246 p.
52. Midio AF, Martins DI. Toxicologia de alimentos. In: Midio AF, Martins DI, editores. *Agentes tóxicos contaminantes direto de alimentos*. São Paulo: Varela; 2000. p. 61-159.
53. Araújo JMA. Química de alimentos: teoria e prática. 1st ed. Viçosa: UFV; 1995. 416 p.
54. Federation of American Societies for Experimental Biology. The reexamination of the GRAS status of sulfiting agents. Report prepared for Center for Food Safety and Applied Nutrition, FDA; 1985.
55. Sizer FS, Whitney EN. Segurança dos alimentos e tecnologia alimentar. In: Sizer FS, Whitney EN, editores. *Nutrição: Conceitos e Controvérsias*. 8th ed. Barueri-SP: Manole; 2003. p.508-45.
56. Food and Drug Administration. Food labeling: declaration of sulfiting agents. *Federal Register*, 51: 25012-20, 1986.
57. 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: 103-7.
58. Wedzicha BL. Chemistry of sulphiting agents in food. *Food Addit Contam* 1992; 9: 449-59.
59. Brasil. Leis, Decretos. Portaria nº 540 do Ministério da Saúde. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 28 out. 1997. nº 208. Aprova o Regulamento Técnico: Aditivos Alimentares - definições, classificação e emprego.
60. Martins MS, Kimura IA, Michelato SR. Legislação de aditivos alimentares. *Food Ingrid* 2003; 25: 84-90.
61. Brasil. Leis, Decretos. Resolução nº 04 do Conselho Nacional de Saúde (CNS). *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 10 jan. 1988. Seção I, p. 24716-23.
62. Brasil. Leis, Decretos. Resolução nº 12 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 10 jan. 2002. [http://www.vigilanciasanitaria.gov.br/anvisa.html]. 01 maio 2005.

Influência da dieta alimentar na composição de ácidos graxos em pescado: aspectos nutricionais e benefícios à saúde humana

Influence of fish feeding diet on its fatty composition: nutritional aspects and benefits to human health

RIALA6/1054

Neiva Maria de ALMEIDA^{1*}, Maria Regina BUENO FRANCO²

¹ UFPB Departamento de Tecnologia Rural/Centro de Formação de Tecnólogos, Campus III, CEP 58.220-000, Bananeiras – PB, e-mail: neivaa@yahoo.com

² UNICAMP - Dep. Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, C.P. 6121, CEP 13081-970, Campinas-SP.

* Autor para correspondência.

Recebido: 29/09/2005 – Aceito para publicação: 15/03/2006

RESUMO

No Brasil tem ocorrido crescimento vertiginoso na criação de peixes de cativeiro de água doce; no entanto existem poucos estudos sobre identificação e quantificação de ácidos graxos em pescados provenientes de cativeiro. Sabe-se que entre diversos fatores, a dieta alimentar do peixe é o fator determinante sobre sua composição lipídica, especialmente quanto aos componentes de ácidos graxos. O objetivo deste trabalho foi de efetuar a revisão de vários estudos, com o intuito de obter um panorama sobre a composição dos ácidos graxos em pescado e, ainda, quanto à influência da dieta sobre a composição de ácidos graxos dos peixes capturados em ambiente natural e dos cultivados em diferentes sistemas. A maioria dos estudos aponta que a composição de ácidos graxos em peixes marinhos apresenta maiores proporções de ácidos graxos poliinsaturados Omega 3 (AGPI- ω 3) do que os peixes de água doce. O ácido graxo palmítico e o oléico atingem os mais altos níveis no pescado de água marinha e de água doce. Na maioria dos peixes, o DHA, o EPA e a-linolênico são as maiores fontes de AGPI ω 3, enquanto o linoléico e o araquidônico contribuem como fonte de AGPI ω 6.

Palavras-Chave. ácidos graxos, composição lipídica, pescado.

ABSTRACT

Although a vertiginous increase in freshwater fish-farming breeding has been occurred in Brazil, there are relatively few studies on fatty acids identification and quantification in fish bred in captivity. It is known that among diverse factors, the fish feeding diet is a determining element on its flesh lipid composition, especially on the composition of nutritionally important fatty acids. The objective of the present study was to reassess some reported studies in order to get an overview on fish fatty acid composition, and on the influence of feeding diet on fatty acid composition of fish caught from natural habitat and those raised in aquaculture. The majority of the studies show that the composition of fatty acids in saltwater fish present higher proportions of polyunsaturated (PUFA- ω 3) Omega 3 fatty acids than freshwater fish. Highest percentages of palmitic and oleic acids are found in both marine and freshwater fishes. For mostly fishes DHA, EPA and linolenic acids are the major sources for PUFA- ω 3, while linoleic and arachidonic acids are the sources for polyunsaturated (PUFA- ω 6) Omega 6 fatty acids.

Key Words. fatty acid composition, fish.

SUMÁRIO

Introdução	8
Essencialidade dos ácidos graxos ω 6 e ω 3: aspectos nutricionais e benefícios à saúde	8
Composição dos ácidos graxos em pescado	8
Influência da dieta na composição em ácidos graxos de peixes capturados em ambiente natural e cultivados em diferentes sistemas	12
Comentários Finais	13
Agradecimentos	14
Referências	14

INTRODUÇÃO

Os lipídios de peixes apresentam ácidos graxos contendo de 10 a 24 átomos de carbonos. Os peixes de água doce contêm elevadas proporções de ácidos graxos saturados e poliinsaturados (C18), mas baixos teores de insaturados com 20 e 22 átomos de carbono, quando comparados aos lipídios de peixes marinhos¹.

A composição de ácidos graxos em lipídios totais é influenciada pelas classes dos lipídios constituintes. Os tecidos ricos em gordura têm os triacilgliceróis como os principais constituintes, enquanto os fosfolipídios predominam naqueles de baixo teor de lipídios. As flutuações sazonais influenciam no conteúdo de lipídios e na composição dos ácidos graxos, havendo variações em peixes de água doce tropical e temperada com a época do ano^{1,2,3}.

A composição dos lipídios nos tecidos dos peixes também pode ser afetada pela dieta e por outros fatores ambientais, tais como salinidade e localização geográfica⁴. O perfil em ácidos graxos de peixes é certamente influenciado por sua dieta¹.

Pesquisas sobre a composição em ácidos graxos em pescado têm sido realizadas nos últimos anos, devido à evidência do papel dos ácidos graxos poliinsaturados ω 3 (AGPI ω 3) na prevenção de doenças cardiovasculares. Esses estudos têm mostrado que a quantidade dos AGPI ω 3 difere entre as espécies e depende de uma série de fatores. O presente trabalho tem como objetivo analisar vários estudos de ácidos graxos em pescado visando obter um panorama sobre a composição dos ácidos graxos em pescado, tanto a nível mundial como a situação específica no Brasil e a influência da dieta na composição em ácidos graxos de peixes capturados em ambiente natural e cultivados em diferentes sistemas.

Essencialidade dos ácidos graxos ω 6 e ω 3: aspectos nutricionais e benefícios à saúde.

A essencialidade dos ácidos graxos tem dois requisitos, em primeiro lugar deve-se saber que tipo de ácido graxo é imprescindível ao organismo e segundo, quais ácidos graxos não podem ser sintetizados pelo homem. Os ácidos graxos poliinsaturados são formados por duas classes de ácidos graxos, a série ω 6 e ω 3, as quais são consideradas essenciais, porque os mamíferos não são capazes de sintetizá-las e devem retirá-los da dieta.

A essencialidade da série ω 6 é conhecida desde 1930, e sua deficiência está associada basicamente a problemas dérmicos. A essencialidade dos ácidos graxos poliinsaturados da família ω 6 (AGPI ω 6) foi verificada em humanos a partir de sintomas dérmicos ocorridos em crianças recém-nascidas submetidas à dieta a base de leite desnatado; sintomas esses revertidos pelo uso de leite integral. Essas observações caracterizaram os efeitos da deficiência de ácidos graxos poliinsaturados em humanos⁵. A essencialidade da série ω 3 demorou a ser caracterizada pela dificuldade em verificar seus efeitos em modelos animais e pelo fato de somente ter sido evidenciada em humanos quando se começou a administrar dietas parentais suplementadas apenas com ácidos graxos da série ω 6.

Estudos têm demonstrado que os ácidos graxos são importantes no desenvolvimento do sistema nervoso central e no funcionamento ideal dos mesmos. A principal fase em que deve haver AGPI ω 3 na dieta é quando há o desenvolvimento rápido do cérebro, em humanos, ocorre do terceiro trimestre da gestação até 18 meses após o nascimento^{5,6}.

Os ácidos graxos apresentam importante papel no tecido biológico porque influenciam propriedades como a integridade, fluidificação, permeabilidade e atividades enzima-membrana; são precursores de eicosanóides; são necessários para manter a impermeabilidade da pele e estão envolvidos no transporte e metabolismo do colesterol. Todos os membros das famílias de ácidos graxos podem ser sintetizados biologicamente a partir dos ácidos graxos oferecidos da dieta. O ácido araquidônico (AA) é sintetizado a partir do ácido parental da série ω 6, o ácido linoléico e o ácido eicosapentaenoico (EPA) e docosahexaenoico (DHA) são sintetizados a partir do ácido α -linolênico, através das enzimas Δ 6, Δ 5 e Δ 4-desaturases^{7,6}.

Simopoulos^{8,9} adverte sobre o aumento da quantidade de AGPI- ω 6 nas dietas ocidentais, uma vez que os produtos metabólicos de eicosanóides produzidos a partir do ácido araquidônico são formados em quantidades maiores do que aqueles produzidos a partir de AGPI- ω 3, especificamente EPA. Atualmente, as dietas contêm pouca e desigual quantidade de AGPI- ω 6 e AGPI- ω 3 e ainda certa quantidade de ácidos graxos trans. As dietas no ocidente contêm maior quantidade de ω 6 devido à indiscriminada recomendação na substituição de ácidos graxos saturados por ω 6. A taxa de ω 3 é menor devido ao pouco consumo de peixe e devido à produção de animais alimentados com grãos ricos em ω 6^{10,11}.

A relação ideal entre ω 6 e ω 3 na dieta diária ainda não está bem estabelecida, porém recomenda-se que a ingestão de linoléico não deva exceder 10% do total de calorias¹⁰. Simopoulos et al.¹² afirmam que nas dietas ocidentais a razão ω 6/ ω 3 é de aproximadamente 20 a 30:1 e recomendam uma proporção de 5:1 até 10:1, valores elevados em relação àqueles considerados ideais de 1:1 a 2:1, enquanto o Department of Health¹³ da Inglaterra recomenda que o valor da razão ω 6/ ω 3 seja no máximo 4.

Composição dos ácidos graxos em pescado

Os peixes de água doce apresentaram maior percentual de ácidos graxos da família ômega 6 enquanto que os peixes marinhos apresentaram maior percentual de ácidos graxos da família ômega 3¹⁴ (Tabela 1 e 2).

De acordo com Henderson & Tocher¹ os peixes de água doce podem conter uma grande quantidade de AGPI- ω 3, assim Wang et al.¹⁴ estudaram 8 espécies de peixes de água doce (*Coregonus zenithicus*, *Coregonus artedii*, *Catostomus commersonni*, *Osmerus mordax*, *Coregonus clupeaformis*, *Lota lota*, *Salvelinus namaycush* e *Salvelinus namaycush siscowet*) de habitat natural e observaram que a concentração de EPA e DHA foi geralmente maior do que a encontrada para o *Clupea harengus*, peixe de origem marinha, e os ácidos graxos da família ω 3 foram os que mais contribuíram para o total de AGPI em todos os peixes estudados (Tabela 2).

Tabela 1. Composição de ácidos graxos de várias espécies de água marinha.

Nome Científico	Saturado						Monoinsaturado						Polinsaturado ω 3						Ácidos graxos							
	14:0	16:0	18:0	16:1	18:1	20:1	18:3	18:4	20:3	20:4	20:5	22:5	22:6	18:2	20:2	20:4	20:4	20:3	20:4	20:5	22:5	22:6	18:2	20:2	20:4	
<i>Merluccius hubbsi</i> ¹⁵	2,8	18,0	3,2	5,2	14,9	4,8	nc	2,6	nc	1,2	6,3	nc	25,7	2,0	nc	nc										
<i>Scomberomorus commersonii</i> ¹⁷	1,1	2,3	0,8	1,1	2,0	0,5	0,58	0,2	3,2	0,3	5,8	3,8	23,3	9,6	nc	nc										
<i>Eleutheronema tridactylum</i> ¹⁷	2,4	3,1	1,1	0,4	0,8	0,2	0,4	0,2	3,5	0,2	5,9	0,8	9,9	18,0	0,2	0,2										
<i>Plotosus spp</i> ¹⁷	2,5	3,4	1,3	0,2	0,7	0,2	0,7	0,4	4,0	0,2	6,7	1,6	10,4	13,2	0,7	0,7										
<i>Parastromateus niger</i> ¹⁷	2,1	4,6	1,6	0,5	1,6	1,0	4,5	0,5	1,6	0,5	5,2	3,1	9,4	9,8	0,3	0,5										
<i>Pampus argenteus</i> ¹⁷	1,6	4,7	1,4	1,2	1,2	0,2	0,6	0,6	0,6	0,6	0,8	2,4	18,9	12,0	nc	0,6										
<i>Chupea fimbriata</i> ¹⁷	1,5	4,4	1,3	2,8	3,8	0,9	1,3	0,2	1,9	0,2	4,3	0,9	17,3	8,7	nc	0,2										
<i>Magalapsis coráyla</i> ¹⁷	1,3	3,1	1,8	0,9	1,3	0,9	0,9	0,4	2,5	nc	5,7	2,7	28,6	7,6	1,3	0,4										
<i>Rastrelliger kanagurta</i> ¹⁷	1,0	3,3	0,9	0,2	1,8	0,9	2,4	0,9	2,1	0,1	4,7	1,9	14,5	16,5	0,1	0,3										
<i>Setarides leptolepis</i> ¹⁷	1,8	2,4	1,6	2,3	2,5	0,3	0,8	0,3	2,4	0,3	3,9	1,8	27,3	9,1	0,5	0,3										
<i>Engraulis encrasicolus</i> ¹⁹	7,4	24,4	4,7	5,3	11,6	3,1	1,3	nc	nc	nc	9,9	0,7	17,7	4,2	nc	0,4										
<i>Sprattus sprattus sprattus</i> ¹⁹	5,4	25,3	11,2	8,6	33,4	2,4	0,3	nc	nc	nc	2,9	1,9	2,3	0,7	nc	0,3										
<i>Trachurus mediterraneus</i> ¹⁹	6,7	16,8	1,9	6,0	11,6	11,2	3,5	nc	nc	nc	6,2	0,3	11,5	3,8	nc	0,7										
<i>Merlangius euxinus</i> ¹⁹	2,9	20,2	6,1	3,7	16,8	2,9	0,3	nc	nc	nc	8,4	0,4	23,7	1,5	nc	0,3										
<i>Mullus barbatus</i> ¹⁹	2,4	23,3	5,9	11,9	27,4	3,8	nc	nc	nc	nc	6,5	3,3	5,1	1,4	nc	0,3										
<i>Belone belone</i> ¹⁹	4,8	24,1	4,4	9,4	18,5	2,0	1,0	nc	nc	nc	3,9	1,6	17,4	4,8	nc	0,0										
<i>Alosa alosa</i> ¹⁹	5,8	19,4	3,5	6,7	26,8	5,1	1,2	nc	nc	nc	4,5	0,9	12,6	3,1	nc	0,9										
<i>Smaris alcedo</i> ¹⁹	9,2	7,8	7,3	8,5	29,3	2,4	0,1	nc	nc	nc	8,7	3,2	9,5	4,1	nc	1,0										
<i>Sarda sarda</i> ¹⁹	6,8	27,2	8,8	7,1	31,1	1,3	1,5	nc	nc	nc	3,8	0,5	0,7	2,2	nc	1,7										
<i>Leiognathus eguilus</i> ²⁰	3,7	21,0	14,0	11,5	17,0	2,0	0,7	0,2	nc	nc	5,7	nc	6,0	1,5	0,5	5,1										
<i>Thunnus germon</i> ²⁰	2,6	29,0	12,0	8,2	22,0	0,9	0,2	0,6	nc	nc	3,1	nc	5,7	1,2	nc	3,9										
<i>Anguilla bengalensis</i> ²⁰	4,9	32,0	12,0	11,0	24,0	2,1	0,4	0,2	nc	nc	1,1	nc	nc	1,3	tr	2,4										
<i>Johnius belangeri</i> ²⁰	2,7	32,0	12,0	9,2	18,0	0,2	0,8	1,0	nc	nc	5,0	nc	5,5	1,3	nc	4,9										
<i>Scomber serombus</i> ²⁰	2,6	26,0	11,0	7,2	14,0	0,2	0,4	0,2	nc	nc	4,3	nc	9,0	1,1	0,6	3,3										
<i>Nemipterus japonicus</i> ²⁰	4,3	43,0	10,0	5,7	14,0	3,0	1,6	1,0	nc	nc	2,4	nc	3,9	1,0	nc	1,5										
<i>Omna strephes sloani</i> ²⁰	1,9	24,0	13,0	nc	7,9	2,0	0,9	0,9	nc	nc	7,3	nc	16,0	0,3	nc	7,1										
<i>Oncorhynchus keta</i> ²⁰	2,2	24,0	12,0	5,1	13,0	3,0	1,2	0,9	nc	nc	3,9	nc	9,1	1,5	nc	3,9										
<i>Scomberoides commersonianus</i> ²⁰	2,8	20,0	16,0	5,5	12,0	0,2	0,5	0,3	nc	nc	2,9	nc	9,4	1,1	tr	2,6										
<i>Rita buchanani</i> ²⁰	2,6	31,0	12,0	8,1	19,0	0,7	0,3	1,1	nc	nc	3,9	nc	6,8	1,0	nc	5,5										
<i>Litanius spp</i> ²⁰	1,1	23,0	13,0	3,5	16,0	tr	tr	nc	nc	nc	3,8	nc	11,0	0,8	nc	11,0										
<i>Hippoglossus hippoglossus</i> ²⁰	1,3	21,0	14,0	16,0	14,0	0,3	0,5	0,4	nc	nc	3,2	nc	13,0	1,5	0,2	7,5										

¹⁵ Méndez & González; ¹⁷ Osman H et al.; ¹⁹ Guiner S et al.; ²⁰ Harun KMY et al.; tr traços; nc não citado

Tabela 2. Composição de ácidos graxos de várias espécies de água doce

Nome Científico	Ácidos graxos																	
	Saturado						Monoinsaturado						Polinsaturado					
	14:0	16:0	18:0	16:1	18:1	20:1	18:3	18:4	20:3	20:4	20:5	22:5	22:6	18:2	20:2	20:4		
<i>Tenualosa ilisha</i> ²⁰	8,4	27,0	9,4	18,7	23,0	1,0	0,3	0,6	nc	nc	5,0	nc	1,1	1,4	nc	20,4		
<i>Labeo rohita</i> ²⁰	2,8	26,0	8,4	12,7	18,0	2,0	6,1	0,3	nc	nc	3,3	nc	2,4	3,9	nc	3,4		
<i>Coregonus zemmithicus</i> ¹⁴	2,9	12,1	1,8	6,3	33,5	1,7	8,0	1,9	1,2	2,2	5,4	1,8	26,4	7,5	1,1	2,3		
<i>Coregonus artedii</i> ¹⁴	6,6	19,1	2,5	5,0	14,2	0,9	12,9	3,8	1,6	2,8	4,9	2,4	5,3	10,3	1,2	2,8		
<i>Catostomus commersonnii</i> ¹⁴	3,4	15,8	2,0	16,6	25,1	0,6	6,8	2,4	1,0	1,0	7,7	2,1	7,2	7,7	0,7	2,9		
<i>Osmerus mordax</i>	5,8	15,4	1,8	8,3	24,5	0,9	14,4	3,4	1,3	1,4	8,6	1,0	7,5	12,0	0,8	4,3		
<i>Coregonus chupeaformis</i> ¹⁴	3,4	12,3	1,6	8,9	24,0	0,9	10,5	3,0	1,0	1,8	6,6	2,0	7,6	9,2	0,9	2,5		
<i>Lota lota</i> ¹⁴	2,8	24,4	3,8	7,1	24,1	0,9	3,8	0,6	0,6	0,8	6,6	2,2	11,4	7,0	0,6	7,9		
<i>S. namaycush namaycush</i> ¹⁴	2,8	12,5	2,5	7,3	28,6	1,0	9,4	1,8	1,5	2,2	4,6	2,0	8,2	9,2	1,0	2,6		
<i>S. namaycush siscowet</i> ¹⁴	3,6	15,3	2,2	9,0	34,6	1,4	6,4	1,2	0,9	1,7	4,8	2,1	7,0	6,8	1,0	2,9		
<i>Brycon cephalus</i> ²⁷	10,4	17,3	8,74	0,3	39,1	0,4	1,6	tr	0,8	Tr	0,2	0,3	1,3	9,3	0,3	0,9		
<i>Colossoma macropomum</i> ²⁷	0,5	14,9	11,4	0,2	32,4	0,6	3,6	tr	0,4	0,1	0,3	0,4	1,3	20,6	0,4	2,0		
<i>Hypophthalmus sp</i> ²	4,9	30,0	8,7	1,3	10,0	0,7	4,3	0,4	0,4	2,3	2,4	0,9	2,0	2,7	0,3	2,3		
<i>Citich ocellaris</i> ²	tr	22,0	9,9	1,2	12,5	0,4	1,9	0,1	0,4	0,3	0,7	1,7	6,9	4,2	0,4	5,7		
<i>Prochilodus nigricans</i> ²	2,0	27,0	6,8	0,8	9,2	1,6	3,6	0,2	0,6	0,7	1,4	0,9	1,5	3,0	0,5	2,8		
<i>Piaractus mesopotamicus</i> ³⁰	3,1	23,5	7,6	8,9	41,0	0,7	0,5	tr	Tr	Tr	tr	tr	0,5	9,4	0,6	0,8		
<i>Prochilodus serofo</i> ³¹	4,3	25,4	5,2	16,3	15,3	1,7	3,7	0,6	0,6	1,1	3,1	1,5	2,4	2,5	0,4	2,6		
<i>Colossoma macropomum</i> ³²	1,3	28,8	9,8	6,3	40,1	1,0	0,5	0,1	0,1	0,1	0,2	0,3	0,8	8,9	0,5	0,7		
<i>Brycon microlepis</i> ²¹	1,6	21,9	15,6	2,3	40,3	0,7	0,9	0,3	0,1	0,1	0,2	0,3	1,6	5,1	nc	1,1		
<i>Brycon orbignyanus</i> ²¹	1,2	23,9	9,8	0,4	48,7	0,8	0,8	0,2	0,1	0,1	0,5	0,3	1,1	2,3	nc	0,8		
<i>Pintirampus pintirampus</i> ²⁹	2,1	30,1	10,3	10,2	27,8	nd	2,4	nd	2,7	nc	1,5	nc	3,7	2,8	nd	nc		
<i>Cyprinus carpio</i> ²⁹	nd	17,3	5,7	6,6	41,8	nd	2,1	nd	nd	nc	nd	nc	1,4	14,5	1,8	nc		
<i>Megalocistius aculeatus</i> ²⁹	1,0	18,1	10,1	5,1	23,9	nd	nd	nd	nd	nc	nd	nc	4,3	2,4	11,8	nc		
<i>Pterodoras granulosus</i> ²⁹	nd	26,8	10,3	4,5	25,2	nd	1,4	nd	5,4	nc	nd	nc	11,5	8,8	nd	nc		
<i>Plagioscion squamosissimus</i> ²⁹	3,6	24,6	10,5	9,7	9,6	3,9	nd	nd	nd	nc	11,6	nc	10,3	nd	5,2	nc		
<i>Prochilodus lineatus</i> ²⁹	2,6	30,1	10,8	8,6	23,2	nd	2,4	nd	3,9	nc	1,2	nc	5,6	6,8	3,9	nc		
<i>Salminus maxillosus</i> ²⁹	2,4	39,4	9,2	5,2	9,7	nd	nd	1,8	8,2	nc	4,8	nc	7,0	5,0	nd	nc		
<i>Hemisorubim platyrhynchus</i>	nd	26,6	11,7	nd	17,6	nd	nd	nd	7,6	nc	nd	nc	14,9	21,9	nd	nc		
<i>Pimrolodus maculatus mandi</i>	nd	27,9	9,3	6,5	39,9	nd	2,0	nd	2,4	nc	nd	nc	1,9	4,3	nd	nc		
<i>Colossoma mitrei</i>	15,4	21,6	6,8	6,7	40,3	nd	nd	nd	nd	nc	1,3	nc	nd	6,0	nd	nc		
<i>Salmas sp</i>	1,7	20,7	5,3	7,2	27,8	nd	12,7	1,1	1,2	nc	1,7	nc	11,7	nd	1,1	nc		

20 Harun KMY et al.; 14 Wang YJ et al.; 27 Almeida NM; 2 Inhamuns AJ; 30,31 Maia EL et al.; 32 Maia EL, Rodriguez-Amaya DB; 29 Andrade AD et al; nd não detectado, nc não citado

O ácido palmítico (C16:0) e o ácido oléico (C18:1 ω 9) foram os principais ácidos graxos encontrados quando a composição de lipídios no filé do *Merluccius hubbsi* foi estudada por Méndez e González¹⁵. O valor médio de EPA e DHA encontrado ao longo do ano foi de 0,09 e 0,35g por 100g de músculo do tecido, respectivamente e, portanto, os autores, baseando-se no trabalho de Ackman¹⁶, argumentaram que se a média de ingestão diária recomendada fosse de 1g de EPA + DHA, seria necessário a ingestão de 230g de filé de *Merluccius hubbsi* para obtenção do valor recomendado (Tabela 1).

A composição dos ácidos graxos de 10 espécies de peixes marinhos consumidos diariamente na Malásia foi determinada e os resultados mostraram que o total de AGPI- ω 3 atingiu o mais alto nível de ácidos graxos, variando de 30 a 48%, seguido por outros AGPI, com níveis de 28 a 40%, pelos saturados, de 4 a 11% e finalmente pelos monoinsaturados, de 1 a 9%, aproximadamente. O conteúdo de AA, EPA e DHA, em todas as espécies analisadas, variaram no intervalo de 0,19 a 0,68%; 0,80 a 6,72% e 9,36 a 28,6%, respectivamente. Os peixes analisados foram considerados como uma boa fonte de alimentos¹⁷ (Tabela 1).

Uma extensa revisão da composição em ácidos graxos de peixes marinhos da Austrália mostrou que os saturados foram os majoritários, perfazendo um terço do total, enquanto os AGPI perfizeram cerca de 40% do total. A média de AGPI- ω 6 apresentou uma amplitude de 1,2 a 23,1%, sendo o ácido araquidônico o majoritário, com um valor médio de 6% do total de ácidos graxos e variou de 0,4 a 15,8%. Na maioria dos peixes analisados, o DHA foi a maior fonte de AGPI- ω 3, seguido do EPA e do α -linolênico, que contribuíram com menos de 3% do total de ácidos graxos¹⁸.

Na Turquia, mais de 80% dos peixes são capturados na região Oeste do Mar Negro e por isso, Guner et al.¹⁹ pesquisaram o perfil em ácidos graxos de nove espécies capturadas nessa região. O total de saturados variou entre 25,8 a 45,1%, sendo o C16:0 o ácido graxo majoritário, com cerca de 60% do total de saturados. O oléico foi o principal ácido monoinsaturado em todos os peixes analisados, sendo o DHA o principal AGPI foi o DHA, seguido do EPA. Em algumas espécies foi detectada a presença do ácido graxo nervônico (Tabela 1).

A composição de 12 espécies de peixes marinhos da Bacia de Bengal, em Bangladesh, e de duas espécies de peixes de água doce, capturadas no Rio Meghna e no Lago Kaptai foi estudada por HARUN et al.²⁰. A percentagem encontrada de saturados foi de 38 a 59% nos peixes marinhos e de 40 a 46% nos peixes de água doce. Os AGPI- ω 3 constituíram uma menor fração nos peixes de água doce, variando de 7 a 12%. Os AGPI- ω 6, com menor percentagem, variaram de 2,5 a 9,2% em ambos os tipos de peixes. O ácido C20:4 foi o majoritário da família ω 6 e o C20:5 e C22:6 foram os predominantes da família ω 3 nos peixes marinhos e de água doce (Tabela 1 e 2).

Na Malásia foi conduzido um estudo para avaliar a composição em ácidos graxos de 20 espécies de água doce. Os ácidos graxos monoinsaturados foram sempre os majoritários,

com conteúdo variando de 17 a 53%, seguidos dos saturados e poliinsaturados. O total de AGPI- ω 6 variou de 2 a 26% enquanto o de AGPI- ω 3 variou de 1 a 11% em todas as espécies estudadas. Os autores indicaram o peixe em estudo como sendo importante componente na dieta da população da Malásia, constituindo cerca de 60-70% de fonte protéica e também como importante fonte de ω -3²¹.

A composição em ácidos graxos de cinco espécies de peixes marinhos foi estudada em diferentes estações do ano Badolato et al.²². Para todas as espécies, os principais ácidos saturados encontrados foram o palmítico e esteárico, dentre os ácidos monoinsaturados, foram o palmitoléico e oléico e dentre os AGPI, foram o EPA, DHA e AA.

Os lagos e rios tropicais detêm cerca de 40% de todas as espécies de peixes de água doce do mundo. Em um estudo envolvendo 50 amostras de peixes, representando 8 espécies tropicais, que foram coletados em lagos da Etiópia, foi observada uma diferença no perfil de ácidos graxos de peixes tropicais da mesma espécie, porém capturados em diferentes lagos, bem como de uma espécie para outra capturada no mesmo lago ou em local diferente. Foram identificados 28 ácidos graxos e os majoritários foram o C16:0, C18:0, C18:1 ω 9 e o C22:6 ω 3. O nível de AGPI em peixes tropicais foi comparável ao de águas temperadas, indicando que a temperatura da água por si só não interfere no conteúdo desses ácidos graxos²³.

O fígado de peixe contém alto conteúdo de lipídios, sendo conhecido como uma excelente fonte de óleo, assim Satué & López²⁴ estudaram a composição de ácidos graxos no óleo do fígado de *Oncorhynchus mykiss* e encontraram diferenças na composição de ácidos graxos entre fígados de fêmeas e machos. Os principais ácidos graxos no óleo do fígado foram os C22:6 ω 3, C16:0, C18:1 ω 9, C22:5 ω 3, nos machos e C18:1 ω 9, C22:6 ω 3, C16:0, C18:0, C16:1 nas fêmeas.

Em estudos realizados no México e em Cuba, Navarro-Garcia et al.²⁵ estudaram a composição de lipídios do fígado de tubarão. Houve variação entre as frações percentuais dos saturados, monoinsaturados e poliinsaturados. Para o *Carcharhinus falciformis* (espécie do México), os teores encontrados foram de 35,3; 20,8 e 37,7% e para o *Galeocerdo cuvier* (espécie de Cuba), de 20,8, 50,6 e 18,4%, respectivamente. O percentual de EPA e DHA foi de 5,14% e 25,05% para o *C. falciformis* e de 1,09 e 0,32% para o *G. cuvier*.

O bonito (*Euthynnus pelamis*) é uma espécie distribuída em zona tropical e temperada. Saito et al.²⁶, estudaram a composição em ácidos graxos de vários órgãos de bonito, que foram capturados em diferentes áreas, desde a zona tropical à zona temperada. A composição em ácidos graxos variou pouco entre os órgãos estudados. Foi observado que os majoritários foram o C16:0, C16:1 ω 5, C16:1 ω 7, C18:0, C18:1 ω 7, C18:1 ω 9, C20:5 ω 3, C22:6 ω 3. O DHA foi o majoritário dentre os AGPI, independentemente da origem da espécie.

Recentemente a composição de ácidos graxos e quantificação de EPA e DHA de matrinxã (*Brycon cephalus*) e tambaqui (*Colossoma macropomum*), cultivados e capturados na Amazônia

Central, foram determinadas por Almeida²⁷. Para o matrinxã de cultivo e capturados no habitat natural os mesmos ácidos graxos majoritários foram encontrados nos lipídios totais (LT) e nas frações de lipídios neutros (LN) e fosfolipídios (FL). Porém, ocorreu uma inversão de alguns ácidos graxos nos LT e LN dos peixes capturados na época da seca. Foram detectados 64 ácidos graxos nos LT, 66 nos LN e 55 nos FL do matrinxã de cultivo semi-intensivo e de reserva natural, capturados nos dois períodos sazonais (cheia e seca) da Amazônia Central. As concentrações de EPA e DHA no tecido muscular da matrinxã foram 4,15mg/g e 5,25mg/g, para os peixes de cultivo e de 8,14mg/g e 30,04mg/g para as espécies capturadas na época da cheia, enquanto no período da seca foi de 10,26mg/g e 61,31mg/g, respectivamente. No tecido adiposo da cavidade ocular, as concentrações de EPA e DHA foram de 3,64mg/g e 6,22mg/g; 4,93mg/g e 22,78mg/g; 18,74mg/g e 19,66mg/g, para os peixes de cultivo e os capturados na época da cheia e da seca, respectivamente. No tambaqui foram detectados 61 ácidos graxos nos LT, 67 nos LN e 63 nos FL dos peixes de cultivo e dos capturados nos dois períodos sazonais (cheia e seca). Nos peixes de cultivo e nos capturados no habitat natural, os mesmos ácidos graxos majoritários foram encontrados nos lipídios totais e nas frações de lipídios neutros e fosfolipídios, porém, houve uma inversão da ordem dos principais ácidos graxos dos peixes de cultivo e dos capturados na natureza, nos períodos da cheia e seca. As concentrações de EPA e DHA no tecido muscular foram 5,03mg/g e 3,84mg/g; 9,35mg/g e 25,10mg/g; 14,15mg/g e 40,18mg/g e no tecido adiposo da cavidade ocular foram de 4,41mg/g e 5,54mg/g; 7,05 mg/g e 8,12mg/g; 9,31mg/g e 8,95mg/g para os peixes de cultivo e os capturados na época da cheia e da seca, respectivamente. O matrinxã e tambaqui de habitat natural capturado na época da seca foram considerados melhores para o consumo, por apresentarem maiores concentrações dos ácidos graxos EPA e DHA (Tabela 2).

A composição de ácidos graxos das espécies *Sardinella spp*, *Micropogonias furnieri*, *Prochilodus spp*, *Oreochromis spp* e *Xiphopenaues kroyeri* foi estudada em duas diferentes estações do ano. O *X. kroyeri* foi a única espécie influenciada pela sazonalidade, com um maior conteúdo de ácidos graxos saturados e insaturados durante o verão. A *Sardinella spp* apresentou o maior conteúdo de EPA + DHA, quando coletada no verão e foi indicada como a melhor espécie para a elaboração de dieta a base de peixe²⁸.

A composição em ácidos graxos de três peixes da Amazônia foi estudada por Inhamuns² e Inhamuns & Franco³, sendo esses curimatã (*Prochilodus nigricans*), mapará (*Hypophthalmus sp*) e tucunaré (*Cichla ocellaris*). Para as duas últimas espécies foi realizada a quantificação dos ácidos graxos EPA e DHA. Os resultados para o curimatã revelaram que, quando capturado no período de seca, pode ser utilizada em dietas balanceadas como fonte de AGPI. O mapará capturado na época da cheia foi recomendado para prescrição de dietas, quando o objetivo for incrementar a ingestão de EPA e DHA. Essa espécie apresentou 20mg/g e 16mg/g de EPA no músculo e 14mg/g e 13mg/g no tecido adiposo da cavidade ocular e o teor de DHA foi de 18mg/g e 15mg/g no músculo e 15mg/g e 14mg/g no tecido adiposo da cavidade ocular dos exemplares capturados na época

da cheia e seca, respectivamente. O tucunaré, mesmo apresentando uma razão reduzida de $\omega 3/\omega 6$ no período da cheia e da seca, nos dois tecidos analisados (músculos e tecido adiposo da cavidade ocular), foi considerado uma fonte rica em ácidos graxos essenciais das séries $\omega 3$ e $\omega 6$. Esta espécie apresentou maior percentual desses ácidos no tecido muscular quando capturado no período da cheia e a quantificação revelou elevado teor de DHA no tecido muscular, atingindo 54mg/g quando capturado no período de cheia (Tabela 2).

Na região Sul, Andrade et al.²⁹ estudaram dezessete espécies de peixes de água doce. Os ácidos graxos palmítico e esteárico foram os majoritários entre os saturados. O *Salmus sp* apresentou 28% de AGPI do total de ácidos graxos. O *Salminus maxilloca* apresentou mais de 28% de AGPI $\omega 3$ e valores em torno de 20% foram obtidos para *Hemissorubim plathyrrhynchus*, *Plagioscion squamosissimus* e *Pterodoras granulosus*. O teor de DHA em todas as espécies estudadas, exceto o *Colossoma mitrei*, foi maior do que o de EPA. De acordo com os autores, o *Pinirampus pinirampu*, *Salmus sp* e *Plagioscion squamosissimus* podem ser recomendados como boa fonte de DHA e EPA (Tabela 2).

Nos lipídios totais do tecido muscular pode existir uma grande variedade de substâncias orgânicas lipossolúveis, que são distribuídas em três principais classes: lipídios neutros, fosfolipídios e glicolipídios. Foram identificados 64, 71 e 46 ácidos graxos nos lipídios totais de pacu (*P. mesopotamicus*), curimatã (*P. scrofa*), e tambaqui (*C. macropomum*), respectivamente. As análises para todas as espécies mostraram que os ácidos majoritários foram os ácidos mirístico, palmítico, palmitoleico, esteárico, oléico, linoléico e linolênico nos lipídios totais e neutros. O ácido oléico foi o principal ácido graxo dos LT e LN de pacu e tambaqui, enquanto o ácido palmítico foi o majoritário nos LT e LN de curimatã. Nos fosfolipídios, os ácidos palmítico, esteárico, oléico e araquidônico foram os majoritários em todos os peixes nesse estudo. Nos lipídios totais, neutros e fosfolipídios de pacu e tambaqui, os ácidos graxos da família $\omega 6$ predominaram em relação aos série $\omega 3$, e o contrário ocorreu para o curimatã^{30,31,32} (Tabela 2).

Sete espécies de peixes de água doce e nove de água salgada, também foram caracterizadas quanto à sua composição de ácidos graxos³³. Os ácidos C16:0 e o C18:0 foram majoritários nos peixes de água doce, que apresentaram baixos níveis de EPA e DHA em comparação aos peixes de água salgada. Os autores concluíram que a maioria dos peixes de água doce não poderia ser considerada como fonte de ácidos graxos $\omega 3$, entretanto, entre os peixes de água salgada, apenas duas espécies foram recomendadas.

Influência da dieta na composição em ácidos graxos de peixes capturados em ambiente natural e cultivados em diferentes sistemas.

A importância de se conhecer o tipo e a quantidade de lipídios na dieta de animais, devido a sua influência na qualidade e quantidade de AGPI nos tecidos e nas células, foi salientada

por Rainuzzo et al.³⁴. Os lipídios para a nutrição de peixes foram exaustivamente estudados nas últimas duas décadas.

Tilápias (*Oreochromis niloticus*) submetidas à dieta comercial prolongada foram pesquisadas em relação à composição de ácidos graxos, com o objetivo de avaliar o valor nutricional do conteúdo lipídico³⁵. Foi concluído que a dieta prolongada permitiu armazenar elevados teores de lipídios totais, porém não promoveu um aumento no valor nutricional do conteúdo lipídico, em relação à composição de ácidos graxos ω 3 e foi também verificado que as tilápias não constituíram uma boa fonte de ácidos graxos ω 3. Entretanto a ração exerceu um fator determinante na composição de ácidos graxos dos lipídios, especialmente devido à elevada concentração de ácido linoléico.

Os peixes de recursos naturais sofrem várias influências do meio ambiente, enquanto os peixes de cativeiro, principalmente aqueles de cultivo intensivo, crescem em condições mais estáveis e possuem a composição de sua dieta controlada. Desta forma, o conteúdo de lipídios pode ser modificado para melhorar qualitativamente e quantitativamente o valor nutricional do peixe. Dietas otimizadas somente para o crescimento e produção com baixo custo podem não resultar em peixes de ótima qualidade³⁶.

Visando melhorar o valor nutricional da composição lipídica do tecido muscular (filé) de tilápias (*O. niloticus*), Visentainer et al.³⁷ estudaram essa espécie criada em sistema intensivo de cultivo, e rações com níveis de suplementação crescentes de óleo de linhaça (fonte de ácido α -linolênico, LNA), foram fornecidos aos peixes. Os resultados mostraram que o fornecimento de rações suplementadas com níveis crescente de óleo de linhaça aumentou o valor nutricional do conteúdo lipídico do tecido muscular, pois o ácido graxo ω 3 disponível na dieta foi alongado aos importantes ácidos EPA e DHA. Os autores quantificaram os seguintes ácidos graxos: LNA, EPA e DHA. As tilápias submetidas aos tratamentos com diferentes níveis de linhaça (0,00, 1,25, 2,50, 3,75 e 5,00%) apresentaram teor de 6,52; 0,15; 9,93 mg/g; de LNA, EPA e DHA para o primeiro tratamento e de 59,28; 2,54 e 26,1mg/g para o último tratamento.

A composição em ácidos graxos pode ser influenciada pelo sistema de cultivo do pescado assim, Orban et al.³⁸ estudaram as características da qualidade do *Diplodus puntazzo* em dois diferentes sistemas de cultivo. A distribuição percentual em ácidos graxos de lipídio total, neutro e polar mostrou diferenças entre os sistemas de cultivo, tanque e gaiola. O ácido palmítico e o oléico foram os predominantes entre os saturados e monoinsaturados nos peixes provenientes dos dois sistemas de cultivos. Alta proporção de poliinsaturados e saturados, cerca de 45 e 34%, respectivamente, foram encontrados na fração de fosfolipídios, em ambos os tipos de cultivos. As diferenças encontradas poderiam ser atribuídas a diferentes condições ambientais e à dieta aplicada aos peixes, nos dois sistemas de cultivos.

O perfil de ácidos graxos de matrinxã (*Brycon cephalus*), piraputanga (*Brycon microlepis*) e piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) cultivados em açude e gaiolas e provenientes de ambiente natural foi estudado por Moreira et al.³⁹. Dentre os ácidos saturados do tecido muscular, o ácido

palmítico apresentou maior concentração, de 21,9 a 26,7%, para a piraputanga e matrinxã cultivados em açude, respectivamente. Os poliinsaturados que mais se destacaram foram o linoléico, o α -linolênico e o DHA. De acordo com os autores, a grande quantidade de C18:2 ω 6 na ração (cerca de 38%) foi provavelmente o responsável pelo elevado nível desse ácido no tecido muscular das espécies criadas em cativeiros.

Com a finalidade de verificar o efeito da adição de óleo de palma e o destilado da desodorização do óleo de soja (DDOS) em rações, sobre a composição em ácidos graxos do tambaqui (*Colossoma macropomum*), Viegas et al.⁴⁰ realizaram um teste biológico em 216 alevinos. Os peixes alimentados com ração com alto conteúdo de poliinsaturados apresentaram os maiores teores de AGPI, tanto no filé como no peixe inteiro. Por outro lado, rações contendo maiores teores de óleo de palma induziram à formação de lipídios com maiores teores de saturados e menores de poliinsaturados. Portanto, a composição de ácidos graxos do tambaqui dependeu da composição da ração, mostrando que, quando alto em AGPI, o peixe é capaz de acumulá-los na mesma proporção, principalmente no tecido muscular.

A composição em ácidos graxos de peixes de água doce é caracterizada por alta proporção de AGPI- ω 6. Em peixes de cativeiro, a composição de ácidos graxos pode ser modificada e um trabalho realizado com *Cyprinus carpio*, recebendo dieta contendo alta quantidade de óleo de peixe, revelou um alto nível de AGPI- ω 3⁴¹.

O crescimento de *Ictalurus punctatus*, alimentado com várias fontes lipídicas em duas temperaturas, e a composição dos ácidos graxos da fração lipídica polar no fígado desse peixe, foram estudados por Fracalossi & Lovell⁴². A concentração de AGPI na fração de fosfolipídios do fígado foi maior em temperatura baixa do que em temperatura alta. O AGPI mais abundante no fígado do peixe, alimentado com “menhaden oil” ou com a mistura de óleos, foi o DHA. Os peixes alimentados com óleo de milho tiveram como principal ácido graxo o AA em seus fosfolipídios e os alimentados com óleo de linhaça tiveram a menor quantidade de EPA, porém a maior quantidade de DHA.

COMENTÁRIOS FINAIS

O Brasil apresenta potencial para produção pesqueira e uma grande diversidade de peixes, apesar disso ainda há poucas pesquisas sobre a identificação e quantificação de ácidos graxos em pescado. Porém, os trabalhos existentes para os peixes de água doce mostraram que estes apresentaram excelentes valores nutricionais e indicaram diferenças entre peixes procedentes de sistemas de cultivo e peixes de “habitat” natural, onde peixes cultivados podem apresentar maior quantidade de ácidos graxos poliinsaturados do que peixes de “habitat” natural;

O ácido graxo palmítico e o oléico atingiram a mais alta percentagem tanto no pescado de água marinha como de água doce. Na maioria dos peixes examinados o DHA, seguido do EPA e α -linolênico são as maiores fontes de AGPI ω 3, enquanto o linoléico e o araquidônico são os que mais contribuíram como fonte de AGPI ω 6;

A composição de ácidos graxos para peixes marinhos apresentaram maiores proporções de ácidos graxos poliinsaturados Omega 3 do que peixes de água doce, porém em algumas pesquisas os peixes de água doce apresentaram maiores quantidade de AGPI- ω 3 do que peixes marinhos;

Fornecimentos de rações suplementadas com fonte de ácidos graxos poliinsaturados omega 3, como o óleo de linhaça, aumentam o valor nutricional do conteúdo lipídico de peixes de água doce;

A técnica de quantificação de ácidos graxos por quantidade de conteúdo lipídico deve ser realizada para permitir melhores comparações quantitativas, construção de tabelas de composição, aplicações em termos nutricionais para estabelecer dietas e nos diversos processos industriais.

AGRADECIMENTOS

A Capes pela concessão da bolsa de estudos e suporte financeiro. A Fapesp pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

- Henderson RJ, Tocher DR. The lipid composition and biochemistry of freshwater fish. *Prog. Lipids Res* 1987; 26: 281-347.
- Inhamuns AJ. Composição de ácidos de peixes de água doce da Região Amazônica brasileira. Campinas, 2000. [Tese de Doutorado - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas].
- Inhamuns AJ, Franco MRB. Composition of total, neutral, and phospholipids in Mamará (*Hypophthalmus sp.*) from Brazilian Amazonian area. *J Agric Food Chem* 2001; 49: 4859-63.
- Venugopal V, Shahidi F. Structure and composition of fish muscle. *Food Rev Int* 1996; 12: 175-97.
- Holman RT. The Slow Discovery of the Importance of ω 3 Essential Fatty Acids in Human Health. *J Nutrition* 1998;128: 427S-433S.
- Nettleton JA. Omega 3 Fatty Acids and Health. New York, NY, Ed. Chapman & Hall Book. 1994. 355p.
- Steven MW, German JB. Food Lipids Chemistry Nutrition, and Biotechnology, Cap, 18.ed. Casimir. C. Akoh e David b. Min, Marcel Dekker, Inc, New York, 1998. 816p.
- Simopoulos AP. Omega-3 Fatty Acids in Health and disease and in growth and development. *Am J Clin Nutr* 1991; 54: 438-63.
- Simopoulos AP, Leaf A, Salem, N. Essentiality and recommended dietary intakes for omega-6 and omega-3 fatty acids. *Ann Nutr Metabol* 1999; 43: 127-30.
- Simopoulos AP. The Importance of the ratio of omega-6/ omega-3 essential fatty acids. *Biomed Pharmacother* 2002; 56: 365-79.
- Simopoulos AP. Commentary on the Workshop Statement. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2000; 63: 123-4.
- Simopoulos AP. Essential Fatty Acids in Health and Chronic disease. *Food Rev Int* 1997 13: 623-31.
- Department of Health. Report on Health and Social Subjects. n° 46 Nutritional Aspects of Cardiovascular Disease. HMSO, London, 1994.
- Wang YJ, Miller LA, Perren M, Addis P B. Omega-3 fatty acid in lake superior fish. *J Food Sci* 1990; 55: 71-6.
- Méndez E, González RM. Seasonal changes in the chemical and lipid composition of fillets of the Southwest Atlantic hake (*Merluccius hubbsi*). *Food Chem* 1997; 59: 213-7.
- Ackman RG. Nutritional composition of fats in seafoods. *Program Food Nutr Sci* 1989; 13: 161-241.
- Osman H, Suriah AR, Law EC. Fatty acid composition and cholesterol content of selected marine fish waters. *Food Chem* 2001; 73: 55-60.
- Brown AJ, Roberts DCK, Truswell AS. Fatty acid composition of Australian marine finfish: a review. *Food Austrália* 1989; 3: 655-66.
- Guner S, Dincer B, Alemdag N, Colak A, Tufekci M. Proximate composition and selected mineral content of commercially important fish species from the Black Sea. *J Sci Fd Agric* 1998; 78: 337-42.
- Harun KMY, Sharmin RA, Rafiqur R. Fatty acids of 12 marine fish species of the Bay of Bengal. *J Food Comp Anal* 1993; 6: 346-53.
- Rahman SA, Huah TS, Hassan E, Daud NM. Fatty acid composition of some Malaysian freshwater fish. *Food Chem* 1995; 54: 45-9.
- Badolato ESG, Carvalho JB, Amaral-Melo MRP, Tavares M, Campos NC, Aued-Pimentel S, Morais C. Composição centesimal, de ácidos graxos e valor calórico de cinco espécies de peixes marinhos nas diferentes estações do ano. *Rev Inst Adolfo Lutz* 1994; 54: 27-35.
- Zenebe T, Ahlgren G, Boberg M. Fatty acid content of some freshwater fish of commercial importance from tropical lakes in the Ethiopian Rift Valley. *J Fish Biol* 1998 53: 987-1005.
- Satué MT, López MC. Sex-linked differences in fatty acid composition of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver oil. *Food Chem* . 1996; 57: 359-63.
- Navarro-Garcia G, Pacheco-Aguilar R, Valejo-Cordova B, Ramirez-Suarez JC, Bolaños A. Lipids composition of the liver oil of shark species from the Caribbean and Gulf of California waters. *J Food Comp Anal* 2000; 13: 791-8.
- Saito H, Ishihara K, Murase T. The fatty acid composition in Tuna (Bonito, *Euthynnus pelamis*) caught at three different localities from tropics to temperate. *J Sci Food Agric* 1997; 73: 53-9.
- Almeida NM. Composição em ácidos graxos e quantificação de EPA e DHA de matrinxã (*Brycon cephalus*) e tambaqui (*Colossoma macropomum*) cultivado e capturado na Amazônia Central. Campinas, 2004. [Tese de Doutorado – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas].
- Luzia LA, Sampaio GR, Castellucci CMN, Torres, EAFS. The influence of season on the lipid profile of five commercially important species of Brazilian fish. *Food Chem* 2003; 83: 93-7.
- Andrade AD, Rubira AF, Matsushita M, Souza NE. ω 3 Fatty acids in freshwater fish from south Brazil. *J Am Oil Chem Soc* 1995, 72: 1207-10.
- Maia EL, Rodriguez-Amaya DB, Hotta LK. Fatty acids composition of the total, neutral and phospholipids of pond-raised Brazilian *Piaractus mesopotamicus*. *Int J Food Sci Technol* 1995; 30: 591-7.
- Maia EL, Rodriguez-Amaya DB, Franco MRB. Fatty acid of total, neutral, and phospholipids of the Brazilian freshwater fish *Prochilodus scrofa*. *J Food Comp Anal* 1994; 7: 240-251.
- Maia EL, Rodriguez-Amaya DB. Fatty acid composition of the total, neutral and phospholipids of the Brazilian freshwater fish *Colossoma macropomum*. *Food Sci Human Nutr* 1992; 633-42.
- Gutierrez LE, Silva RCM. Fatty acid composition of commercially important fish from Brazil. *Society Agriculture* 1993; 50: 478-83.
- Rainuzzo JR, Reitan KI, Olsen Y. The significant of lipids at early stages of marine fish: a review. *Aquaculture* 1997; 155: 103-15.
- Visentainer JV, Makoto M, Souza NE, Catharino RR, Franco MRB. Composição química e ácidos graxos em tilápias (*Oreochromis niloticus*) submetidas à dieta prolongada. *Rev Nac Carne* 2003; 313: 109-12.
- Hunter BJ, Roberts DCK. Potential impact of the fat composition of farmed fish on human health. *Nutr Res* 2000; 20: 1047-58.
- Visentainer JV, Souza NE, Makoto M, Hayashi C, Franco MRB. Influence of diets enriched with wax seed oil on the α -linolenic, eicosapentaenoic and docosahexaenoic fatty acid in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Food Chem* 2005; 90: 557-60.
- Orban E, Di LG, Riceli A, Paoletti F, Casini I, Gambelli L, Caproni R. Quality characteristics of sharp snout sea bream (*Diplodus puntazzo*) from different intensive rearing systems. *Food Chem* 2000; 70: 27-32.
- Moreira AB, Visentainer JV, Souza NE, Matsushita M. Fatty acids profile and cholesterol contents of three Brazilian *Brycon* freshwater fishes. *J Food Comp Anal* 2001; 14: 565-74.
- Viegas EMM, Barrera-Arellano D, Contreras-Guzmán ES. Effect of Diet with Palm Oil and Soybean Oil Deodorizer Distillate on Tambaqui (*Colossoma macropomum*) Fatty Acid Composition. *Int Meet Fats Oils Technol Symp Exhibition* 1991; 193-6.
- Steffens W. Effects of variation in essential fatty acids in fish feeds on nutritive value of freshwater fish for humans. *Aquaculture* 1997; 151: 97-119.
- Fracalossi DM, Lovell RT. Growth and liver polar fatty acid composition of year-1 channel catfish fed various lipids sources at two water temperatures. *Prog Fish-Culturist* 1995; 57: 107-13.

Atividade antioxidante do α -tocoferol e do extrato de alecrim em óleo de soja purificado

α -tocopherol and rosemary extract antioxidant activity in purified soybean oil

RIALA6/1055

Valéria C. RAMALHO¹, Neuza JORGE¹

Endereço para correspondência: ¹Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos – IBILCE - UNESP. Rua Cristóvão Colombo, 2265

CEP 15054-000 – São José do Rio Preto-SP. e-mail: valeria_ramalho@yahoo.com.br

Recebido: 01/02/2006 – Aceito para publicação: 24/04/2006

RESUMO

A oxidação lipídica é uma das mais importantes alterações que afetam tanto o óleo ou a gordura assim como o alimento que os contêm, que é responsável pelo desenvolvimento de sabor e odor desagradáveis. A aplicação de antioxidantes, em termos técnicos, é um dos caminhos mais simples para reduzir a oxidação de gorduras. Há indícios de que os antioxidantes sintéticos podem ter efeitos indesejáveis para a saúde humana, o que tem estimulado a busca por antioxidantes naturais como fonte alternativa. Este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antioxidante do extrato de alecrim, contendo 4% de diterpenos fenólicos, em comparação com o α -tocoferol, com 97% de pureza, utilizando como substrato lipídico óleo de soja purificado. A atividade dos antioxidantes foi avaliada nas concentrações de 0, 100, 300, 500, 800 e 1.000 mg/kg para o extrato de alecrim (ALE) e 0, 100, 200, 400, 600 e 700 mg/kg para o α -tocoferol (TOC), por meio da determinação da estabilidade oxidativa utilizando o Rancimat. A ordem da atividade antioxidante encontrada foi 600 mg/kg TOC > 400 mg/kg TOC > 1.000 mg/kg ALE > 200 mg/kg TOC > 800 mg/kg ALE > 500 mg/kg ALE > 100 mg/kg TOC > 300 mg/kg ALE > 100 mg/kg ALE.

Palavras-Chave. antioxidantes, tocoferol, extrato de alecrim.

ABSTRACT

Lipid oxidation is one of the most serious alterations that affect either oil or fat, and some food containing these products, and it is responsible for causing unpleasant taste and smell. On technical terms, the use of antioxidants is one of the easiest ways to reduce the fat oxidation. There are evidences indicating that synthetic antioxidants may have undesirable effects for human health, thence searches for natural antioxidants as an alternative source have been encouraged. The present study aimed to evaluate the rosemary extract antioxidant activity, which contains 4% of phenolic diterpenes, and comparing with 97% pure α -tocopherol, using purified soybean oil as lipid substrate. The antioxidant activity was analyzed in concentrations of 0, 100, 300, 500, 800, and 1,000 mg/kg for rosemary extract (ALE), and of 0, 100, 200, 400, 600, and 700 mg/kg for α -tocopherol (TOC), by means of oxidative stability determination using Rancimat. The observed antioxidant activity ranking was 600 mg/kg TOC > 400 mg/kg TOC > 1.000 mg/kg ALE > 200 mg/kg TOC > 800 mg/kg ALE > 500 mg/kg ALE > 100 mg/kg TOC > 300 mg/kg ALE > 100 mg/kg ALE.

Key Words. antioxidants, tocopherol, rosemary extract.

INTRODUÇÃO

A oxidação lipídica é uma das principais alterações que afetam tanto um óleo ou gordura como um alimento que os contêm. As reações químicas envolvidas nesse processo são muito complexas e geram, em estágios mais avançados,

produtos sensorialmente inaceitáveis¹. A aplicação de antioxidantes, em termos técnicos, é um dos caminhos mais simples para reduzir a oxidação de gorduras².

Os antioxidantes sintéticos mais utilizados na indústria de alimentos são os compostos fenólicos butil-hidroxi-anisol (BHA), butil-hidroxi-tolueno (BHT), terc-butil-hidroquinona

(TBHQ) e propil galato (PG). Estudos toxicológicos têm demonstrado a possibilidade de esses compostos apresentarem efeito carcinogênico em experimentos com animais³. Por esse motivo, o uso de antioxidantes sintéticos é restringido em vários países, visto que existe a possibilidade de terem efeitos indesejáveis para a saúde humana⁴.

Nesse sentido, muitas pesquisas têm sido dirigidas com a finalidade de encontrar produtos naturais com atividade antioxidante, os quais permitirão substituir os sintéticos ou fazer associações entre eles, com o intuito de diminuir sua quantidade nos alimentos⁵.

Dentre os antioxidantes naturais de maior importância sob o ponto de vista tecnológico, estão os tocoferóis e os extratos de especiarias.

Os tocoferóis estão presentes de forma natural na maioria dos óleos vegetais. Existem quatro tipos: α , β , γ , e δ tocoferol, sendo o α -tocoferol o mais abundante nos alimentos e o de maior atividade biológica como vitamina E⁶.

A atividade antioxidante dos tocoferóis deve-se principalmente a sua capacidade de doar seus hidrogênios fenólicos aos radicais livres lipídicos, inibindo a oxidação. Contudo, tem sido notado, que a atividade dos tocoferóis *in vitro* depende também de muitas outras possíveis reações paralelas que são drasticamente afetadas por suas concentrações⁷, pela temperatura e luz, pelo tipo de substrato e por outras espécies químicas atuando como pró-oxidante e sinergista no sistema^{8,9}.

Sobre a concentração adequada de cada um dos homólogos, Jung e Min⁷ definiram concentrações ótimas de 100 mg/kg de α , 250 mg/kg de γ e 500 mg/kg de δ tocoferóis para aumentar a estabilidade oxidativa de óleo de soja purificado, armazenado no escuro a 55°C. Os tocoferóis apresentaram significantes efeitos pró-oxidantes em concentrações acima desses níveis. A oxidação foi acompanhada pela determinação de peróxidos.

Para Evans et al.¹⁰, a concentração ótima de tocoferol para inibir a oxidação do óleo de soja também foi 100 mg/kg para α , mas para γ foi maior, 300 mg/kg. Para o δ -tocoferol, não foi observada uma concentração ótima; a oxidação do óleo diminuiu regularmente com o aumento da dosagem de 473 para 1.890 mg/kg. Nesse caso, a oxidação foi acelerada pela manutenção do óleo no escuro a 40, 50 e 60°C e a oxidação foi acompanhada pela formação de dienos conjugados, sendo que o comportamento pró-oxidante foi mais pronunciado com o aumento da temperatura.

Frankel¹¹ também concorda que o α -tocoferol pode atuar como antioxidante ou pró-oxidante, mas afirma que a atividade do α -tocoferol e dos antioxidantes em geral depende não só da concentração, como também do sistema testado, do tempo de oxidação e do método usado para acompanhar a oxidação. Para esse pesquisador, em altas concentrações, o α -tocoferol promove a formação dos hidroperóxidos, mas inibe a decomposição deles.

Os experimentos envolvendo a característica das especiarias em inibir a oxidação se iniciaram nos anos 50. Nessa

época, pesquisadores constataram o aumento da estabilidade de óleos adicionados de uma variedade de especiarias e condimentos¹². Dentre as especiarias, o alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) é uma das que apresenta maior poder antioxidante. Os compostos responsáveis pela atividade antioxidante do alecrim são principalmente diterpenos fenólicos, como carnosol, ácido carnósico, rosmanol, epirosmanol e isorosmanol¹³.

O efeito antioxidante do alecrim deve-se, principalmente, à capacidade dos constituintes fenólicos de doar hidrogênio para os radicais livres, formando radicais estáveis, e também em parte à capacidade de sequestrar radicais superóxidos ($O_2^{\bullet-}$)⁴.

Muitos extratos de alecrim para uso em sistemas alimentícios estão hoje disponíveis no mercado, principalmente na Europa e Estados Unidos, onde, segundo consta, o alecrim representa cerca de 40 a 50% dos antioxidantes naturais comercializados¹⁴. No Brasil, o alecrim é classificado como aroma natural, sendo aplicado principalmente em produtos cárneos, pratos prontos e biscoitos.

Estudos têm sido conduzidos com o propósito de examinar a atividade antioxidante do alecrim na forma natural e sob a forma de extrato, em comparação com outros antioxidantes. Nesse sentido, em pesquisa realizada por Basaga et al.¹⁵, foi observado que a presença de 100 mg/kg de alecrim em óleos de soja e milho, armazenados a 30°C, preveniu a autooxidação, mas foi menos eficiente que o BHT nos dois óleos. A atividade antioxidante foi acompanhada pela determinação de peróxidos.

Almeida-Doria e Regitano-D'Arce⁴ avaliaram a ação antioxidante de extrato etanólico de alecrim em óleo de soja submetido a testes de oxidação acelerada em estufa a 60°C, comparando-o com os antioxidantes sintéticos TBHQ e BHA + BHT. Verificou-se que os compostos empregados retardaram a oxidação do óleo, entretanto, o extrato natural não atingiu a eficiência do TBHQ, mas foi tão efetivo quanto a mistura BHA + BHT.

Este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antioxidante do extrato de alecrim em comparação com o α -tocoferol, utilizando óleo de soja purificado como substrato lipídico.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

Para a realização do experimento foram utilizados óleo de soja refinado sem adição de antioxidantes, α -tocoferol com 97% de pureza, marca Sigma Aldrich e extrato de alecrim comercial marca GuardianTM tipo 40 fabricado pela empresa Danisco S/A contendo, segundo informações do fabricante, 4% de diterpenos fenólicos.

O óleo de soja foi purificado com alumina segundo o método descrito por Steel¹⁶, com o objetivo de se determinar a influência apenas do α -tocoferol e do extrato de alecrim adicionados sobre a alteração do substrato lipídico, sem a

influência de compostos minoritários não controlados, normalmente presentes nos óleos, com possíveis efeitos antioxidantes ou pró-oxidantes. A eficiência do procedimento de purificação foi verificada por meio da determinação da estabilidade oxidativa, teor de compostos polares totais, índice de peróxidos, teores de dienos conjugados e tocoferóis totais do óleo de soja, antes e após o processo de purificação. Esse óleo isento de tocoferóis teve a adição dos antioxidantes naturais α -tocoferol ou extrato de alecrim nas concentrações apresentadas na Tabela 1.

Todos os tratamentos foram conduzidos em duas repetições. A atividade dos antioxidantes foi avaliada por meio da determinação da estabilidade oxidativa utilizando o Rancimat.

Métodos analíticos

Estabilidade oxidativa, expressa em horas e determinada pelo método AOCS Cd 12b-92¹⁷, utilizando o Rancimat que é baseado na determinação da condutividade elétrica dos produtos voláteis de degradação. A determinação foi realizada a 100°C, com fluxo de ar de 20 L/h, utilizando 3 g de amostra e volume de água destilada de 60 mL nos frascos contendo os eletrodos.

Compostos polares totais, expressos em porcentagem e determinados pelo método cromatográfico proposto por Dobarganes et al.¹⁸. A base do método é a separação da amostra de óleo, utilizando cromatografia de adsorção, em duas frações de diferentes polaridades que podem ser determinadas gravimetricamente.

Índice de peróxidos, expresso em miliequivalentes de oxigênio ativo por kg de óleo, conforme método AOCS Cd 8-53¹⁷.

Dienos conjugados, expressos como porcentagem de ácidos dienóicos conjugados e determinados pelo método AOCS Ti 1a-64¹⁷.

Tocoferóis totais, expressos em mg/kg e determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector de fluorescência, seguindo o método AOCS Ce 8-86¹⁹.

Delineamento experimental

O experimento foi realizado no delineamento inteiramente casualizado, com seis tratamentos (concentrações de 0, 100, 300, 500, 800 e 1.000 mg/kg para o extrato de alecrim e de, aproximadamente, 0, 100, 200, 400, 600 e 700 mg/kg para o α -tocoferol) e duas repetições²⁰.

Tabela 1. Concentrações de antioxidantes adicionadas ao óleo purificado.

Tratamento	Antioxidante	Concentração (mg/kg)
A	Extrato de alecrim	0
B		100
C		300
D		500
E		800
F		1.000
G	α -tocoferol	0
H		100
I		200
J		400
K		600
L		700

Os resultados obtidos da estabilidade oxidativa foram submetidos à análise de variância para determinar a influência dos tratamentos na estabilidade dos óleos adicionados de antioxidantes, medida por meio do Rancimat.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O óleo obtido após a purificação com alumina foi analisado quanto a sua estabilidade oxidativa, teor de compostos polares totais, índice de peróxidos, teores de dienos conjugados e de tocoferóis. A Tabela 2 mostra a média e o desvio padrão dos valores encontrados.

Como pode ser observado na Tabela 2, com relação à estabilidade oxidativa, houve uma drástica redução, 97% do teor inicial, evidenciando a eficácia da purificação com alumina para a retirada dos antioxidantes naturais. Barrera-Arellano et al.²¹, utilizando o mesmo procedimento para a remoção de tocoferóis, conseguiram 88% de redução da estabilidade oxidativa de óleo de soja, medida pelo Rancimat nas mesmas condições deste estudo. Romero et al.⁹ conseguiram reduzir em 89% o período de indução medido pelo Rancimat também a 100°C após submeter o óleo de avelã chilena (*Gevuina avellana* Mol) ao mesmo procedimento para remoção de tocoferóis. A grande diferença na estabilidade entre o óleo purificado e o não purificado enfatiza a importância dos compostos que não são triacilgliceróis como inibidores naturais da oxidação de óleos vegetais²².

Tabela 2. Caracterização do óleo de soja antes e após purificação com alumina.

Determinações Analíticas	Óleo de soja antes da purificação	Óleo de soja após a purificação
Estabilidade Oxidativa (horas)	17,08 \pm 0,11	0,48 \pm 0,09
Compostos Polares Totais (%)	1,98 \pm 0,07	0,12 \pm 0,01
Índice de Peróxidos (meq/kg)	0,70 \pm 0,01	1,29 \pm 0,01
Dienos Conjugados (%)	0,26 \pm 0,01	0,23 \pm 0,01
Tocoferóis Totais (mg/kg)	1.058 \pm 13	< 0,2

A purificação mostrou-se também muito eficiente na remoção de compostos polares, uma vez que estes foram quase totalmente eliminados, com uma redução de 94% do teor inicial. Steel¹⁶ reduziu em 47% o teor de compostos polares após aplicar o mesmo procedimento para também purificar óleo de soja submetido a termoxidação.

Com relação ao índice de peróxidos, não foi encontrada a esperada redução como a observada por Souza²³, que, por meio da purificação da oleína de palma com alumina, reduziu o índice de peróxidos de 0,72 para 0,43 meq/kg. Vale salientar que, naquele trabalho, os tocoferóis não foram completamente removidos, restando 74,9 mg/kg.

Os dienos conjugados também foram parcialmente removidos, com uma redução de 11% do teor inicial e não foram encontrados tocoferóis nas amostras de óleo purificado, o que confirmou a eficácia do procedimento para a retirada desses compostos. Barrera-Arelano et al.²¹ e Steel¹⁶ também não detectaram tocoferóis em óleo de soja após utilizar o mesmo procedimento para remoção desses antioxidantes naturalmente presentes no óleo.

O período de indução (também chamado de índice de estabilidade oxidativa) é um parâmetro comparativo muito utilizado para se avaliarem diferentes tipos de óleos para fritura, alteração na composição em ácidos graxos, eficiência da adição de antioxidantes, entre outros²⁴. O aparelho Rancimat é uma versão automática do teste AOM (Active Oxygen Method) que determina a estabilidade oxidativa em óleos. Nesse equipamento, induz-se a oxidação de uma amostra de óleo, que é mantida sob temperatura e fluxo de ar constantes. Os produtos voláteis gerados com a oxidação são recolhidos em água destilada, cujo aumento de condutividade elétrica, detectada por eletrodos, gera um gráfico em que se visualiza o período de indução em horas^{24, 25}.

Para avaliar a concentração mais efetiva de cada um dos antioxidantes testados, bem como uma possível ação pró-oxidante, foram aplicadas concentrações de 0, 100, 300, 500, 800 e 1.000 mg/kg de extrato de alecrim ou de 0, 100, 200,

400, 600 e 700 mg/kg de α -tocoferol no óleo de soja purificado e a medida da estabilidade oxidativa foi verificada pelo Rancimat a 100°C. O limite de 1.000 mg/kg para o extrato de alecrim foi definido por ser esse o máximo valor recomendado pelo fabricante do produto. As concentrações utilizadas para o α -tocoferol, foram baseadas em estudos anteriores^{26, 26, 28, 29, 30}.

Por meio da análise de variância para a determinação da estabilidade oxidativa do óleo de soja purificado adicionado de alecrim ou de α -tocoferol observou-se que, o teste F foi significativo ($P < 0,01$) para o efeito Concentrações tanto para o extrato de alecrim quanto para o α -tocoferol. As Tabelas 3 e 4 mostram o resultado das médias submetidas ao teste de Tukey para o alecrim e α -tocoferol, respectivamente.

Com relação às concentrações adicionadas de extrato de alecrim, verifica-se, pela Tabela 3, que a concentração de 100 mg/kg não demonstrou ação antioxidante, já que não houve diferença significativa entre os valores da estabilidade das amostras com 0 e 100 mg/kg de antioxidante. Verifica-se, porém, que houve diferença significativa entre os valores da estabilidade oxidativa no intervalo de 300 a 1.000 mg/kg e que tais valores aumentaram com o aumento da dosagem, não demonstrando, portanto, efeito pró-oxidante. Esse resultado está de acordo com o que tem sido verificado por alguns pesquisadores; a atividade antioxidante do extrato de alecrim tem aumentado com o aumento da concentração na faixa de 300 a 1.000 mg/kg³¹.

No caso das concentrações de α -tocoferol adicionadas, houve diferença significativa entre os valores da estabilidade oxidativa no intervalo de 0 a 600 mg/kg e eles também aumentaram com o aumento da concentração, não apresentando, dessa forma, a característica pró-oxidante relatada pela literatura^{10, 7}.

Esse fato pode ser justificado pelo uso de diferentes métodos para acompanhar a oxidação, visto que, segundo Evans et al.¹⁰, a aparente relação entre a concentração de tocoferol e sua atividade antioxidante pode ser influenciada pelo método analítico usado para determinar a extensão e o ponto final da

Tabela 3. Estabilidade oxidativa (horas) do óleo de soja purificado adicionado de diferentes concentrações de extrato de alecrim.

Antioxidante	Concentrações (mg/kg)					
	0	100	300	500	800	1.000
Alecrim	0,48 ^e	0m,67 ^e	1,69 ^d	2,96 ^c	5,07 ^b	6,02 ^a

a, b ... (linha) - médias de Concentrações seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

Tabela 4. Estabilidade oxidativa (horas) do óleo de soja purificado adicionado de diferentes concentrações de α -tocoferol.

Antioxidante	Concentrações (mg/kg)					
	0	100	200	400	600	700
α -tocoferol	0,48 ^e	2,65 ^d	5,42 ^c	6,78 ^b	7,70 ^a	7,71 ^a

a, b ... (linha) - médias de Concentrações seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

oxidação; no presente trabalho, foi utilizado o Rancimat a 100°C, enquanto os pesquisadores citados utilizaram a determinação de peróxidos e dienos conjugados com oxidação acelerada a 50°C. Esse fator tem contribuído para as opiniões conflitantes em trabalhos publicados considerando as concentrações necessárias para estabilizar óleo de soja; vale salientar, inclusive, que as concentrações ótimas de α -tocoferol para inibir a oxidação pela formação ou decomposição de hidroperóxidos são contraditórias²⁸.

Verifica-se, ainda, pela Tabela 4, que não houve diferença significativa na estabilidade oxidativa das amostras com 600 e 700 mg/kg de α -tocoferol.

O efeito de um antioxidante é chamado Fator de Estabilização e é expresso como a razão entre o período de indução de um óleo na presença do antioxidante e o período de indução do mesmo óleo na ausência do antioxidante³². Quanto maior o valor do Fator de Estabilização, melhor a atividade antioxidante³³.

Na Tabela 5, são apresentados os Fatores de Estabilização para todas as concentrações dos antioxidantes testadas no presente trabalho.

Verifica-se, pelos valores do Fator de Estabilização da Tabela 5, que o extrato de alecrim foi eficiente em retardar a oxidação, mas o α -tocoferol foi melhor. Por outro lado, ao avaliar o Fator de Estabilização de 400 mg/kg de extrato de alecrim e a mesma concentração de α -tocoferol em óleo de soja natural, Lalas e Dourtoglou²⁹ encontraram maior valor para o extrato de alecrim do que para α -tocoferol: 1,86 e 1,04, respectivamente. Sobre isso, Chen et al.³⁴ afirmaram que o nível de proteção contra oxidação é diferente entre os extratos de alecrim e depende do método de extração, estando intimamente relacionado com o teor de diterpenos fenólicos.

Em pesquisa realizada por Bauman et al.³⁵, a concentração dos diterpenos fenólicos determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em extratos de alecrim comercialmente disponíveis variou de 2,8 a 22,5%, sendo que a atividade antioxidante dos extratos dependeu

Tabela 5. Fator de Estabilização para os antioxidantes testados em óleo de soja purificado.

Concentrações mg/kg	Fator de Estabilização (F)	
	extrato de alecrim	α -tocoferol
100	1,40	5,52
200		11,29
300	3,52	
400		14,13
500	6,17	
600		16,04
700		*
800	10,56	
1.000	12,54	

* Não houve diferença significativa na estabilidade oxidativa das amostras com 600 e 700 mg/kg de α -tocoferol.

diretamente da concentração desses compostos. Em estudo realizado por Schwarz et al.³⁶, os 100 mg/kg de extrato de alecrim adicionados em banha, utilizada como substrato lipídico por ter conteúdo de antioxidantes naturais extremamente baixo, aumentaram o período de indução, obtido através do Rancimat a 100°C, de 2 horas para 5,8 a 16 horas, conforme a concentração de diterpenos fenólicos do extrato que variou de 2,78 a 22,49%.

Vale ressaltar que o α -tocoferol utilizado no presente trabalho tem pureza de 97%, enquanto o extrato de alecrim tem 4% de diterpenos fenólicos. A eficácia tanto do extrato de alecrim quanto do carnosol e do ácido carnósico também é significativamente influenciada pelo tipo de sistema testado (óleo ou emulsão), tipo de óleo como substrato (milho, soja, amendoim, peixe), método usado para acompanhar a oxidação (formação de dienos conjugados, hexanol ou propanol) e concentração utilizada para os antioxidantes³⁷. Lalas e Dourtoglou²⁹ observaram que a proteção antioxidante do extrato também pode ser influenciada pelo efeito sinérgico entre os componentes; contudo, o mecanismo deste sinérgico é ainda desconhecido.

No presente estudo, com base na estabilidade oxidativa encontrada e no Fator de Estabilização, a ordem da atividade antioxidante foi 600 mg/kg TOC > 400 mg/kg TOC > 1.000 mg/kg ALE > 200 mg/kg TOC > 800 mg/kg ALE > 500 mg/kg ALE > 100 mg/kg TOC > 300 mg/kg ALE > 100 mg/kg ALE.

O Fator de Estabilização mais alto para o α -tocoferol e para o extrato de alecrim foi na concentração de 600 e 1.000 mg/kg, respectivamente.

CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos concluiu-se que:

O extrato de alecrim, com 4% de diterpenos fenólicos, demonstrou ter efeito protetor sobre o óleo de soja contra a oxidação, quando aplicado nas concentrações de 300 a 1.000 mg/kg, mas o α -tocoferol, com 97% de pureza, aplicado nas concentrações de 100 a 700 mg/kg, foi mais eficiente.

Dentre as concentrações avaliadas, 600 mg/kg de α -tocoferol e 1.000 mg/kg de extrato de alecrim promoveram maior estabilidade oxidativa ao óleo de soja purificado medida por meio do Rancimat.

Tanto o α -tocoferol quanto o extrato de alecrim não demonstraram efeito pró-oxidante nos níveis testados.

A adição de extrato de alecrim ao óleo de soja mostrou efeito positivo sobre a estabilidade oxidativa desta matéria-prima e poderia ser indicado como antioxidante alternativo na conservação de óleos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem às empresas Cargill Agrícola S.A. e Danisco S/A pelas amostras de óleo e extrato de alecrim.

REFERÊNCIAS

1. Lima J R, Gonçalves L A G Avaliação analítica de óleos utilizados em processo de fritura. *Bol SBCTA* 1995; 29: 186-92.
2. Karpinska M, Borowski J, Danowska O M The use of natural antioxidants in ready-to-serve food. *Food Chem* 2001; 72: 5-9.
3. Botterweck A A, Verhagen H, Goldbohm R A, Kleinjans J, Brandt P A Intake of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene and stomach cancer risk: results from analyses in the netherlands cohort study. *Food Chem Toxicol* 2000; 38: 599-605.
4. Almeida-Doria R F, Regitano-D'Arce M A B Antioxidant activity of rosemary and oregano ethanol extracts in soybean oil under thermal oxidation. *Ciênc Tecnol Aliment* 2000; 20: 01-14.
5. Soares S E Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Rev Nutr* 2002; 15: 1-13.
6. Kamal-Eldin A, Appelqvist L A The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids* 1996; 31: 671-701.
7. Jung M Y, Min D B Effects of α , γ , e δ tocopherols on oxidative stability of soybean oil. *J Food Sci* 1990; 55: 1464-5.
8. Kochhar S P Stabilization of frying oils with natural antioxidative components. *Eur J Lipid Sci Technol* 2000; 102: 552-9.
9. Romero N et al. Effect of α -tocopherol and α -tocotrienol on the performance of chilean hazelnut oil (*Gevuina avellana* Mol) at high temperature. *J Sci Food Agric* 2004; 84: 943-8.
10. Evans J C, Kodali D R, Addis P B Optimal tocopherol concentration to inhibit soybean oil oxidation. *J Am Oil Chem Soc* 2002; 79: 47-51.
11. Frankel E N Antioxidants in lipid foods and their impact on food quality. *Food Chem* 1996; 57: 51-5.
12. Chipault J R, Mizuno G R, Lundberg W O Antioxidants properties of spices in oil-in-water emulsions. *Food Res* 1955; 20: 443-8.
13. Cuvelier M E, Berset C, Richard H Antioxidant constituents in sage. *J Agric Food Chem* 1994; 42: 665-9.
14. Valenzuela A B, Sanhueza J, Nieto S Natural antioxidants in functional foods: from food safety to health benefits. *Grasas y Aceites* 2003; 54: 295-303.
15. Basaga H, Acikel F, Tekkaya C Antioxidative and free radical scavenging properties of rosemary extract. *Lebensm Wissens Technol* 1997; 30: 105-8.
16. Steel C J Gorduras vegetais hidrogenadas: produtos da termoxidação e ação antioxidante dos tocoferóis [Tese de Doutorado] Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 2002. 234 p.
17. American Oil Chemists' Society. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society. *Methods Cd 12b-92, Cd 8-53, Ti 1a-64*: Campaign USA; 1993.
18. Dobarganes M C, Velasco J, Dieffenbacher A Determination of polar compounds, polymerized and oxidized triacylglycerols, and diacylglycerols in oils and fats. *Pure Appl Chem* 2000; 72: 1563-75.
19. American Oil Chemists' Society. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society. *Method Ce 8-86*: Campaign USA; 1998.
20. Gomes F P Curso de estatística experimental, 14. ed. Piracicaba: Editora Nobel; 2000. 477 p.
21. Barrera-Arellano D, Ruiz-Méndez V, Velasco J, Márquez-Ruiz G, Dobarganes C Loss of tocopherols and formation of degradation compounds at frying temperatures in oils differing in degree of unsaturation and natural antioxidant content. *J Sci Food Agric* 2002; 82: 1696-702.
22. Fuster M A, Lampi A M, Hopia A, Kamal-Eldin A Effects of α and γ -tocopherols on the autoxidation of purified sunflower triacylglycerols. *Lipids* 1998; 33: 715-22.
23. Souza W S M Termoxidação de gorduras animais [Dissertação de Mestrado]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 2001. 79 p.
24. Antoniassi R Métodos de avaliação da estabilidade oxidativa de óleos e gorduras. *BCPPA* 2001; 19: 353-80.
25. Lima J R, Gonçalves L A G Parâmetros de avaliação da qualidade de óleo de soja utilizado para fritura. *Quím Nova* 1994; 17: 392-6.
26. Cuesta P J M, Martínez E R, Chaparro M G Enranciamiento oxidativo de aceites vegetales in presencia de α -tocoferol. *Grasas y Aceites* 1995; 46: 349-53.
27. Frankel E N, Huang S W, Prior E, Aeschbach R Antioxidant activity of a rosemary extracts and its constituents, carnosic acid, carnosol, and rosmarinic acid, in bulk oil and oil-in-water emulsion. *J Agric Food Chem* 1996; 44: 131-5.
28. Huang S W, Frankel E N, German J B Antioxidant activity of α and γ tocopherols in bulk oils and in oil-in-water emulsions. *J Agric Food Chem* 1994; 42: 2108-14.
29. Lalas S, Dourtoglou V Use of rosemary extract in preventing oxidation during deep-fat frying of potato chips. *J Am Oil Chem Soc* 2003; 80: 579-83.
30. Rizner-Hras A, Hadolin M, Knez Z, Bauman D Comparison of antioxidative and synergistic effect of rosemary extract with α -tocopherol, ascorbyl palmitate and citric acid in sunflower oil. *Food Chem* 2000; 71: 229-33.
31. Gordon M H, Kourimská L Effect of antioxidants on losses of tocopherols during deep-fat frying. *Food Chem* 1995; 52: 175-7.
32. Yanishlieva N V, Marinova E M Antioxidative effectiveness of some natural antioxidants in sunflower oil. *Z Lebensm Unters Forsch* 1996; 203: 203-23.
33. Elizabete B E, Bressa F, Rosa M D Antioxidative action of maillard reactions volatiles: influence of maillard solution level. *J Am Oil Chem Soc* 1992; 69: 331-4.
34. Chen Q, Shi H, Ho C T Effects of rosemary extracts and major constituents on lipid oxidation and soybean lipoxigenase activity. *J Am Oil Chem Soc* 1992; 69: 999-1002.
35. Bauman D, Hadolin M, Rizner-Hras A, Knez Z Supercritical fluid extraction of rosemary and sage antioxidants. *Acta Aliment* 1999; 28: 15-28.
36. Schwarz K, Ternes W, Schmauderer E Antioxidative constituents of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis*. III. Stability of phenolic diterpenes of rosemary extracts under thermal stress as required for technological processes. *Z Lebensm Unters Forsch* 1992; 195: 104-7.
37. Frankel E N, Huang S, Prior E, Aeschbach R Evaluation of antioxidant activity of rosemary extracts, carnosol and carnosic acid in bulk vegetable oils and fish oil and their emulsions. *J Sci Food Agric* 1996; 72: 201-8.

Influência de nutrientes no crescimento fúngico e na produção de fumonisinas e aflatoxinas em grãos de milho

The nutrients effect on mycoflora, and for fumonisins and aflatoxins production in corn grain

RIALA6/1056

Regina H. HASSEGAWA^{1*}, Patrícia ZORZETE², Tatiana A. REIS², Antonio Luiz FANCELLI³, Homero FONSECA³, Adriana P. de ALMEIDA⁴, Benedito CORRÊA²

¹ Departamento da Ciência da Saúde, Centro Universitário Nove de Julho, UNINOVE, Rua Diamantina, 302, Vila Maria, São Paulo, e-mail: rhassegawa@yahoo.com

² Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Microbiologia, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 1374, Cidade Universitária, CEP 05508-900, São Paulo.

³ Departamento da Produção Vegetal, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

⁴ Divisão de Bromatologia e Química, Seção de Química Biológica do Instituto Adolfo Lutz.

Recebido 23/03/2006 – Aceito para publicação 31/05/2006

RESUMO

O presente experimento teve como objetivo correlacionar os resultados obtidos da microbiota fúngica e produção de micotoxinas com os níveis de nitrogênio, zinco e boro utilizados no plantio do milho. Foram realizados tratamentos com quatro concentrações de nitrogênio (0, 50, 100 e 150 kg/ha) de forma interativa com duas concentrações de zinco (0,5 e 1,0 kg/ha), duas concentrações de boro (0,25 e 0,5 kg/ha) e duas concentrações de zinco mais boro (0,5 e 1,0; 0,25 e 0,5 kg/ha respectivamente), perfazendo um total de 25 tratamentos. A média de contaminação das amostras de milho pelos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* foi de 42,7; 38,9 e 41,5% respectivamente, principalmente na faixa de 0,53 a 0,63 de atividade de água. A análise de fumonisinas revelou uma contaminação em 100% das amostras, em níveis que variaram de 1,7 a 27,9 mg/kg para FB₁ e de 0,3 a 11,2 mg/kg para FB₂. Foi detectada aflatoxina B₁ em 7 amostras de milho (16,0 a 1858,3 µg/kg) e B₂ em 3 amostras (14,6 a 110,3 µg/kg). A Análise de Variância demonstrou que o nitrogênio foi positivamente significativo (p<0,05) sobre a porcentagem de contaminação pelo gênero *Fusarium*, enquanto que para o gênero *Aspergillus* foi negativamente significativo (p<0,10).

Palavras-Chave. aflatoxinas, fumonisinas, grãos de milho, nutrientes, microbiota fúngica.

ABSTRACT

The present study aimed to correlate the mycoflora and mycotoxins production with nitrogen, zinc, and boro levels used during the corn grain crop. For the experiment, following treatments were done: use of four doses of nitrogen (0, 50, 100, and 150 kg/ha), two levels of zinc (0.5 and 1.0 kg/ha), two of boro (0.25 and 0.5 kg/ha), and two levels of zinc and boro (0.5 and 1.0, 0.25 and 0.5 kg/ha, respectively). Twenty-five treatments were performed. The corn mycoflora profiles showed that *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium* contaminations prevailed in 42.7, 38.9, and 41.5% of samples, respectively. The highest frequencies of isolated fungal were detected mainly at a_w values of 0.53-0.63. Fumonisins analysis indicated a contamination in 100% of corn samples, at concentrations ranging from 1.7 to 27.9 mg/kg for FB₁, and from 0.3 to 11.2 mg/kg for FB₂. Seven corn grain samples were contaminated with aflatoxin B₁ at concentrations ranging from 16.0 to 1,858.3 mg/kg, and three samples were contaminated with aflatoxin B₂ at concentrations that ranged from 14.6 to 110.3 mg/kg. Statistical analysis indicated that the nitrogen did influence on the prevalence of *Fusarium* spp. in corn grains (p<0.05). A significant negative correlation was observed between nitrogen and the genus *Aspergillus* prevalence in corn grains (p<0.10).

Key Words. aflatoxins, fumonisins, corn, nutrients, mycoflora

INTRODUÇÃO

Micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por fungos filamentosos, que apresentam atividade carcinogênica, mutagênica, teratogênica e estrogênica. Devido a esses efeitos tóxicos, a presença de micotoxinas em alimentos e rações é potencialmente perigosa para saúde humana e animal¹.

As fumonisinas são micotoxinas produzidas, principalmente, pelos fungos *Fusarium verticillioides* e *F. proliferatum*, que se encontram frequentemente no milho e em seus derivados². A fumonisina B₁ (FB₁) é a mais tóxica e a mais encontrada em amostras de milho¹. Com base nas evidências toxicológicas, a Internacional Agency for Research on Cancer - IARC classificou as fumonisinas como pertencentes à Classe 2B, possivelmente carcinogênica a seres humanos, embora ainda não haja evidência suficiente³.

As aflatoxinas são metabólitos secundários fúngicos produzidos, principalmente, por *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*. São conhecidas 17 substâncias do grupo sendo as aflatoxinas B₁ (AFB₁), B₂ (AFB₂), G₁ (AFG₁) e G₂ (AFG₂) as mais encontradas em alimentos⁴. As aflatoxinas foram classificadas na Classe 1 dos carcinógenos humanos sendo a aflatoxina B₁ a mais tóxica, tendo o fígado como alvo principal³.

O milho é o cereal mais tradicional no Brasil, e também é um excelente substrato para o desenvolvimento de fungos toxigênicos, por isso a utilização de métodos de produção e conservação, contra ataque fúngico é de grande interesse. Além do mais o milho é utilizado intensamente durante todo o ano e sua produção ocorre somente em um restrito período de tempo.

Uma nutrição mineral balanceada com macronutrientes e micronutrientes protege as plantas contra ataques fúngicos, porém aquelas que não tiverem uma nutrição adequada podem desenvolver doenças, aumentando a severidade da enfermidade, conseqüentemente, diminuindo a produtividade e favorecendo a produção de micotoxinas⁵⁻⁷.

O macronutriente mais importante é o nitrogênio, que faz parte de várias moléculas de proteínas, enzimas, coenzimas e ácidos nucléicos⁸⁻⁹. Excesso de nitrogênio nas plantas pode promover um crescimento vegetativo prolongado, onde as folhas ficam mais expostas aos patógenos e a parede celular fica mais fina e vulnerável à penetração de fungos¹⁰.

O zinco é um micronutriente que tem funções metabólicas essenciais à planta. Ele participa como componente de um grande número de enzimas, como as desidrogenases, proteinases, peptidases e fosfoidrolases. Além disso, o zinco está relacionado com o metabolismo dos carboidratos, das proteínas, dos fosfatos e na formação da estrutura de auxinas, de RNA e de ribossomos¹¹. Com a deficiência de zinco as plantas ficam mais susceptíveis à várias doenças, muitas de origem fúngica¹². O zinco desempenha papel de destaque na biossíntese de muitos metabólitos secundários, incluindo policetídeos do grupo das aflatoxinas¹³⁻¹⁵. O zinco liga-se ao ácido nucléico, afetando a expressão dos genes de algumas enzimas, envolvidas no metabolismo dos fungos toxigênicos e na síntese das micotoxinas¹⁶.

O boro é um micronutriente essencial para as plantas, pois participa da síntese da parede celular e da integridade das membranas plasmáticas das plantas¹⁷.

O presente experimento teve como objetivo avaliar os efeitos dos nutrientes nitrogênio, zinco e boro, aplicados durante o plantio de milho, na microbiota fúngica e na produção de aflatoxinas e fumonisinas, em amostras de milho recém-colhido.

MATERIAL E MÉTODOS

Local do experimento

O estudo foi conduzido na estação experimental da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz - ESALQ-USP, situada no município de Piracicaba-SP, a 22°43'S, 47°38'W, 580 m de altitude. O delineamento experimental utilizado foi o de blocos casualizados, onde foram distribuídas nove sementes por metro linear de sulco, cada parcela experimental foi composta por quatro linhas de 5 m de comprimento, com espaçamento de 0,8 m entre si, perfazendo uma área total de 16 m².

Híbrido de milho

A semente para o plantio foi o híbrido Cargill 909. A semeadura foi realizada em setembro de 1999 e as espigas de milho colhidas em janeiro de 2000. No total foram analisadas 72 amostras de grãos de milho provenientes de diferentes tratamentos com zinco, boro e nitrogênio, quanto à contaminação por fungos, aflatoxinas e fumonisinas.

Tratamentos

Os nutrientes foram aplicados, via foliar, na segunda (4 folhas) e na quarta semana (8 folhas), após a emergência da planta de milho. As fontes de nitrogênio, zinco e boro foram uréia, sulfato de zinco e ácido bórico, respectivamente, onde as quatro doses de nitrogênio (0, 50, 100 e 150) foram aplicadas de forma interativa com zinco (0, 0,5 e 1,0 kg/ha) e boro (0, 0,25 e 0,5 kg/ha). Todos os tratamentos foram realizados em três repetições no campo, com a exceção do tratamento 1. Os 25 tratamentos estão indicados na Tabela 1.

Atividade de água

A atividade de água dos grãos de milho foi determinada utilizando-se o aparelho AQUALAB CX-2 (Decagon Devices Inc., Pullman, Washington).

Contagem, isolamento e identificação da microbiota fúngica dos grãos de milho

A microbiota fúngica dos grãos foi determinada de acordo com o método de Berjak¹⁸. De cada amostra de milho, uma sub-amostra de 33 grãos foi desinfetada superficialmente com hipoclorito de sódio a 2 % por 3 minutos e lavada três vezes com água destilada esterilizada. Onze grãos foram plaqueados em placa de Petri contendo o meio Ágar Dicloran Rosa Bengala Cloranfenicol. As placas foram incubadas a 25

Tabela 1. Níveis de nitrogênio, zinco e boro utilizados no plantio de milho (Tratamentos).

Tratamento	Descriminação	Composição
1	Nitrogênio (0kg/ha)	Zinco (0 kg/ha) + Boro (0kg/ha)
2		Zinco (0,5kg/ha)
3		Zinco (1,0kg/ha)
4		Boro (0,25kg/ha)
5		Boro (0,5kg/ha)
6		Zinco (0,5kg/ha)+Boro (0,25kg/ha)
7		Zinco (1,0kg/ha)+Boro (0,5kg/ha)
8	Nitrogênio (50kg/ha)	Zinco (0,5kg/ha)
9		Zinco (1,0kg/ha)
10		Boro (0,25kg/ha)
11		Boro (0,5kg/ha)
12		Zinco (0,5kg/ha)+Boro (0,25kg/ha)
13		Zinco (1,0kg/ha)+Boro (0,5kg/ha)
14	Nitrogênio (100kg/ha)	Zinco (0,5kg/ha)
15		Zinco (1,0kg/ha)
16		Boro (0,25kg/ha)
17		Boro (0,5kg/ha)
18		Zinco (0,5kg/ha)+Boro (0,25kg/ha)
19		Zinco (1,0kg/ha)+Boro (0,5kg/ha)
20	Nitrogênio (150kg/ha)	Zinco (0,5kg/ha)
21		Zinco (1,0kg/ha)
22		Boro (0,25kg/ha)
23		Boro (0,5kg/ha)
24		Zinco (0,5kg/ha)+Boro (0,25kg/ha)
25		Zinco (1,0kg/ha)+Boro (0,5kg/ha)

°C por 5 dias. As colônias fúngicas foram contadas e identificadas em nível de gênero. Entretanto aqueles pertencentes ao gênero *Fusarium* e *Aspergillus* foram classificados até espécie de acordo com os compêndios Raper & Fennell¹⁹; Arx²⁰; Nelson et al.²¹ e Nelson²².

Análise de Fumonisinas

As amostras de milho foram extraídas de acordo com o método de Sydenham *et al.*²³. Os extratos das amostras foram ressuspendidos com 200 µL de acetonitrila:água (1:1), e derivatizados com uma solução de ortoftaldialdeído-OPA (40 mg de OPA, 1 mL metanol, 5 mL tetraborato de sódio 0,1 M e 50 µL 2-mercaptoetanol) por 2 minutos. O produto dessa reação foi analisado no Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência-CLAE, em fase reversa e modo isocrático (Bomba Shimadzu LC-10AD, Detector de fluorescência RF-10AXL). Para separação foi empregada a coluna analítica 5 µm ODS-20 C₁₈ (150x 4,6 mm, Phenomenex - Ultracarb) e como fase móvel, foi utilizado o sistema acetonitrila:água:ácido acético (50:50:1), com vazão de 1,0 mL/min. e temperatura de coluna 24°C. Essa composição de fase móvel permitiu a obtenção de pressão e viscosidade de fase móvel adequadas, com separação e tempo de retenção: t_r FB₁= 8-10 minutos e t_r FB₂= 22-24 minutos. O limite de detecção do método foi de 50ng/g, tanto para fumonisina B₁ quanto para fumonisina B₂ e a taxa de recuperação foi de 88% e 94% para FB₁ e FB₂, respectivamente.

Análise de Aflatoxinas

As amostras de milho foram quantificadas de acordo com o método de extração de Soares e Rodriguez-Amaya²⁴. Os extratos das amostras foram ressuspendidos em 500 µL de clorofórmio e aplicados em cromatofolha de alumínio (Sílica Gel 60G - Merck). A quantificação foi feita por métodos visuais através da luz ultravioleta (366nm), comparando a intensidade da fluorescência do padrão com as das amostras. O limite de detecção do método foi de 2 µg/kg e a taxa de recuperação foi de 80 %.

Análise estatística

Os dados obtidos de cada característica avaliada foram submetidos a quatro modelos de análise da variância (p<0,05 e p<0,1), com dois fatores, para que o efeito do nitrogênio, zinco e boro sobre a contaminação fúngica e produção de micotoxinas fosse analisado. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa "Statistical Analysis System-SAS" (versão 6.11)²⁵.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Atividade de água

A atividade de água influencia nas interações com os fungos, na habilidade em produzir esporos, nas atividades metabólicas e, principalmente, na produção de micotoxinas²⁶.

A atividade de água dos grãos de milho recém-colhidos variou de 0,53 a 0,63. Os valores de atividade de água encontrados nas amostras analisadas foram baixos para a produção de fumonisinas pelo *Fusarium verticillioides*. Isto sugere que a produção das fumonisinas tenha ocorrido antes da colheita do milho. Cahagnier et al.²⁷ constataram que não há produção de fumonisinas B₁ em atividade de água de 0,85 a 0,86. Marin et al.²⁸ observaram uma maior produção de fumonisinas B₁ em grãos de milho com atividade de água entre 0,95 a 0,96. Almeida et al.²⁹ verificaram que os mais altos níveis de contaminação de fumonisina B₁ em grãos de milho ocorreram em valores de atividade de água que variaram de 0,93 a 0,99.

Microbiota fúngica dos grãos de milho

A contaminação média dos grãos de milho pelos fungos *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp. e *Penicillium* spp., nos 24 tratamentos, foi de 42,7; 41,5 e 38,9 %, respectivamente. Além desses, também foram encontrados fungos dos gêneros *Trichoderma* (11,02 %), *Nigrospora* (3,0 %), *Cladosporium* (3,34 %), *Rhizopus* (3,0 %), *Cephalosporium* (11,02 %), Fungos Não Esporulados - FNE (18,18 %) e leveduras (24,0 %). O

O fungo *Aspergillus flavus* foi isolado dos grãos de milho de todos os tratamentos, onde a contaminação média, por este fungo, nos tratamentos sem nitrogênio e com nitrogênio 50, 100 e 150 kg/ha foram respectivamente, 37,3 %, 39,4 %, 42,2 % e 21 %. Outras espécies de *Aspergillus* isoladas foram *A. niger*, *A. ochraceus* e *A. terreus*.

Quanto à contaminação dos grãos de milho pelo fungo *Fusarium* spp., a espécie mais freqüente foi o *F. verticillioides*, que aparece numa porcentagem de 30,1 % no milho sem adição de nitrogênio e 39,7 %, para o milho tratado com nitrogênio 50 kg/ha, 41,1 % para o milho tratado com nitrogênio 100 kg/ha e 63,3 % para o milho tratado com 150 kg/ha. Outra espécie, menos freqüente, foi o *F. proliferatum* encontrado nos tratamentos sem adição de nitrogênio e com adição de nitrogênio 50 e 100 nas porcentagem de 3 %, 3 % e 15,1 %, respectivamente.

O efeito do nitrogênio sobre a contaminação dos grãos de milho por *Fusarium* spp. foi positivamente significativo ($p < 0,05$), ou seja o aumento da concentração de nitrogênio proporcionou um aumento da contaminação dos grãos de milho pelo *Fusarium* spp. O nitrogênio pode aumentar a resistência da planta, mas em concentrações elevadas favorece o aparecimento de doenças facilitando a infecção por *Fusarium* spp.³⁰. Duffy e Defago³¹ verificaram que os fertilizantes, utilizados como fonte de nitrogênio, influenciaram na severidade de doenças causadas por *Fusarium* spp. Celar³² estudou a competição por nitrogênio entre fungos fitopatogênicos (*F. solani*, *F. sambucinum* e *F. verticillioide*) e antagonístico (*Trichoderma* spp.), verificou que os fungos do gênero *Fusarium* utilizaram nitrito mais rapidamente, como também duas fontes de nitrogênio simultaneamente do que os fungos antagonísticos. Portanto *Fusarium* spp. é um bom competidor pelo nutriente nitrogênio favorecendo no seu

desenvolvimento. Sarathchandra et al.³³ também verificaram que com o aumento de nitrogênio no solo aumentava a contaminação da planta por *Fusarium* spp.

Ao contrário do *Fusarium* spp. a contaminação dos grãos de milho pelo gênero *Aspergillus* diminuiu quando aumentou a concentração de nitrogênio. Este fato pode ser devido ao aumento da contaminação dos grãos de milho pelo *Fusarium* spp. inibindo, assim, o fungo *Aspergillus* spp. Marin et al.²⁸ observaram que em condições favoráveis para o crescimento do gênero *Fusarium* houve inibição do crescimento de *Aspergillus* spp.

O zinco e o boro não tiveram um efeito significativo sobre o crescimento de *Fusarium* spp. porém, observamos que o zinco na concentração 0,5 kg/ha foi mais favorável a contaminação fúngica dos grãos do que o zinco na concentração de 1,0 kg/ha. A deficiência de zinco na planta causa perda da integridade da membrana, aumentando a sua permeabilidade e favorecendo a infecção pelos fungos³⁴. Zubaidi et al.³⁵ observaram que a alta concentração de zinco no cultivo de trigo aumentou a resistência da planta contra a colonização pelo *F. graminearum*. Cuero¹⁶ verificou que solo contendo zinco quelado, inibiu o crescimento de *F. verticillioides*.

Nos tratamentos N(50), N(100) e N(150) combinados com B(0,25) os grãos de milho foram menos contaminados por *Fusarium* spp. quando comparados com B(0,5). Guerra e Anderson³⁶ observaram que a deficiência de boro resulta em um aumento da contaminação do feijoeiro por *F. solani*. O boro aplicado em concentrações elevadas pode causar toxidez e a sua deficiência pode causar inibição do crescimento da planta, morte da gema apical, necrose, menor produção de sementes e além disso, liberar sacarose e aminoácidos que são nutrientes para pragas e patógenos de planta, favorecendo a contaminação⁹.

A Figura 1 mostra a freqüência relativa (%) de fungos isolados de grãos de milho cultivados em diferentes concentrações de nitrogênio, zinco e boro.

Concentração de Fumonisinas B₁ e B₂ nos grão de milho

A análise de 72 amostras de grãos de milho coletadas em diferentes tipos de tratamento revelou uma contaminação com fumonisinas em 100 % das amostras em níveis que variaram de 1,7 a 27,9 mg/kg (FB₁) e de 0,3 a 11,2 mg/kg (FB₂). Nos tratamentos controles sem nitrogênio, zinco e boro os níveis de fumonisina B₁ e B₂ foram de 11,5 e 2,5 mg/kg, respectivamente (Figura 2).

O macronutriente nitrogênio, além de ter influenciado na contaminação fúngica por *Fusarium* spp., também teve efeito significativo sobre a produção de fumonisina B₁.

Os dados do presente trabalho revelaram que nos tratamentos N(50) combinado com boro (0,25) e N(50) combinado com zinco (0,5) e boro (0,25), foram encontrados uma maior concentração das fumonisinas B₁ e B₂ nos grãos de milho do que nos tratamentos N(100), concentração esta normalmente utilizada na adubação de milho no Brasil. Anderson et al.³⁷, verificaram que a insuficiência de nitrogênio em plantas fertilizadas aumentou duas vezes mais a produção

de toxinas em relação às plantas fertilizadas com concentração ótima de nitrogênio. O zinco e o boro não foram estatisticamente significativos ($p > 0,05$) para a produção de fumonisinas.

Mesmo tendo uma maior contaminação por *Fusarium* spp. nos tratamentos N(0), N(50) e N(100) combinados com B(0,5), a produção de fumonisinas B₁ e B₂ quando comparada com o tratamento B(0,25) foi bem menor. Uma explicação para este fato pode ser a baixa produção de fumonisinas pelas cepas de *Fusarium verticillioides*.

Concentração de Aflatoxinas B₁ e B₂ nos grãos de milho

A aflatoxina B₁ foi detectada em 7 (9,7 %) amostras de grãos de milho com níveis que variaram de 16,0 a 1858,3 µg/kg e aflatoxina B₂ em 3 (4,2 %) amostras com níveis que variaram de 14,6 a 110,3 µg/kg. A maior produção de aflatoxina B₁ foi encontrada no tratamento N(0) combinado com Zn(1,0) numa concentração de 1858,3 µg/kg (AFB₁) e 110,3 µg/kg (AFB₂), seguido do tratamento N(50) B(0,5) com 484,6 µg/kg (AFB₁) e 22 µg/kg (AFB₂), no tratamento N(50) Zn (0,5) apresentou 161,6 µg/kg (AFB₁) e 14,6 µg/kg (AFB₂), nos tratamentos N(100) Zn (0,5), N(150) Zn(1,0) e N(150) Zn (0,5) B (0,25) apresentaram 194 µg/kg (AFB₁) e a menor produção foi no tratamento N(100) Zn(0,5)B(0,25) com 16 µg/kg (AFB₁). Jones e Ducan³⁸ verificaram que em milho plantado com baixas concentrações de nitrogênio houve maior produção de aflatoxina B₁.

Bassir e Adekunle³⁹; Obidoa e Nudubuisi⁴⁰ não encontraram correlação entre produção de aflatoxinas e conteúdo de zinco, porém Cuero e Oullet⁴¹ constataram que o zinco é importante na produção de aflatoxinas e pouco efeito no crescimento de *A. flavus*. Failla et al.¹³ verificaram uma correlação positiva entre zinco e concentração de aflatoxinas no milho, produzidos por *A. flavus* e *A. parasiticus*. O zinco não só é importante para a produção de aflatoxinas, mas também na produção de fusarina C. Neste trabalho foi observado que os grãos de milho tratados com N(0) e N(50) e N(100) combinados com Zn(0,5) continham 7,6 µg/kg, 9,0 µg/kg, e 22,2 µg/kg (AFB₁), respectivamente e para AFB₂ 1,3 µg/kg, 1,7 µg/kg e 7,7 µg/kg, respectivamente, concentrações maiores do que os combinados com Zn(1,0) 5,1 µg/kg, 3,9 µg/kg, 11,4 µg/kg para AFB₁ e para AFB₂ 0,7 µg/kg, 0,7 µg/kg e 2,1 µg/kg, respectivamente. Jackson et al.¹⁴ constataram que a deficiência de zinco no meio promove um aumento da fusarina C, outra micotoxina produzida pela espécie *F. verticillioides*.

CONCLUSÕES

O presente trabalho demonstrou que a concentração de nitrogênio influenciou positivamente na contaminação pelo *Fusarium* spp. e negativamente na contaminação pelo *Aspergillus* spp. O nitrogênio foi significativo na produção de fumonisinas B₁ e B₂.

O zinco e boro não obtiveram efeito significativo sobre o crescimento de *Fusarium* spp. e *Aspergillus* spp., como

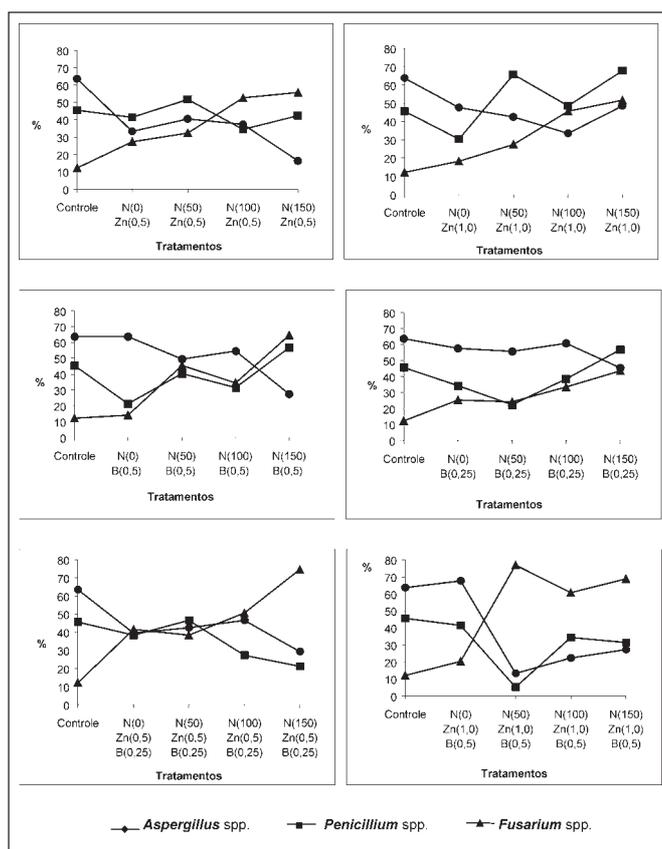


Figura 1. Frequências relativas (%) de fungos isolados de milho cultivado em diferentes concentrações de nitrogênio, zinco e boro.

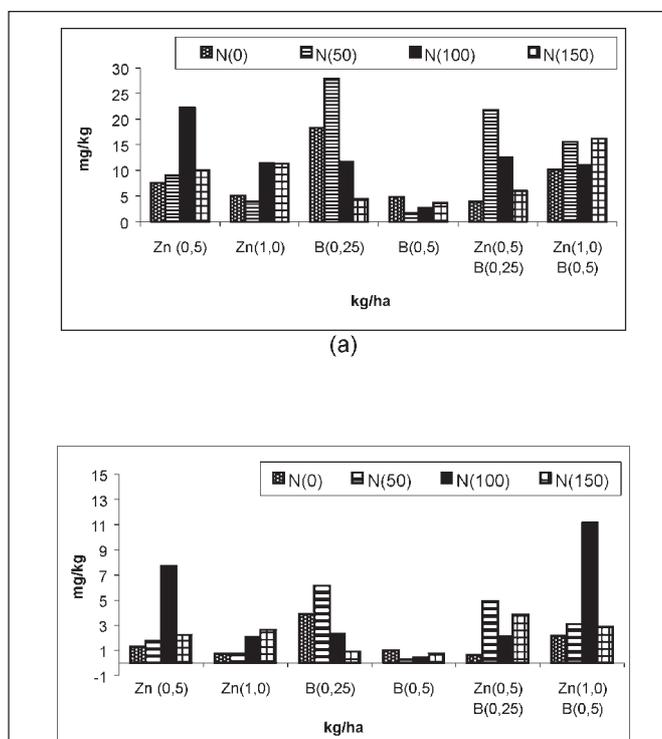


Figura 2. Incidência de (a) fumonisinas B₁ e B₂ e (b) fumonisina B₁ em 72 amostras de milho cultivadas em diferentes concentrações de nitrogênio, zinco e boro.

também na produção de fumonisinas e aflatoxinas.

The influence of nutrients on mycoflora and fumonisins / aflatoxins production in corn grain

REFERÊNCIAS

1. Pittet A. Natural occurrence of mycotoxins in foods and feeds – an updated review. *Revue Méd Vét* 1998; 149:479-92.
2. Gelderblom WCA et al. Fumonisin: novel mycotoxin with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. *Appl Environ Microbiol* 1988; 54: 1806-11.
3. International Agency on Research on Cancer [IARC]. Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. IARC. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Lyon: IARC, 1993. v.56.
4. Diener UL, Cole RJ, Sanders TH, Payne GA, Lee LS, Klich MA. Epidemiology of aflatoxin formation by *Aspergillus flavus*. *Ann Rev Phytopathol* 1987; 25: 249-70.
5. Stack RW, Horst RK, Langhans RW. Effects of nitrogen and potassium fertilization on infection of florists carnation by *Gibberella zeae*. *Plant Disease* 1986; 70:29-31.
6. Amézquita MO, Barrera AC, Arbeláez G, Granada EG, Ospira J. Evaluación dos sistemas de desinfección del suelo y su interacción con algunas formulaciones de microelementos sobre la incidencia de *Fusarium oxysporium* en dos variedades de clavel. *Agronomía Colombiana*, 1993;10: 122-7.
7. Cuero RG, Osuji G, Washington A. N-carboxymethylchitosan inhibition of aflatoxin production: role of zinc. *Biotechnol Letters* 1991; 13: 441-4.
8. Büll LT. Nutrição Mineral do Milho. In: *Cultura do Milho*. Simpósio sobre fatores que afetam a produtividade do milho e sorgo. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1990: 63-145.
9. Miller R, Donahue R. Potassium, sulfur, and micronutrients. In *Soils: An introduction to soils and plant growth* 6th ed. New Jersey: Prentice-Hall International Inc.; 1990. p.281-307.
10. Reid LM, Zhu X, Ma BL. Crop rotation and nitrogen effects on maize susceptibility to *Gibberella (Fusarium graminearum)* ear rot. *Plant and soil* 2001; 237: 1-14.
11. Borkert CM. Micronutrientes na planta. In: *Bull LT, Rosolem CA editores. Interpretação de análise química do solo e planta para fins de adubação*. Botucatu: Fundação de Estudos e Pesquisas Agrícolas Florestais; 1989: p.309-29.
12. Graham RD. Effects of nutrient stress on susceptibility of plants to disease with particular reference to the trace elements. *Adv Bot Research* 1983; 10:221-76.
13. Failla LJ, Lynn D, Niehaus GJ. Correlation of Zn²⁺ content with aflatoxin content of corn. *Appl Environ Microbiol* 1989; 52:73-4.
14. Jackson MA, Slininger PJ, Bothast RJ. Effects of zinc, iron, cobalt and manganese on *Fusarium moniliforme* NRRL 13616 growth and fusarin C biosynthesis in submerged cultures. *Appl Environ Microbiol* 1989; 55: 649-55.
15. Griffin DH. *Fungal Physiology*. New York: Wiley Interscience Publication; 1993.
16. Cuero RG. Regulation of mycotoxins formation and fungal growth by metal ions and fertilizer: Effect on fungal gene expression. In: *Koe WJ. editor. Mycotoxins and Phycotoxins in perspective at the turn of the millennium*. Guarujá, 2000. p. 355-361.
17. Yamada T. Boro: será que estamos aplicando a dose suficiente para o adequado desenvolvimento das plantas? *Informações Agronômicas - POTAFOS* 2000; 90:1-5.
18. Berjak P. Report of seed committee working group on the effects of storage fungi on seed viability. *Seed Sci Technol* 1984; 12: 233-53.
19. Raper KB, Fennell DI. *The genus Aspergillus*. Baltimore: Williams & Wilkins; 1965.
20. ARX JA von. *The genera of fungi sporulating in pure culture*. Vaduz: J. Cramer; 1974.
21. Nelson PE, Touson TA, Marasas WFO. *Fusarium species. An illustrated manual for identification*. Pennsylvania: University Press; 1983.
22. Nelson PE. Taxonomy and biology of *Fusarium moniliforme*. *Mycopathologia* 1992; 117:29-36.
23. Sydenham EW, Shephard GS, Thiel PG, Snijman PW, Stockenstrom S. Liquid chromatographic determination of fumonisin B1, B2 and B3 in corn: AOAC-IUPAC collaborative study. *J Assoc Off Anal Chem Int* 1996; 79: 688-96.
24. Soares LMV, Rodriguez-Amaya DB. Survey of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone and sterigmatocystin in some Brazilian foods by using multi-toxin thin layer chromatographic method. *J Assoc Off Anal Chem* 1989; 72: 22-6.
25. Draper NR, Smith H. *Applied regression analysis*. New York: John Wiley; 1981.
26. Lacey J. Water availability and the occurrence of toxigenic fungi and mycotoxins in stored products. In: *International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins*, 6. Anais Tokyo, 1988:186-89.
27. Cahagnier B, Melcion D, Richard-Molard D. Growth of *Fusarium moniliforme* and its biosynthesis of fumonisin B1 on maize grain as a function of different water activities. *Lett Appl Microbiol* 1995; 20: 247-51.
28. Marin S, Sanchis V, Arnau F, Ramos AJ, Magan N. Colonisation and competitiveness of *Aspergillus* and *Penicillium* species on maize in the presence of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum*. *Int J Food Microbiol* 1998; 45: 107-17.
29. Almeida AP, Corrêa B, Direito GM, Fonseca H, Fancelli AL, Ortega E. Mycoflora and fumonisin contamination in Brazilian corn from sowing to harvest. *J Agric Food Chem* 2002; 50:3877-82.
30. Miller JD. Epidemiology of *Fusarium* ear diseases of cereals. In: *Miler JD, Trenholm HL editores. Mycotoxins in grain*. St Paul: Eagan Press; 1994. p.19-36.
31. Duffy BK, Defago G. Trace mineral amendments in agriculture for optimizing the biocontrol activity of plant associated bacteria. In: *Berthelin, Huang PM, Bollag JB, Andreaux F editores. Effect of mineral-organic microorganism interaction on soil and freshwater environments*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers; 1999. p.295-304.
32. Celar, F. Competition for ammonium and nitrate forms of nitrogen between some phytopathogenic and antagonistic soil fungi. *Biological Control* 2003, 1-6
33. Sarathachandra U, Ghani A, Waller, J Burch, G Sayer S, Waipara N, Dexter M. Impact of carbon-rich dairy factory effluent on growth of perennial ryegrass (*Lolium perenne*) and soil microorganisms. *European Journal of Soil Biology* 2006, 42:13-22.
34. Thompson JE, Legge R, Baber RL. The role of free radicals in senescence and wounding. *New Phytol* 1987; 105:317-44.
35. Zubaidi A, McDonald GK, Hollamby GJ. Nutrient uptake and distribution by bread and durum wheat under drought conditions in South Australia. *Australian J Experim Agriculture* 1999; 39:721-32.
36. Guerra D, Anderson AJ. The effect of iron and boron amendments on infection of bean by *Fusarium solani*. *Physiol Biochem* 1985; 75:989-91.
37. Anderson HW, Nehring EW, Wichser WR. Aflatoxin contamination of corn in the field. *J Agric Food Chem* 1975; 23:775-82.
38. Jones RK, Duncan HE. Effect of nitrogen fertilizer, planting date, and harvest date on aflatoxin production in corn inoculated with *Aspergillus flavus*. *Plant Disease* 1981; 65: 741-4.
39. Bassir O, Adekunle AA. Production of aflatoxin B1 from defined natural cultures of *Aspergillus flavus* (Link). *Mycopathol Mycol Appl* 1972; 46:421-6.
40. Obidoa O, Nduhuisi IE. The role of zinc in the aflatoxigenic potential of *Aspergillus flavus* NRRC 3251 on foodstuffs. *Mycopathol* 1981; 74:3-6.
41. Cuero R, Ouellet T. Metal ions modulate gene expression and accumulation of the mycotoxins aflatoxin and zearalenone. *J Appl Microbiol* 2005; 98:598-605.

Avaliação físico-química e microbiológica de suco e néctares de maçã comercializados em cidades do Estado de São Paulo

Physical-chemical and microbiological evaluation of apple juice and nectar marketed in cities located in São Paulo State.

RIALA6/1057

Maria Helena IHA^{1*}, Sílvia C. CASTRO¹, Eliana G. A. RIBEIRO¹, Ricardo O. ANDRADE¹, Myrna SABINO²

*Endereço para correspondência: Instituto Adolfo Lutz – Laboratório I de Ribeirão Preto, Rua Minas, 877 – Campos Elíseos, 14085-410 – Ribeirão Preto-SP, e-mail: mhiha@ial.sp.gov.br.

1. Instituto Adolfo Lutz – Laboratório I de Ribeirão Preto

2. Instituto Adolfo Lutz – Laboratório Central

Recebido: 13/02/2006 – Aceito para publicação: 25/05/2006

RESUMO

A oferta de suco e néctar de maçã que sofreram algum tipo de tratamento para prolongar a vida de prateleira está aumentando nos estabelecimentos comerciais. O objetivo deste estudo foi avaliar a qualidade físico-química e microbiológica do suco de maçã comercializado no Estado de São Paulo. Foram analisadas 17 amostras de suco, 42 de néctar convencional e 7 de néctar de baixa caloria provenientes de diversas cidades do Estado de São Paulo. As análises físico-químicas realizadas foram: acidez volátil expressa em ácido acético; acidez total expressa em ácido málico; ácido ascórbico; pH; sólidos solúveis em °Brix a 20°C; relação °Brix/acidez; glicídios redutores em glicose e glicídios não redutores em sacarose; açúcares totais naturais da maçã, sólidos em suspensão e corantes orgânicos artificiais. Os exames microbiológicos foram: contagem padrão em placas de bactérias aeróbias mesófilas e termófilas e enumeração de bolores e leveduras. Todas as amostras analisadas estavam de acordo com os padrões estabelecidos pela legislação brasileira quanto aos parâmetros avaliados, mostrando que foi utilizado fruto de boa qualidade e não ocorreram falhas durante o processamento e/ou transporte e/ou estocagem do produto.

Palavras-Chave. suco de maçã, néctar de maçã, qualidade físico-química, qualidade microbiológica.

ABSTRACT

The apple juices and nectars drinks processed for extending their shelf life, have largely been placed for consumer disposal. The aim of this study was to assess the physical-chemical and microbiological quality of apple juice commercialized in São Paulo State. Seventeen-apple juices, 42 regular nectars, and 7 light nectars from diverse cities of São Paulo State were evaluated. The performed physical - chemical analyses were: volatile acidity expressed in acetic acid; total acidity expressed in malic acid; ascorbic acid; pH; soluble solids in °Brix at 25°C; sugar (reducing, nonreducing and total); solids in suspension, and colors additives. For microbiological assessment the following exams were carried out: mesophilic and thermophilic aerobic plate counting and enumeration of yeasts and molds. All analyzed samples were in agreement with physical-chemical and microbiologic standard parameters established by the Brazilian legislation, showing that high quality fruits were used for preparing these products, and also that the processing procedure and/or products transportation and/or storage were efficient.

Key Words. apple juice, physic-chemistry quality, microbiologic quality.

INTRODUÇÃO

O aumento da produção de maçã¹ diminui o valor comercial desta fruta possibilitando a sua industrialização, principalmente como suco de maçã. Nos estabelecimentos comerciais está havendo um aumento da oferta de sucos ou néctar de maçã que sofreram algum tipo de tratamento para

aumentar a vida de prateleira, sendo que alguns apresentam baixos teores de açúcares, denominados “light” ou de baixa caloria. Além disso, as maçãs, assim como seu suco, são ricos em frutose, um importante carboidrato da dieta², e compostos antioxidantes cujo consumo favorece a manutenção da saúde como a prevenção de certos tipos de câncer, como de pulmão³ e de cólon⁴.

As propriedades físico-químicas das maçãs variam de acordo com diversos parâmetros como estágio de maturação, variedade e região de plantio^{5, 6, 7, 8}. Portanto, o suco preparado da sua fruta também pode apresentar características físico-químicas diferentes. No Brasil, os parâmetros físico-químicos para o suco de maçã são estabelecidos pela Instrução Normativa nº 1⁹, para o néctar convencional pela Portaria nº. 371¹⁰ e para o néctar de baixa caloria pela Instrução Normativa SDA nº. 30¹¹.

Existem diversos tratamentos que podem ser utilizados no processamento de bebidas para aumentar a vida de prateleira e garantir a qualidade microbiológica do produto, tais como esterilização comercial, pasteurização, ultrafiltração¹², microondas¹³, entre outros.

Outro fator que se deve levar em conta durante as etapas de processamento do suco (prensagem, clarificação e pasteurização) é que estes procedimentos podem modificar a composição de voláteis do suco de maçã e alterar o seu sabor característico. A pasteurização é a etapa que mais afeta a composição do suco, ocorrendo perdas significativas dos compostos voláteis¹⁴. O sucesso de um produto depende da sua aceitação pelo consumidor. No caso de alimentos, a aparência e principalmente o sabor são requisitos importantes para esta aceitação.

Não existem estudos a respeito das características de suco e néctar de maçã comercializado no Estado de São Paulo e a oferta deste produto está aumentando nos estabelecimentos comerciais, tornando importante a avaliação da sua qualidade nesta região, uma vez que as características deste suco podem variar de acordo com a variedade da fruta, local de cultivo, cuidados no processamento, entre outros. O objetivo deste estudo foi avaliar a qualidade físico-química e microbiológica do suco de maçã de diferentes marcas comercializadas no Estado de São Paulo.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostra.

Foram analisadas 66 amostras de suco e néctar de maçã processadas e acondicionadas em embalagens herméticas, estáveis a temperatura ambiente, de 12 marcas diferentes, sendo 17 amostras de suco de 3 marcas diferentes, 42 de néctar de 9 marcas e 7 de néctar de baixa caloria de uma marca, adquiridas em 19 cidades do Estado de São Paulo. De cada amostra foram adquiridas 3 unidades (mesmo lote). As amostras foram mantidas à temperatura ambiente, em suas embalagens originais cartonadas, até a realização das análises. As análises foram realizadas dentro do prazo de validade do produto.

Análises Físico-Químicas.

As análises físico-químicas foram realizadas de acordo com os métodos descritos no Livro de Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz¹⁵ e com o Ministério da Agricultura¹⁶: acidez volátil expressa em ácido acético; acidez total expressa

em ácido málico; ácido ascórbico; pH; sólidos solúveis em °Brix à 20°C; relação °Brix/acidez; glicídios redutores em glicose e glicídios não redutores em sacarose; açúcares totais naturais da maçã, sólidos em suspensão e corantes orgânicos artificiais.

Análise de rotulagem.

A análise de rotulagem foi realizada de acordo com a legislação em vigor quanto aos seguintes parâmetros: nome do produtor ou fabricante, endereço do estabelecimento de industrialização, número do registro do produto no Ministério da Agricultura e do Abastecimento; denominação do produto, marca comercial, ingredientes, expressão "Indústria Brasileira", conteúdo, identificação do lote, prazo de validade¹⁷ e advertência de contém fenilalanina para néctar de baixa caloria¹⁸.

Exames Microbiológicos.

Para o procedimento dos exames microbiológicos foram utilizadas três unidades da amostra, sendo que uma foi incubada a 35°C por 10 dias, uma a 55°C por 5 dias e a terceira foi estocada a temperatura ambiente. Nas amostras incubadas foi verificada a ocorrência de possíveis alterações, como estufamento e/ou modificações nas características sensoriais e variação no pH maior que 0,2. Nas 3 unidades de cada amostra foram realizadas contagem padrão em placas de bactérias aeróbias mesófilas e termófilas e enumeração de bolores e leveduras. Todas as análises microbiológicas foram realizadas de acordo com a American Public Health Association¹⁹.

Avaliação da Qualidade do Suco de Maçã.

Os resultados obtidos nas análises físico-químicas, de rotulagem e microbiológicas foram comparados com os padrões estabelecidos pela legislação brasileira^{9, 10, 11, 18, 20, 21} e com dados publicados em artigos científicos de outras regiões do Brasil^{5, 8, 22} e de outros países^{6, 7}.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da Tabela 1 mostram que existem diferenças entre as três bebidas quanto aos parâmetros analisados, isto já era esperado, uma vez que os três tipos de bebidas avaliadas são diferentes: o suco de fruta é o suco apresentado na sua concentração e composição natural, límpido ou turvo; o néctar de fruta é o produto não fermentado, não gaseificado, destinado ao consumo direto obtido pela dissolução de água potável, da parte comestível da fruta, adicionado de ácidos e açúcares¹⁰, e o néctar de baixa caloria é a bebida não-alcoólica e hipocalórica, devendo ter o conteúdo de açúcares adicionados normalmente na bebida convencional, inteiramente substituída por edulcorantes hipocalóricos e não-calóricos, naturais ou artificiais¹¹.

Existem determinações físico-químicas e microbiológicas avaliadas neste estudo para os quais a legislação não estabelece valores, porém é importante conhecer os seus

Tabela 1. Características físico-químicas do suco e néctar de maçãs comercializados em cidades do Estado de São Paulo.

Parâmetros	Legislação	Néctar (n=42)	Néctar light (n=7)	Suco (n=17)
		Média+DP (mín-máx)	Média+DP (mín-máx)	Média+DP (mín.-máx)
Acidez volátil total, em ácido acético (g/100g)	máx. 0,04 ^a	0,008 + 0,009 (0,002-0,06)	0,007 + 0,003 (0,001-0,01)	0,007 + 0,010 (0,000-0,04)
Acidez total, em ácido málico (g/100g),	min. 0,15 ^a	0,28 + 0,03 (0,23-0,34)	0,25 + 0,02 (0,23-0,30)	0,28 + 0,03 (0,20-0,33)
Ácido ascórbico (mg/100g)		24,0 + 14,3 (3,2-64,4)	24,5 + 9,6 (16,6-38,8)	49,9 + 11,1 (26,7-69,7)
pH		3,2 + 0,12 (3,0-3,5)	3,4 + 0,07 (3,3-3,5)	3,7 + 0,1 (3,4-3,9)
Sólidos solúveis em °Brix (°Brix)	min.10,5 ^a ; 10 ^c	12,6 + 0,7 (11,3-13,9)	5,0 + 0,1 (5,0-5,3)	11,7 + 0,5 (11,3-13,4)
Relação Brix/acidez		45,0 + 5,1 (35,4-55,6)	19,9 + 1,9 (17,0-22,7)	42,4 + 6,8 (35,9-67,2)
Glicídios redutores em glicose (g/100g)		9,0 + 1,8 (4,6-11,5)	3,6 + 0,1 (3,4-3,7)	8,2 + 0,7 (7,3-9,5)
Glicídios não redutores em sacarose (g/100g)		2,5 + 1,3 (0,6-6,4)	0,3 + 0,2 (0,06-0,5)	1,7 + 0,7 (0,7-3,3)
Açúcares totais naturais (g/100g)	máx 13,5 ^a	11,5 + 0,7 (10,0-12,6)	3,9 + 0,2 (3,7-4,1)	9,9 + 0,8 (9,3-12,7)
Sólidos em suspensão (mL/100mL)	máx. 3 ^b	1,73 + 1,68(0,01-6,00)	4,15 + 2,24 (6,60-2,08)	0,59 + 0,53(1,70-0,31)

a) valor estabelecido para o suco de maçã, Instrução Normativa nº 1⁹ e b) Portaria nº 746²¹ c) valor estabelecido para néctar de maçã, Portaria nº 371¹⁰; demais parâmetros não tem valores estabelecidos pela legislação em vigor.

conteúdos nas amostras. A Tabela 1 mostra os resultados das análises das amostras obtidas e indica os valores dos parâmetros físico-químicos estabelecidos nas legislações de suco e néctares de maçã. Não houve nenhuma amostra de suco⁹, néctar convencional¹⁰ e de baixa caloria¹¹ em desacordo com a legislação em vigor no Brasil, quanto aos parâmetros físico-químicos avaliados (Tabela 1). A variação apresentada (desvio-padrão) pode ser devido à utilização de variedades diferentes de maçãs no processamento industrial e/ou diferente local de plantio da fruta e/ou diferente estágio de maturação e/ou tamanho da fruta^{5, 6, 7, 8}.

A legislação brasileira estabelece para o suco de maçã o valor máximo permitido de 0,04g/100g para a acidez volátil expressa em ácido acético⁹, a Tabela 1 mostra que para o suco de maçã não houve resultados deste parâmetro acima do permitido, e mesmo os néctares convencional e de baixa caloria, cuja legislação não estabelece valor máximo permitido, não apresentaram resultados acima de 0,04g/100g.

A acidez total influi no sabor do suco sendo que, acidez titulável de 0,35% é a preferida pelos consumidores²³. O nosso estudo apresentou para o suco de maçã acidez total de 0,28+0,03 (0,20-0,33) g/100g em ácido málico, este valor é menor que o encontrado por Eisele e Drake⁶, 0,87+0,28 (0,23-1,82) g/100g, que analisaram suco de 175 variedades diferentes de maçã provenientes de 13 países (9 da Europa, 2 da América do Norte, 1 África e 1 da Oceania). Porém quando os valores deste estudo

são comparados com valores de acidez de maçãs Fuji e Gala cultivadas no Brasil, os valores são semelhantes, 0,32 g/100mL^{5, 22}. O resultados da acidez total do suco de maçã estão de acordo com o estabelecido na legislação em vigor e os néctares apesar de poderem ser adicionados de água e ácidos¹⁰ apresentaram resultados semelhantes ao do suco.

O fruto da maçã apresenta teor de ácido ascórbico natural de 10 – 30mg/100g²⁴, sendo que a quantidade deste nutriente, depende de vários fatores como a posição do fruto na árvore, o tamanho da fruta, a cor da casca e o estágio da maturidade²⁵. Apesar de ser um nutriente naturalmente presente na maçã o ácido ascórbico também é adicionado ao suco de maçã, pois é um efetivo e seguro inibidor do escurecimento²⁶ e não altera a capacidade antioxidante, a concentração total de compostos fenólicos e antocianinas²⁷ naturalmente presentes na maçã.

A declaração no rótulo da quantidade de ácido ascórbico presente no néctar foi feita por 5 marcas (19-24 mg/200mL), 2 marcas não declararam a presença do nutriente e 2 declararam zero; a marca do néctar de baixa caloria declarou 19 mg/200 mL; no caso do suco 2 marcas declararam valores de 12-14mg/200mL e uma marca não declarou a presença desta vitamina. Podemos observar que a quantidade declarada nos rótulos é muito menor que a encontrada nas análises (Tabela 1), apesar do ácido ascórbico possuir uma grande variedade de funções nos processos vitais do organismo humano, alguns artigos publicados descrevem efeitos adversos pela alta ingestão da

vitamina C, e o efeito mais freqüentemente citado é a formação de cálculo renal (oxalato de cálcio)²⁴. Sendo, portanto importante controlar a quantidade de ácido ascórbico adicionado ao suco de maçã e indicar na rotulagem a quantidade correta desta vitamina.

No nosso estudo o valor médio encontrado para os sólidos solúveis foi de 11,7+0,5 (11,3-13,4) °Brix para o suco, valor dentro do estabelecido pela legislação em vigor⁹ comprovando que a fruta utilizada para a produção do suco estava no grau de maturação adequado²². No caso do néctar convencional, que pode ser adicionar açúcar o que aumenta o °Brix, o valor médio encontrado foi de 12,6+0,7 (11,3-13,9) °Brix, e também estava de acordo com o estabelecido pela legislação em vigor para néctar, 10 °Brix¹⁰.

A maçã é uma fruta rica em frutose e quanto maior o teor de açúcar, melhor para o processo de fermentação ou para a obtenção do suco concentrado clarificado⁸. No nosso estudo encontramos no suco de maçã teores de açúcar redutor em glicose de 8,2+0,7g/100g e açúcar não redutor em sacarose de 1,7+0,7 g/100g, apesar deste parâmetro variar de acordo com vários fatores como região de plantio e variedade do fruto, estes resultados estão entre a média dos publicados na literatura. Karadeniz e Eksi⁷ estudaram a composição dos açúcares do suco de maçãs cultivadas em diferentes regiões da Turquia e encontraram valores médios de 1,88+0,63 para glicose, 8,09+0,73 para frutose e 2,96+0,90 g/100g para sacarose. Eisele e Drake⁶ analisaram suco de 175 variedades diferentes de maçã provenientes de 13 países (9 da Europa, 2 da América do Norte, 1 da África e 1 da Oceania), encontraram resultados de 2,01+0,53 para glicose, 5,69+0,84 para frutose e 2,16+0,73 g/100g para sacarose.

A Portaria 746 de 24 de outubro de 1977 do Ministério de Estado da Agricultura²⁰ (substituída pela Resolução Normativa n.º 1⁹) estabelecia para o suco de maçã o limite máximo de 3,0% (v/v) para os sólidos em suspensão. Neste estudo o valor encontrado foi menor que este (Tabela 1), e apesar deste parâmetro não ser mais contemplado na legislação em vigor é um importante indicador de falhas durante o procedimento de filtragem e/ou centrifugação do suco.

Não encontramos corantes orgânicos artificiais em nenhuma das amostras analisadas, sendo este tipo de aditivo proibido de ser adicionado ao suco ou néctar convencional ou de baixa caloria.

A informação nos rótulos dos produtos alimentícios embalados na ausência do cliente, pronto para o consumo serve para que o consumidor tenha informações a respeito do produto que está adquirindo, com relação à denominação do produto, marca comercial, ingredientes, conteúdo, prazo de validade, advertências de alimentos para fins especiais, entre outros. Isto auxilia na escolha do mais adequado, uma vez que a embalagem em muitos casos esconde totalmente o produto e, além disso, as informações também servem para as ações da Vigilância Sanitária no caso de ocorrer algum problema com o produto (endereço do estabelecimento de industrialização, nome do produtor ou fabricante, número do registro do produto no

Ministério da Agricultura e do Abastecimento; identificação do lote, entre outros). Todas as amostras analisadas estavam de acordo com os itens avaliados para a rotulagem do produto.

A legislação brasileira²¹ estabelece que para a bebida de fruta processada e acondicionada em embalagem hermética estável a temperatura ambiente, após incubação a 35°C durante 10 dias e 55°C durante 5 dias não devem existir sinais de alteração das embalagens, nem quaisquer modificações físicas, químicas ou organolépticas do produto que evidenciem deterioração, e não podem revelar variação de pH maior que 0,2. No nosso estudo todas as amostras estavam de acordo com a legislação não apresentando nenhuma destas alterações após a incubação nas duas temperaturas.

Apesar da legislação em vigor não estabelecer padrões para bolores e leveduras, as frutas apresentam grande quantidade de ácidos e açúcares o que permitem o desenvolvimento destes microrganismos que podem causar decomposição do alimento. As alterações que ocorrem em sucos de frutas frescas armazenadas à temperatura ambiente são decorrentes da fermentação alcoólica, por leveduras formadoras de película ou por bolores que crescem na superfície, ou da oxidação do álcool a ácido acético quando bactérias acéticas estão presentes. Além destas alterações, muitos fungos podem produzir micotoxinas que são tóxicas para o ser humano e animais, e alguns bolores e leveduras são responsáveis por infecções em homens e animais^{19,28}. Neste estudo as amostras não revelaram o desenvolvimento de bolores e leveduras.

A legislação em vigor também não contempla bactérias aeróbias mesófilas e termófilas, porém, a contagem em placa das bactérias aeróbias mesófilas é comumente empregada para indicar a qualidade sanitária dos alimentos, e a contagem de bactérias termófilas avalia o grau de deterioração de alimentos submetidos a tratamento térmico²⁸. Os resultados das análises microbiológicas não revelaram desenvolvimento de microrganismos indicadores de higiene e/ou processamento inadequado, mostrando que não ocorreram falhas durante o processamento e/ou estocagem e utilização de matéria-prima com contaminação excessiva.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

1. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Política Agrícola. Brasil: Maçã, produção área colhida e rendimento médio, 1990 a 2004. 2005. [acessado 21 dez 2005]. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/pls/portal/docs/PAGE/MAPA/ESATISTICAS/AGRICULTURA_EM_NUMEROS_2004/03.01.09.XLS.
2. Barreiros RC, Bossolan G, Trindade CEP. Frutose em humanos: efeitos metabólicos, utilização clínica e erros inatos associados. *Rev Nutr* 2005;18(3):377-89.

3. Marchand L, Murphy SP, Hankin JH, Wilkens LR, Kolonel LN. Intakes of flavonoids and lung cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2000;92:154-60.
4. Eberhardt MV, Lee CY, Liu RH. Antioxidant activity of fresh apples. *Nature* 2000;405:903-4.
5. Czelusniak C, Oliveira MCS, Nogueira A, Silva NCC, Wosiacki G. Qualidade de Maças Comerciais Produzidas no Brasil: Aspectos Físico-Químicos. *Braz. J. Food Technol* 2003;6(1):25-31.
6. Eisele TA, Drake SR. The partial compositional characteristics of apple juice from 175 apple varieties. *J Food Compost Anal* 2005;18:213-21.
7. Karadeniz F, Eksi A. Sugar composition of apple juices. *Eur Food Res Technol* 2002;215(20145-8).
8. Wosiacki G, Pholman BC, Nogueira A. Características de qualidade de cultivares de maçã: avaliação físico-química e sensorial de quinze cultivares. *Ciênc Tecnol Aliment* 2004;24(3):347-52.
9. Instrução Normativa n. 1, de 7 jan 2000, do Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Aprova os Regulamentos Técnicos para fixação dos padrões de identidade e qualidade para polpas e sucos de frutas. *Diário Oficial [da] Republica Federativa do Brasil, Brasília, DF, 10 jan. 2000. Seção 1, p. 54-8.*
10. Portaria n. 371, de 9 de setembro de 1974 do Ministério de Estado da Agricultura. Aprova a complementação dos padrões de identidade e qualidade para as bebidas, vinagres e demais produtos referidos. *Diário Oficial [da] Republica Federativa do Brasil, Brasília, DF, 19 set. 1974. Seção 1, p. 3-27.*
11. Instrução Normativa SDA n. 30, de 27 set 1999 do Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Aprova o Regulamento Técnico para Fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade para a bebida dietética e a de baixa caloria. [acessado 26 ago 2005]. Disponível em: [www.dfasp.gov.br/siv/legislação/19990927IN030.doc].
12. Bahçeci KS, Gökmen V, Serpen A, Acar J. The effects of different technologies on *Alicyclobacillus acidoterrestis* during apple juice production. *Eur Food Res Technol* 2003;217(3):249-52.
13. Cañumir JA, Celis JE, Bruijij J, Vidal L. Pasteurization of apple juice by using microwaves. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* 2002;35(5):389-92.
14. Janzantti NS, Franco MRB, Wosiacki G. Efeito do Processamento na composição de voláteis de suco clarificado de maçã Fuji. *Ciênc Tecnol Aliment* 2003;23(3):523-8.
15. Instituto Adolfo Lutz. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. São Paulo:IMESP 1985.
16. Portaria n. 76, de 27 de novembro de 1986, do Ministério da Agricultura. Aprova os Métodos Analíticos para Bebidas e Vinagres. *Diário Oficial [da] Republica Federativa do Brasil, Brasília, DF, 03 dez. 1986, Seção 1, p. 18152.*
17. Brasil. Ministério de Estado da Agricultura e do Abastecimento. Decreto nº 2314, de 4 de Setembro de 1997. Regulamenta a Lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. [acesso em: 15 ago 2005]. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/consultasilegis/Imagem?codArquivo=4972>.
18. Decreto n. 3510, de 16 jun 2000 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Altera dispositivos do Regulamento aprovado pelo Decreto nº. 2314, de 4 de setembro de 1997, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. [acessado 26 ago 2005]. Disponível em: <http://oc4j/agricultura.gov.br/agrolegis/do/consultaLei?op=viewTextual&codigo=1012>.
19. Vanderzant C, Splittstoefser DF. *Compendium of Methods for the microbiological examination of foods*, 3rd Washington DC:APHA 1992.
20. Portaria n. 746 de 24 de outubro de 1977. Aprova a as complementações de padrões de identidade e qualidade para sucos de cajá, maçã, mangabara. *Diário Oficial [da] Republica Federativa do Brasil, Brasília, DF, 17 nov. 1977, Seção 1, p. 1555-74.*
21. Resolução RDC n. 12, de 2 de janeiro de 2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Aprova o Regulamento Técnico Sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. *Diário Oficial [da] Republica Federativa do Brasil, Brasília, DF, 10 jan. 2001, Seção 1, p. 45.*
22. Wosiacki G, Nogueira A. Apple varieties growing in subtropical areas. The situation in Paraná – Brazil. *Fruit Proc* 2001;5:177-82.
23. Jorge ZLC, Treptow RO, Antunes PL. Avaliação físico-química e sensorial de suco de maçãs cultivares Fuji, Granny smith e seus blends. *Rev Bras Agrociênc* 1998;4(1):15-9.
24. Moser U, Bendich A. Vitamin C. In: Machilin, L. J. (Ed.) *Handbook of vitamins*. 2nd ed. New York: Marcel Dekker; 1990. p. 195-232.
25. Planchon V, Lauter M, Dupont P, Lognay G. Ascorbic acid level of belgian apple genetic resources. *Sci Hortic* 2004 100:51-61.
26. Özoglu H, Bayindirli A. Inhibition of enzymic browning in cloudy apple juice with selected antibrowning agents. *Food Control* 2002;13:213-21.
27. Rababah TM, Ereifej KI, Howard L. Effect of ascorbic acid and dehydration on concentrations of total phenolics, antioxidant capacity, anthocyanins, and color in fruit. *J. Agric Food Chem* 2005;53:4444-7.
28. Franco BGM, Landgraf M. *Microbiologia dos Alimentos*. São Paulo: Atheneu; 1996.

Desoxinivalenol (DON) em trigo e farinha de trigo comercializados na cidade de São Paulo

Deoxynivalenol (DON) in wheat: occurrence in samples commercialized in the São Paulo city

RIALA6/1058

Leda C.A.LAMARDO^{1*}, Sandra A.NAVAS¹, Myrna SABINO¹

* Endereço para correspondência: ¹Instituto Adolfo Lutz, Divisão de Bromatologia e Química, Seção de Química Biológica, Av.Dr.Arnaldo 355, CEP 01246-902, São Paulo/SP, Brasil. e-mail:llamardo@ial.sp.gov.br
 Recebido: 26/04/2006 – Aceito para publicação: 20/07/2006

RESUMO

Vinte e oito amostras de farinha de trigo e 14 amostras de trigo em grão foram adquiridos na cidade de São Paulo e analisados para determinação de desoxinivalenol (DON). As amostras foram extraídas com acetonitrila-água (84+16) seguidas de limpeza dos extratos com colunas MycoSep. A separação e a quantificação foram pela técnica da Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e a toxina visualizada com solução de $AlCl_3$. A eficiência das colunas MycoSep 225 e 227 foi avaliada com amostras de farinha de trigo e trigo em grão, contaminadas com DON em dois níveis, 80,0 e 100,0 μ g/kg. As recuperações médias das colunas 225 e 227 foram, respectivamente, 72% e 107% para farinha de trigo e 90% e 125% para trigo em grão. Os desvios padrão relativos foram 11% e 18% para farinha de trigo e 8% e 20% para trigo em grão, respectivamente. DON foi detectado em 19 (45%) das 42 amostras analisadas em níveis que variaram de 82-1500 μ g/kg. Algumas amostras (8) foram confirmadas por CLAE-UV.

Palavras- Chave. desoxinivalenol, DON, trigo, micotoxinas.

ABSTRACT

Twenty-eight samples of wheat flour and 14 samples of wheat were purchased in the city of São Paulo and these products were analyzed for deoxynivalenol (DON). Samples were extracted with acetonitrile-water (84+16) followed by a cleanup with MycoSep column. The extract purification was carried out on TLC and the toxin was determined with $AlCl_3$ solution. The efficiency of MycoSep columns 225 and 227 was evaluated with samples of wheat and wheat flour spiked with DON at two levels, 80.0 and 100.0 μ g/kg. The recovery averages on columns 225 and 227 were, respectively, 72% and 107% for wheat flour and 90% and 125% for wheat grain, respectively. The relative standard deviations were 11% and 18% for wheat flour and 8% and 20% for wheat grain, respectively. DON was detected in 19 (45%) of 42 analysed samples at levels ranged from 82 to 1500 μ g/kg. Eight samples were confirmed by means of HPLC-UV.

Key Words. deoxynivalenol, DON, wheat, mycotoxins.

INTRODUÇÃO

Micotoxinas são compostos químicos resultantes do metabolismo secundário de fungos filamentosos. Quando contaminam alimentos e rações animais produzem efeitos agudos (micotoxicoses) ou crônicos, e algumas das toxinas são carcinogênicas.

Os principais fungos produtores de micotoxinas pertencem aos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*. Os tricotecenos são micotoxinas produzidas por diferentes gêneros de fungos tais como *Fusarium*, *Stachybotrys*, *Myrothecium*, *Trichotecium*, entre outros, sendo que estes fungos são também patógenos de plantas produtoras de grãos¹.

Aproximadamente 180 diferentes compostos da família de tricotecenos já foram isolados, mas apenas alguns deles ocorrem naturalmente, como o desoxinivalenol (DON), o nivalenol, a toxina T_2 , o diacetoxiscirpenol e a toxina $HT_2^{2,3}$. A grande variabilidade nas suas propriedades físico-químicas deste grupo de compostos causa dificuldades na sua detecção^{4,5}.

Desoxinivalenol (DON) é um tricoteceno do grupo B, e um epoxisquisiterpenóide que ocorre predominantemente em grãos como trigo, milho, aveia e cevada e com menos frequência em arroz, sorgo e triticale. A ocorrência de DON é associada principalmente com *Fusarium graminearum* (*Gibberella zeae*) e *F. culmorum*. DON tem sido implicado na incidência de micotoxicoses humana e animais de criação^{6,7,8,9,10,11,12}. Ele foi

primeiramente isolado no Japão e Estados Unidos, de cevada e milho infectados no campo, com *F.graminearum*. O nome alternativo vomitoxina refere-se à sua propriedade de causar vômitos, recusa de alimentos, associado a perda de peso, e que são os efeitos adicionais produzidos por DON em animais^{6,13}. É o tricoteceno que ocorre com maior frequência e mais estudado por este motivo¹⁴.

Os efeitos agudos de DON são: náusea, vômito, diarreia, dor abdominal, dor de cabeça, tontura e febre. Podem se desenvolver no prazo de 30 minutos da exposição e são de difícil distinção das condições gastrointestinais atribuídas a microrganismos como toxinas de *Bacillus cereus*¹⁵

Um controle sistemático e contínuo dos tricotecenos no Brasil não ocorre. Os dados existentes são poucos. A literatura brasileira relata alguns trabalhos sobre tricotecenos^{16,17,18,19,20,21,22}. A proposta deste trabalho foi avaliar a incidência de DON em trigo e farinha de trigo, comercializadas na cidade de São Paulo. A metodologia utilizada foi otimizada e é simples, precisa, sensível que não necessita de equipamentos sofisticados ou de treinamentos especiais.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

Amostras de trigo em grão (14) e farinha de trigo (28), perfazendo um total de 42, foram adquiridas no comércio da cidade de São Paulo.

As amostras em grão foram trituradas em moinho – liquidificador, Vita Mix Corp (Cleveland), e passadas em peneiras de 20 mesh, 2 vezes, acondicionadas em frascos de vidro e armazenadas a 5° C até o momento da análise.

Padrão

A solução padrão de desoxinivalenol (DON) (Sigma Chemical Company, St Louis, MO, USA) de 1 mg foi preparada, dissolvendo em 25 mL de acetato de etila, grau CLAE, e obtendo-se a concentração de 39 ¼g/mL. Esta concentração foi determinada espectrofotometricamente^{23,24}. A solução foi acondicionada em frasco ambar vedado e armazenada a -18°C.

Métodos

Extração e limpeza do extrato

O procedimento da extração e limpeza do extrato, foi feito de acordo com o indicado pelo fornecedor das colunas MycoSep (Romer Labs.-USA).

Vinte e cinco gramas de amostra foram homogeneizadas com 100 mL de uma solução de CH₃CN-H₂O (84:16) por 5 minutos em liquidificador. A mistura foi filtrada em papel de filtro qualitativo após decantação.

Uma alíquota de 8 mL foi colhida e transferida para um tubo de cultura de vidro tal que, 2/3 do tubo estivesse preenchido com esta solução (Figura 1). A coluna MycoSep (225 para trigo e 227 para farinha de trigo) foi inserida com um êmbolo no

tubo e empurrada através do tubo, forçando o extrato a passar pelo conteúdo da coluna (recheio). Uma alíquota de 4 mL foi coletada no reservatório acima da coluna e transferida para um frasco de vidro ambar onde o solvente foi evaporado sob corrente de N₂.

Separação e quantificação de DON

Os resíduos obtidos na extração foram dissolvidos em 150 µL de uma solução de tolueno-acetonitrila (97:3) e submetidos ao ultra-som por 30 segundos. Alíquotas deste extrato e do padrão foram aplicadas na cromatoplaça de vidro (CCF-C25 sílica gel sem indicador de fluorescência, artigo 105721, Merck, Alemanha) até um máximo de 75 µL para a amostra e padrão as aplicações correspondendo a 25, 30, 40, 50, 100, 200 e 250 ng de DON/mancha na placa. O cromatograma foi desenvolvido em tolueno-acetona (1:1) e a placa depois de seca foi pulverizada com solução de AlCl₃ (15% em metanol) e aquecida em estufa a 110°C durante 7 minutos e exposta sob luz UV (366 nm). A fluorescência azul da amostra observada foi comparada com as do padrões²⁴. Para confirmar a metodologia, alguns resultados foram comparados pela CLAE-UV¹⁰

Controle Analítico

Para garantir a confiabilidade dos resultados obtidos neste trabalho, alguns parâmetros foram avaliados: recuperação, repetitividade e limite de quantificação, com amostras de trigo e farinha de trigo fortificadas com 80,0 e 100,0 ¼g/kg.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da recuperação de DON nas amostras de trigo e farinha de trigo artificialmente contaminadas, podem ser observados na Tabela 1. Os resultados não foram completamente satisfatórios utilizando coluna MycoSep 225 para farinha de trigo.

Observa-se que a porcentagem média de recuperação na amostra contaminada com 80 µg/kg por CCD, foi de 72,5%

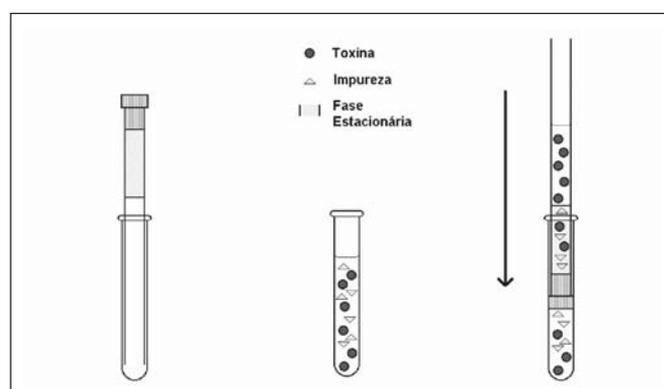


Figura 1. Coluna MycoSep

Tabela 1. Resultados de recuperação para DON nas amostras de trigo e farinha de trigo artificialmente contaminadas.

Amostra	Add µg/kg	% média recuperação	Coluna/Separação	DP µg/kg	DPR%
Farinha	80,00	72	MycoSep225/CCD	32	54
Farinha	100,00	87	MycoSep225/CCD	12	14
Farinha	80,00	97	MycoSep227/CCD	8	11
Farinha	100,00	107	MycoSep227/CCD	19	18
Trigo	100,00	90	MycoSep225/CCD	7	8
Trigo	100,00	125	MycoSep227/CCD	25	20

Média de cinco determinações.

Add: adicionado.

DP: desvio padrão.

DPR: desvio padrão relativo.

DON = desoxinivalenol.

Tabela 2. Ocorrência de DON nas amostras de trigo analisadas*

Produto	Incidência ^o positivas/total	Varição ¼g/kg	Média positiva ¼g/kg
Farinha	14/28	82,0-600,0	296,3
Trigo	05/14	166,0-1500,0	753,2

* Método utilizado: coluna MycoSep 225/227 - CCD

valor que atende a critérios internacionais, adotados pela CE e Horwitz et al.^{25,26}, mas o desvio padrão relativo (DPR) foi alto, isto é 54%. Este valor demonstrou que houve uma dispersão de resultados acima do aceitável entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, em condições definidas. Na amostra fortificada com 100,0 µg/kg e determinada em CCD, os resultados obtidos na porcentagem média de recuperação na farinha de trigo com a coluna MycoSep 225 foram satisfatórios, 87% e DPR de 13%. Para as amostras de farinha de trigo com as mesmas concentrações de fortificação (80 e 100 ¼g/kg), também utilizou-se a coluna MycoSep 227. Optou-se por sua utilização uma vez que a farinha de trigo é uma matriz mais complexa, por ser processada e a coluna escolhida tem o dobro do recheio da MycoSep 225. Foi observado durante a parte experimental que os extratos ficaram mais límpidos com a coluna MycoSep 227 que com a coluna 225.

O Limite de Quantificação (LQ) para DON em farinha de trigo foi 80 µg/kg e para o trigo igual a 100 µg/kg e optou-se trabalhar com LQ

Estas colunas são uma mistura de carvão ativo, celite e resina trocadora de íons²⁷ e tem sido utilizadas em vários estudos para determinação de tricotecenos em trigo^{28,29,30}. De acordo com os resultados da Tabela 1, os métodos foram considerados, adequados, onde o desvio padrão relativo (DPR) foi de 7,85% a 20,0% exceto na farinha de trigo com MycoSep 225. Neste caso a precisão do método foi comprometida pois segundo Horwitz²⁶ o coeficiente de variação (desvio padrão relativo) em análises que se quantifica na ordem de ng/g (ppb) o CV deve ser de 20,0-25,0% e o nosso resultado atingiu 54,8%.

Ocorrência de DON em amostras de trigo

Na Tabela 2 encontram-se os resultados obtidos das amostras analisadas e alguns deles foram confirmados por CLAE, Tabela 3. Observa-se que os resultados variaram de 82,0 a 1500,0 µg/kg.

Estes resultados confirmam os resultados obtidos por Furlong³¹, quando avaliou trigo nacional e argentino e determinou DON, T2, DAS, T2 tetraol. A autora detectou 400 µg/kg de DON em amostra de trigo nacional proveniente de silos e armazéns do Rio Grande, RS. Como foi dito anteriormente, o estudo da incidência de tricotecenos em alimentos nacionais são muito restritos, Sabino¹⁶, analisando 70 amostras de trigo e seus derivados (farinha, farelo) adquiridas nos centros comerciais da cidade de São Paulo ou enviadas para o Instituto Adolfo Lutz suspeitas de intoxicação animal detectou

Tabela 3. Determinação de DON por CCD confirmada por CLAE.¹⁰

Amostra (Farinha trigo)	Concentração (µg/kg)	
	CCD	CLAE
A	ND	ND
B	ND	ND
C	ND	ND
D	600,0	699,0
E	500,0	572,0
F	125,0	235,0
G	ND	ND
H	ND	ND

ND= Não detectado, DON= desoxinivalenol.

CCD= cromatografia em camada delgada.

CLAE= cromatografia líquida de alta eficiência.

DON em apenas em 2 amostras: farinha de trigo e ração animal, com 183,0 $\frac{1}{4}$ g/kg. Furlong¹⁸, estudando 2 cultivares de trigo, IAC 24 e BH 1146, procedentes de diferentes regiões do estado de São Paulo, detectou DON em 3 amostras nos seguintes teores: 580,0 $\frac{1}{4}$ g/kg, 590,0 $\frac{1}{4}$ g/kg e 560,0 $\frac{1}{4}$ g/kg no cultivar IAC 24, enquanto que no BH 1146 detectou uma amostra com 470,0 $\frac{1}{4}$ g/kg. Furlong^{31,32}, utilizou CG enquanto que Sabino¹⁶ CCD. O DON tem sido o tricoteceno mais encontrado nos Estados Unidos seguido pelo NIV, as toxinas T2 e HT2 e o DAS. O milho, cevadas e trigo utilizados tanto para o consumo humano como animal estão, em alguns regiões do mundo, frequentemente contaminados com tricotecenos^{10,12,19}. Níveis atingindo até 40 mg/kg foram observados no trigo produzido na Alemanha, Polônia, Japão, Nova Zelândia, Canadá e na Argentina¹², teores que até o momento não foram relatados no Brasil.

CONCLUSÕES

As colunas MycoSep 225 e 227 demonstraram eficiência na etapa de extração e limpeza de amostras de trigo e farinha de trigo na pesquisa de DON.

CCD, que não requer equipamentos mais sofisticados, mostrou que atende os limites máximos recomendados pelos países preocupados com esta micotoxina, de 1 ppm a 2 ppm;

Das 42 amostras de trigo e farinha de trigo analisadas no presente trabalho, 19 estavam contaminadas (45%) com teores que variaram de 82 a 1500 $\frac{1}{4}$ g/kg.

REFERÊNCIAS

1. Miller JD. Fungi and mycotoxins in grain: implications for stored product research. *J Stored Prod Res* 1995; 31: 1-16.
2. Kotal F. Determination of trichothecenes in cereals. *J Chromatogr A* 1999;830:219-25
3. Frisvad JC, Thrane U. Mycotoxin production by food-borne fungi. In: Samson, RA., Hoekstra ES, Frisvad JC, Filtenborg O. editors. - Introduction to food-borne fungus, 4^a ed., Baam, Netherlands: CBS, 1995, p.251-60.
4. Ueno Y. Trichothecenes as Environmental Toxicants. *Reviews in Environmental Toxicology* 2, Amsterdam, 1986, p.303-41.
5. Snyder AP. Qualitative, quantitative and technological aspects of the trichothecene mycotoxins. *J Food Prot* 1986;49:544-69.
6. Scott PM., Lau Pui-Yan, Kanhere S.S. Gas chromatography with electron capture and mass spectrometric detection of deoxynivalenol in wheat and other grains. *J Assoc Off Anal Chem* 1981;64:1364-71.
7. Kamimura, H, Nishijima M, Yassuda K, Saito K, Ibe A, Nagayama HU, Naoi Y. Simultaneous detection of several Fusarium Mycotoxins in cereals grains and foodstuffs. *J Assoc Off Anal Chem* 1981; 64:1067-81.
8. Malone BR, Humphrey CW, Romer TR, Richard J. One step solid-phase extraction cleanup and fluorometric analysis of deoxynivalenol in grains. *JAOAC Intl* 1988; 81:448-52.
9. Trucksess MW, Thomas F, Young K, Stack ME, Fulgueras WJ, Page SW. Survey of deoxynivalenol in US 1993 and barley crops by enzyme-linked immunosorbent assay. *JAOAC Intl* 1995; 79:631-6
10. Trucksess MW, Ready Du WE, Pender MK, Ligmond CA, Wood GE, Page SW Determination and survey of deoxynivalenol in white flour, whole wheat flour and bran. *JAOAC Intl* 1996;79: 884-7
11. Patel S, Hazel CM, Winterton AG, Mortby E. Survey of ethnic foods for mycotoxins. *Food Addit Contam* 1996;13:833-41.
12. Placinta CM, Mello JPF, Macdonald AMC. A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. *Animal Feed and Science Technol* 1999;78:21-37.
13. Lambert L, Hines FA, Eppley RM. Lack of initiation and promotion potencial of deoxynivalenol for skin tumorigenesis in senear mice. *Food Chem Toxicol* 1995; 33:217-22.
14. WHO - World Health Organization. Environmental Health Criteria 105 . Selected Mycotoxins: Ochratoxins, Trichothecenes, Ergot. IPCS (International Programme On Chemical Safety), Geneva. World Health Organization. 1990, cap.2, p.71-164.
15. WHO - World Health International Organization. Safety evaluation of certain mycotoxins in food. FAO Food and Nutrition Paper. Prepared by the Fifty Sixth Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). Geneva World Health Organization, 2001, 701 p.
16. Sabino M, Ichikawa AH, Inomata EI, Lamardo LC. Determinação de deoxinivalenol em trigo e milho em grão por cromatografia em camada delgada. *Rev Inst Adolfo Lutz* 1989; 49:155-9.
17. Furlong EB, Valente Soares LM, Lasca CC, Kohara EY. Mycotoxins and fungus in wheat stored in elevators in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *Food Addit Contam* 1995a;12:683-8.
18. Furlong EB, Valente Soares LM, Lasca CC, Kohara EY. Mycotoxins and fungi in wheat harvest during 1990 in test pilots in the state of São Paulo, Brazil. *Mycopathology* 1995b; 131:185-90.
19. Oliveira MS, Prado G, Abrantes FM, Santos LG, Veloso T. Incidência de aflatoxinas, desoxinivalenol e zearalenona em produtos comercializados em cidades do estado de Minas Gerais no período de 1998- 2000. *Rev Inst Adolfo Lutz* 2002;61:1-6.
20. Prado G, Oliveira MS, Ferreira SO, Corrêa TBS, Affonso BRR. Ocorrência natural de desoxinivalenol e toxina T2 em milho pós colheita. *Ciênc Tecnol Alim* 1997;17:259-62.
21. Oliveira, AQ; Soares, LMV; Sawazaki, E. Survey of deoxynivalenol, diacetoxyscirpenol and T2 toxin in popcorn hybrids planted in the State of São Paulo and popcorn commercialized in the city of Campinas, SP. *Ciênc Tecnol Alim* 2001;21:330-3.
22. Milanez TV. Tricotecenos em milho: otimização e avaliação de método analítico utilizando cromatografia a gás associada à espectrometria de massas e levantamento da incidência em milho e em produtos de milho no Estado de São Paulo. [Tese de Doutorado]. Campinas, São Paulo: Universidade Estadual de Campinas, 2003. 182pp.
23. Bennet GA, Shotwell OL. Criteria for determining purity of *Fusarium* mycotoxins. *J Assoc Off Anal Chem* 1990;73: 270-5.
24. Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of the AOAC 15th edition. Washington DC, 1990
25. CE- Comission Directive 98/53/EC - July 16th 1998-Laying down the sampling methods and the methods of analysis for the official control of the levels for certain contaminants in foodstuffs Official Journal of the European Communities-Annex II.
26. Horwitz W, Kamps LR, Boyder KW. Quality assurance in the analysis of foods for trace constituents. *J Assoc Off Anal Chem* 1980;63(6):1344-1354.
27. Langseth W, Rundberget T. Instrumental methods for determination of non macrocyclic trichothecenes in cereals foodstuffs and culture (review). *J Chromatogr A* 1998; 815:103-21.
28. Krska, R. Performance of modern samples preparation techniques in the analysis of *Fusarium* mycotoxins in cereals. *J Chromatogr A* 1998;815:49-57.
29. Radova Z et al. Comparison of two clean-up principles for determination of trichothecenes in grain extract. *J Chromatogr A* 1998; 829: 259-67.
30. Eskola M, Papprikka P, Rizzo A. Trichothecenes, ochratoxin A, and zearalenone contamination and *Fusarium* infection in finnish cereal samples in food. *Food Addit Contam* 2001;18: 707-18.
31. Furlong E.B. Tricotecenos em trigo: um estudo de metodologia analítica, incidência, contaminação simultânea por outras micotoxinas e de alguns fatores que influem na produção no campo. [Tese de Doutorado] Campinas, São Paulo, Universidade Estadual de Campinas, 1992, 120pp.
32. Furlong EB, Valente Soares ,LM. Gas Chromatographic method for quantification and confirmation of trichothecenes in wheat. *JAOAC Intl* 1995; 78:86-390.

Resistência térmica de *Salmonella* Enteritidis, *S. Panama* e *S. Infantis* em fórmula láctea infantil reconstituída

Salmonella Enteritidis, *S. Panama* and *S. Infantis* thermal resistance in reconstituted infant milk formula

RIALA6/1059

Ruth Estela G. ROWLANDS^{1*}, Alexandra André dos S. PAPASIDERO¹, Ana Maria R. de PAULA¹, Cristiane B. CANO², Dilma S. GELLI¹

* Endereço para correspondência: Instituto Adolfo Lutz, Divisão de Bromatologia e Química, ¹ Seção de Microbiologia Alimentar, Av. Dr. Arnaldo, 355, 01246-902, SP.e-mail: reg_rowlands@yahoo.com.br

² Seção de Bebidas, Divisão de Bromatologia e Química, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP.
Recebido: 23/03/2006 – Aceito para publicação: 31/05/2006

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a resistência térmica de *S. Enteritidis*, *S. Panama* e *S. Infantis* em fórmula láctea infantil em pó reconstituída, experimentalmente contaminada. As amostras de leite reconstituídas foram contaminadas e submetidas às temperaturas de 60°, 70° e 80°C, em banho de imersão, por 5 minutos. A quantificação de *Salmonella* spp. foi realizada pela técnica do NMP (Número Mais Provável). Após o tratamento térmico a 60°C, houve um decréscimo na população de *S. Enteritidis*, *S. Panama* e *S. Infantis* de, em média, 5,13; 4,63 e 4,82 ciclos logarítmicos, respectivamente. Com o aquecimento a 70°C as reduções médias foram de 6,42; 5,56 e 6,56 ciclos logarítmicos, respectivamente. A 80° C não se detectou *Salmonella* spp. nas amostras analisadas. Por meio da análise de comparação múltipla de Tukey observou-se que não houve diferença significativa, com relação à resistência térmica, entre as três cepas de *Salmonella* estudadas às temperaturas de 60° C e 70°C. Os resultados do presente estudo demonstraram que os tratamentos térmicos a 60 e 70°C/5 minutos não foram suficientes para eliminar toda população de *Salmonella* spp. (10⁶ NMP/mL) inoculada na fórmula láctea infantil, demonstrando a importância dos cuidados nas etapas de preparo e manipulação desses alimentos, consideradas como pontos críticos de controle.

Palavras-Chave. *Salmonella*, resistência térmica, fórmula láctea infantil

ABSTRACT

The objective of the present trial was to evaluate the thermal resistance of *S. Enteritidis*, *S. Panama* and *S. Infantis*, which were experimentally inoculated into the reconstituted infant milk formula. Samples of contaminated reconstituted milk were submitted to 60°, 70°, and 80°C in a water - bath for 5 minutes. *Salmonella* spp. quantification was performed by means of Most Probable Number (MPN) technique. After thermal treatment at 60°C, the mean count reductions in population of *S. Enteritidis*, *S. Panamá*, and *S. Infantis* were equal to 5.13, 4.63, and 4.82 log cycles, respectively. In heating at 70°C, the means reductions were 6.42, 5.56, and 6.56 log cycles, respectively. At 80°C there was no recovery of *Salmonella* spp. from analysed samples. Tukey's multiple comparison analysis showed that there were no significant differences on thermal resistance of three *Salmonella* strains at 60°C and 70°C. The present study showed that the treatments at 60° and 70°C for 5 minutes were not enough to eliminate all *Salmonella* spp. population (10⁶ MPN/mL) experimentally inoculated into the infant milk, showing the importance of the precautions during the milk manufacturing and manipulation steps, which were considered critical control points in preparing these foods.

Key Words. *Salmonella*, thermal resistance, infant milk formula

INTRODUÇÃO

As bactérias do gênero *Salmonella* são microrganismos de grande importância em Saúde Pública. Levantamentos epidemiológicos realizados em vários países revelam que dentre os agentes etiológicos das doenças transmitidas por alimentos (DTAs), a salmonela é o patógeno mais comumente envolvido^{1,2}. No ano de 2004, ocorreram nos EUA 15.806 casos de DTAs ocasionados por bactérias patogênicas, sendo 6.464 (40,9%) causados por *Salmonella*³. No Estado de São Paulo, segundo dados do Centro de Vigilância Epidemiológica da Secretaria de Estado da Saúde (CVE/SES – SP), dentre os 69 surtos notificados de origem bacteriana, no ano de 2002, 31 (44,9%) foram ocasionados por *Salmonella* spp., com um total de 534 casos⁴.

Em crianças e recém-nascidos, as infecções por *Salmonella* spp. podem ser severas ocorrendo septicemia com seqüelas e morte^{5,6}. Alimentos destinados a este grupo populacional, como as fórmulas lácteas infantis, podem ser veiculadores deste patógeno. As fórmulas líquidas, prontas para consumo, são comercialmente estéreis, no entanto, os produtos em pó não são esterilizados, podendo apresentar contaminação. Dentre os surtos descritos, há relatos no Brasil, EUA, França, Reino Unido, Espanha e Korea com isolamento de *Salmonella* spp. em amostras de fórmulas lácteas em pó e reconstituídas^{7,8,9,10,11,12,13}. Embora outras bactérias tenham sido isoladas de fórmulas infantis, a ocorrência de doenças associadas ao consumo destes produtos, somente foi confirmada para aqueles contaminados com *Salmonella* spp. e *Enterobacter sakazakii*¹⁴.

A contaminação das fórmulas infantis em pó, por bactérias da família *Enterobacteriaceae*, pode ocorrer durante seu processamento na indústria, sendo as áreas de suplementação (adição de ingredientes), desidratação e embalagem (ambiente) as principais fontes de contaminação^{14,15}. Além disso, durante o preparo do alimento para o consumo, diversos fatores podem contribuir para a ocorrência de patógenos no produto, tais como: uso de água contaminada para reconstituição, manipulação em condições higiênicas inadequadas e abusos no binômio tempo x temperatura^{16,17,18}.

O tratamento térmico pode ser considerado um ponto crítico de controle para eliminação de patógenos em diversos alimentos, entretanto, a eficiência deste processo depende de informações sobre o comportamento do microrganismo em um determinado substrato durante seu aquecimento. O tratamento apropriado deve, ainda, ser suficiente para inativar o patógeno de interesse, sem interferir na composição nutricional do alimento¹⁹.

De acordo com a FAO/OMS¹⁴, o risco de uma criança adoecer devido ao consumo de fórmulas infantis contaminadas pode ser minimizado utilizando água fervente para reconstituir o produto ou pelo aquecimento da fórmula após reconstituição. As informações sobre resistência térmica de *Salmonella* spp. em fórmulas lácteas infantis são de fundamental importância para que os processos térmicos sejam aplicados de maneira eficiente, garantindo a inocuidade do alimento.

O objetivo deste estudo foi avaliar a resistência térmica de *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Panama e *Salmonella* Infantis, em leite em pó infantil reconstituído, laboratorialmente

contaminado e submetido às temperaturas de 60, 70 e 80°C por 5 minutos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Seleção e preparo das cepas de *Salmonella*

As cepas de *S. Enteritidis*, *S. Panama* e *S. Infantis*, utilizadas neste estudo, foram isoladas, de alimento à base de carne de peru envolvida em doença de origem alimentar, de uma amostra de água envolvida em surto e de carne moída crua, enviadas a Seção de Microbiologia Alimentar do Instituto Adolfo Lutz Central, respectivamente.

Reconstituição da fórmula láctea

Utilizou-se leite em pó infantil e com contagem de bactérias mesófilas inferior a 10 UFC/mL (Unidade Formadora de Colônia). Para reconstituição da fórmula, foram homogeneizados 100 gramas do produto em 500 ml de água destilada esterilizada.

Contaminação da fórmula láctea reconstituída

As cepas, mantidas em gelose conservação, foram reativadas em caldo BHI (Brain Heart Infusion) e incubadas a 35°C/18-24 horas. Para realização dos ensaios, com cada uma das três cepas, 1 mL da cultura em BHI foi inoculado em 500 mL da fórmula reconstituída. Procedeu-se a homogeneização por agitação do frasco.

Tratamento térmico

A fórmula láctea contaminada (500 mL) foi dividida em 4 porções (3 de 100 mL e uma de 200 mL). Os três frascos contendo 100 mL foram submetidos separadamente às temperaturas de 60, 70 e 80°C, em um banho-maria (DUBNOFF modelo 144), por 5 minutos, após a amostra ter alcançado a temperatura desejada. Durante o período de 5 minutos a temperatura do leite e do banho foram monitoradas. O frasco contendo 200 mL da amostra não tratada foi utilizado para avaliação da concentração inicial de *Salmonella*. Foram realizados 5 experimentos com cada uma das cepas.

Quantificação da *Salmonella* spp.

A pesquisa de *Salmonella* spp., nas amostras tratadas e não tratadas termicamente, foi realizada de acordo com metodologia descrita na ISO²⁰, com algumas modificações. A etapa de enriquecimento seletivo, que tem como objetivo inibir a multiplicação da microbiota acompanhante e promover a elevação preferencial do número de células de *Salmonella* spp., foi dispensada, uma vez que o estudo foi realizado com leite em pó infantil, experimentalmente contaminado, e com contagem inicial de bactérias mesófilas inferior a 10 UFC/ml.

A quantificação do microrganismo foi realizada pela técnica do Número Mais Provável (NMP) segundo Peeler et al.²¹. Uma série de 3 tubos, contendo cada um 10 mL de água peptonada tamponada (APT) 1% concentração dupla, foi semeada com 10

mL da amostra submetida ao tratamento térmico (não diluída) previamente homogeneizada. Em seguida, 25 mL de amostra, de cada frasco, foi homogeneizado em 225 mL de água peptonada 1% (APT 1%), obtendo-se a diluição 10^{-1} . Diluições decimais seriadas foram realizadas para se obter as diluições 10^{-2} e 10^{-3} . Séries de 3 tubos, contendo cada um 10mL de APT 1% concentração simples, foram semeadas com 1 mL das diluições 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} . Os tubos foram incubados a $35^{\circ}\text{C}/24$ horas.

Para a quantificação da concentração inicial de *Salmonella* spp., presente na fórmula láctea antes do tratamento térmico, foram realizadas diluições decimais seriadas de 10^{-1} a 10^{-7} , utilizando-se em seguida a técnica de NMP.

Os tubos que apresentavam turvação foram semeados em dois meios seletivos e diferenciais para salmonela: SS (ágar *Salmonella-Shigella*) (Diagnostic Pasteur 64514) e BG (ágar verde brilhante) (Merck 107232). As placas foram incubadas a $35^{\circ}\text{C}/24$ horas e as colônias características de *Salmonella* spp. foram inoculadas em meio IAL²² para identificação bioquímica.

Cálculo do valor D

O valor D corresponde ao tempo necessário para reduzir 90% (=1 redução Log) da população microbiana (tempo de redução decimal)²³. O valor D foi determinado para cada uma das três cepas estudadas de acordo com a seguinte equação: $D = t / (\text{Log } N_0 - \text{Log } N)$, onde t corresponde ao tempo de aquecimento em minutos, $\text{Log } N_0$ é o número inicial do microrganismo (Log NMP/mL) e $\text{Log } N$ é o número final de células após o tratamento térmico (Log NMP/mL)²⁴.

Análise Estatística

Os dados são apresentados com suas respectivas médias \pm desvio-padrão. Uma análise de correlação entre: população (\log_{10} NMP) e temperatura ($^{\circ}\text{C}$) foi realizada empregando-se o teste- t , com nível de significância de 95%, para verificar se a correlação entre essas variáveis era significativa. Para obter uma relação quantitativa entre estas variáveis foi aplicada uma análise de regressão linear com nível de significância de 95% e construídos intervalos de confiança e de predição para o modelo gerado. Toda a análise estatística foi realizada utilizando o pacote estatístico Minitab for Windows, v. 13.31²⁵.

Para verificar se houve diferença significativa com relação à resistência térmica entre as três cepas estudadas foi realizada uma comparação múltipla de Tukey com nível de significância de 95%.

RESULTADOS

Após o tratamento térmico a 60°C , houve um decréscimo na população de *S. Enteritidis*, *S. Panama* e *S. Infantis* de, em média, 5,13; 4,63 e 4,82 ciclos logarítmicos, respectivamente. Com o aquecimento a 70°C as reduções médias foram de 6,42; 5,56 e 6,56 ciclos logarítmicos, respectivamente. Após tratamento a 80°C , não houve recuperação de células viáveis em nenhum dos experimentos realizados (Tabela 1).

Os resultados da análise de regressão linear, para *S. Enteritidis*, *S. Panama* e *S. Infantis*, indicam uma forte correlação entre a população de *Salmonella* spp. e a temperatura ($R^2=0,976$, $0,955$ e $0,968$, respectivamente), significativa no nível de 95% de confiança, de acordo com os resultados do teste- t .

Os valores D calculados para as temperaturas de 60°C e 70°C foram: $D_{60} = 0,97$; $1,08$ e $1,04$ min. e $D_{70} = 0,78$; $0,90$ e $0,76$ min. para *S. Enteritidis*, *S. Panama* e *S. Infantis*, respectivamente.

DISCUSSÃO

A resistência térmica de um microrganismo depende de diferentes fatores como concentração de bactérias no substrato, microbiota competidora presente, fase em que se encontra a população bacteriana e das propriedades e composição do substrato (pH, Aw, gorduras, proteínas, sólidos totais, entre outros). A presença de gorduras e proteínas nos alimentos exerce efeito protetor sobre os microrganismos²⁶. No leite, a interação entre a fração proteica e cátions bivalentes, presentes no soro, pode estar associada com a proteção da *Salmonella* aos tratamentos térmicos²⁷.

Os valores D_{60} para a maioria dos sorovares de *Salmonella* estão entre 0,2 e 6,5 minutos²⁸. Determinados sorovares de *Salmonella enterica* são mais resistentes ao calor do que outros, sendo a *Salmonella* Senftenberg 775W a mais resistente²⁵. No presente estudo, os resultados com o aquecimento a 60°C ($P=0,187$) e 70°C ($P=0,142$) demonstraram que nestas temperaturas não houve diferença significativa na resistência térmica entre as cepas de *S. Enteritidis*, *S. Panama* e *S. Infantis*. Os valores D_{60} e D_{70} , necessários para reduzir a população, um ciclo da escala logarítmica, foram semelhantes para as três cepas.

Diferenças na resistência térmica entre *Salmonella* spp. e outros gêneros da Família *Enterobacteriaceae* são observadas.

Tabela 1. População inicial de *Salmonella* spp. e após os tratamentos térmicos a 60°C , 70°C e 80°C

	População de <i>Salmonella</i> spp. (\log_{10} NMP/mL)			
	Inicial	60°C	70°C	80°C
S. Enteritidis	$6,49 \pm 0,15^a$	$1,36 \pm 0,62$	$0,07 \pm 0,16$	— ^b
S. Panama	$6,43 \pm 0,35$	$1,80 \pm 0,33$	$0,87 \pm 0,80$	—
S. Infantis	$6,76 \pm 0,28$	$1,94 \pm 0,44$	$0,20 \pm 0,29$	—

^amédia \pm desvio padrão

^bnão houve recuperação de células viáveis ($<0,3$ NMP/mL). Portanto, não foi possível expressar o resultado em Log_{10}

E. sakazakii representa um dos microrganismos com maior termotolerância entre gêneros da Família *Enterobacteriaceae*, sendo encontrados valores D_{58} e D_{60} de 4,2 e 2,5 min., respectivamente, em fórmula infantil reconstituída²⁹. Comparando os valores D_{60} obtidos no presente trabalho com os observados para *Enterobacter sakazakii*, verifica-se que os sorovares de *Salmonella* estudados apresentaram maior sensibilidade ao calor.

Os resultados do presente estudo demonstraram que os tratamentos térmicos a 60 e 70°C/5 minutos não foram suficientes para eliminar toda população dos três sorovares de *Salmonella* (10^6 NMP/mL) inoculada na fórmula infantil. Os níveis de patógenos encontrados em fórmulas lácteas em pó contaminadas, geralmente, são baixos¹³. Entretanto, o armazenamento inadequado do produto após reconstituição pode favorecer a multiplicação do agente. Uma população de *Salmonella*, em fórmula reconstituída mantida a 30°C por 24 horas, pode aumentar em até 7,5 ciclos logarítmicos¹⁵. Um aquecimento posterior poderá não ser suficiente para garantir a inocuidade do alimento, como observado no presente estudo.

Após o tratamento térmico a 80°C não houve recuperação de células viáveis de *Salmonella* spp. Entretanto, o uso de temperaturas elevadas para preparar as fórmulas lácteas não é recomendado, pois podem ocorrer alterações no conteúdo nutricional do produto, além do risco de queimaduras durante a manipulação e consumo¹⁴.

Considerando que as fórmulas lácteas são consumidas por crianças, particularmente, as hospitalizadas e prematuras ou que não podem ser amamentadas com leite materno, estes dados demonstram a importância dos cuidados nas etapas de preparo e manipulação destes alimentos, sendo consideradas pontos críticos de controle. O tratamento térmico pode não garantir a segurança do produto, principalmente, em fórmulas armazenadas inadequadamente e com elevada concentração de *Salmonella* spp.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos funcionários da Seção de Meios de Cultura do Instituto Adolfo Lutz pela preparação dos meios utilizados neste trabalho.

REFERÊNCIAS

1. Fantasia MR, Filetici E. *Salmonella* Enteritidis in Italia. *Int J Food Microbiol* 1994; 21: 7-13.
2. Notermans S, Borgdorff MA. Global Perspective of Foodborne Disease. *J Food Prot* 1997; 60 (11): 1395-9.
3. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Preliminary FoodNet data on the incidence of infection with pathogens transmitted commonly through food – 10 sites, United States, 2004. Available from: www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5414a2.htm. Acesso: 10/11/2005.
4. Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE). Divisão de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar. INFORME - NET DTA – Informações sobre Doenças Transmitidas por Água e Alimentos. Disponível em: http://www.cve.saude.sp.gov.br/html/hidrica/dta_estat.htm. Acesso em: 01/11/2005.
5. Franco BDGM, Landgraf M. Microrganismos patogênicos de importância em alimentos. In: Franco BDGM, Landgraf M, editores. *Microbiologia dos Alimentos*. São Paulo: Ed Atheneu; 2002, p. 55-60.
6. Varnam AH, Evans MG. *Salmonella*. In: Varnam AH, editor. *Foodborne Pathogens*. St. Louis: Mosby Year Book; London: Wolfe, 1991; p. 51-85.
7. Jakabi M et al. Observações laboratoriais sobre surtos alimentares de *Salmonella* spp., ocorridos na grande São Paulo, no período de 1994 a 1997. *Rev Inst Adolfo Lutz* 1999; 58(1): 47-51.
8. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *Salmonella* serotype Tennessee in powdered milk products and infant formula – Canada and United States, 1993. Available from: www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00021081.htm. Acesso: 10/11/2005.
9. Bornemann R, Zerr DM, Heath J, Koehler J, Grandjean M, Pallipamu R, Duchin J. An outbreak of *Salmonella* serotype Saintpaul in a children's hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2002; 23: 671-6.
10. Eurosurveillance. Preliminary report of an International outbreak of *Salmonella* Anatum infection linked to an infant formula milk, 1997. Available from: www.eurosurveillance.org/em/v02n03/0203-224.asp. Acesso: 10/11/2005.
11. Ruiz J, Nunez ML, Sempere MA, Diaz J, Gomez J. Systemic infections in three infants due to a lactose-fermenting strain of *Salmonella* Virchow. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1995; 14: 454-6.
12. Rowe B et al. *Salmonella* Ealing infections associated with consumption of infant dried milk. *Lancet* 1987; 2 (8564): 900-3.
13. Park et al. *Salmonella enterica* serovar London infections associated with consumption of infant formula. *Yonsei Med J* 2004; 45: 43-8.
14. World Health Organization. *Enterobacter sakazakii* and other microorganisms in powdered infant formula. Microbiological Risk Assessment Series n° 6. Available from: www.who.int/foodsafety/publications/micro/mra6/en/ Acesso: 10/11/2005.
15. Caric M. Concentrated and dried dairy products. In: *Dairy Science and Technology Handbook vol.2*. New York: VCH Publishers Inc; 1993.
16. Wu FM, Beuchat LR, Doyle MP, Mintz ED, Wells JG, Swaminathan B. Survival and growth of *Shigella flexneri*, *Salmonella enterica* serovar Enteritidis, and *Vibrio cholerae* O1 in reconstituted infant formula. *Am J Trop Med Hyg* 2002; 66: 782-6.
17. Salles RK, Goulart R. Diagnóstico das condições higiênicas-sanitárias e microbiológicas de lactários hospitalares. *Rev Saúde Pública* 1997; 31: 131-9.
18. Santos MIS, Tondo EC. Determinação de perigos e pontos críticos de controle para implantação de sistema de análise de perigos e pontos críticos de controle em lactário. *Rev Nutr Campinas* 2000; 13: 211-22.
19. Edelson-Mammel SG, Buchanan RL. Thermal inactivation of *Enterobacter sakazakii* in rehydrated infant formula. *J Food Prot* 2004; 67: 60-3.
20. International Organization for Standardization (ISO). **Microbiology – General guidance for the detection of *Salmonella*. Intern. Org. for Standardization 6579, Geneva, Switzerland, 2002.**
21. Peeler JT, Houghtby GA, Rainosek AP. The most probable number technique. In: Vanderzant C, Splittstoesser DF, editors. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods 3rd*. Washington (DC): APHA; 1992, p. 105-20.
22. Pessoa GVA, Silva EAM. Meios de rugai e lisina-motilidade combinados em um só tubo para a identificação presumtiva de enterobactérias. *Rev Inst Adolfo Lutz* 1972; 32: 97-100.
23. Forsythe SJ. Aspectos básicos. In: Forsythe SJ, editor. *Microbiologia da Segurança Alimentar*. Porto Alegre (RS): Artmed; 2002, p.28-30.
24. Quintavalla S, Larini S, Mutti P, Barbuti S. Evaluation of the thermal resistance of different *Salmonella* serotypes in pork meat containing curing additives. *Int J Food Microbiol* 2001; 67: 107-14.
25. MINITAB for windows [Minitab- Inc, USA.] Versão 13.31, 2000. CD-rom
26. Jay JM. Conservação de alimentos por altas temperaturas e características de microrganismos termofílicos. In: Jay JM, editor. *Microbiologia de Alimentos 6^a ed*. Porto Alegre: Artmed; 2005, p 365 – 85.
27. Mañas P, Pagán R, Sala FJ, Condón S. Low molecular weight milk whey components protect *Salmonella* Senftenberg 775W against heat by a mechanism involving divalent cations. *J Appl Microbiol* 2001; 91: 871-7.
28. Robertos D. Bacteria of public health significance in meat microbiology. Brown, MH Ed. London and New York: Applied Science Publishers, 1982.
29. Nazarowec-White M, Farber JM. Thermal resistance of *Enterobacter sakazakii* in reconstituted dried-infant formula. *Lett Appl Microbiol* 1997; 24: 9-13.

Enxaguatórios bucais: avaliação da eficácia antimicrobiana de produtos comercialmente disponíveis

Mouthwashes: antimicrobial efficacy assessment in commercially available products

RIALA6/1060

Adriana BUGNO^{1*}, Maria Aparecida NICOLETTI², Adriana A. B. ALMODÓVAR¹, Tatiana C. PEREIRA¹, Mariângela T. AURICCHIO¹

* Endereço para correspondência: ¹Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr. Arnaldo, 355, 01246-902, SP/SP e-mail: adrbugno@ial.sp.gov.br

² Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo - Departamento de Farmácia/Farmácia Universitária

Recebido: 27/03/2006 – Aceito para publicação: 24/05/2006

RESUMO

Os enxaguatórios bucais podem ser utilizados como complemento à higienização bucal. A atividade antimicrobiana de seis produtos comercialmente disponíveis foi avaliada frente a *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*. Verificou-se a sobrevivência dos microrganismos após 30, 60 e 90 segundos de contato com os produtos. O tempo de redução decimal (Valor D) e a redução da população microbiana obtida após os intervalos de contato (log UFC/mL vs tempo) foram utilizados para comparar a atividade antimicrobiana dos produtos avaliados. Os resultados indicaram diferenças na sobrevivência dos microrganismos e o produto composto por óleos essenciais evidenciou a melhor atividade antimicrobiana.

Palavras-Chave. enxaguatório bucal, atividade antimicrobiana, redução logarítmica, Valor D.

ABSTRACT

Mouthwashes have been used to supplement the oral hygiene procedures. The antimicrobial activity efficacy of six commercially available products was assessed on to *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. Microbial survival was evaluated after being left in contact with the mouthwash products for 30, 60, and 90 seconds. The decimal reduction time (D-value), and the microorganisms logarithm reduction at contact time intervals were calculated from the obtained curves (Log CFU/mL vs time), and they were used for comparing the antimicrobial activity of analyzed products. Differences on microbial survival were observed, and the product compounded of essential oils showed the best antimicrobial activity.

Key Words. mouthwash, antimicrobial activity, logarithmic reduction, D-value.

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de gengivites está relacionado com a formação de placa bacteriana, sendo necessário seu controle e prevenção na manutenção da saúde da cavidade bucal. Neste contexto, incluem-se procedimentos mecânicos, químicos e de controle da dieta¹⁻⁵.

Os enxaguatórios bucais têm sido utilizados no controle químico de placa bacteriana como substitutos ou adjuntos aos procedimentos mecânicos, além de se constituírem em facilitadores para a veiculação de compostos ativos para o tratamento de afecções específicas^{1-3,5-6}. Em geral, os anti-sépticos bucais não apresentam composição complexa; o diferencial neste tipo de produto é a sua eficácia antimicrobiana considerando os compostos ativos presentes, associados ou não

a compostos de flúor^{1,6}.

Os antimicrobianos dos anti-sépticos bucais rompem a parede celular e inibem a atividade enzimática da célula microbiana. Adicionalmente, previnem a agregação bacteriana e diminuem a multiplicação microbiana^{1,7}.

Entre os compostos ativos mais utilizados em anti-sépticos bucais temos a clorexidina, cloreto de cetilpiridíneo e triclosan, além de óleos essenciais^{1,5,7-8}. A clorexidina, um dos biocidas mais utilizados em formulações anti-sépticas, é uma biguanida catiônica que age principalmente sobre bactérias Gram-positivas, além de leveduras e dermatófitos, enquanto que o cloreto de cetilpiridíneo, sobre bactérias Gram-positivas e leveduras. Entre os compostos fenólicos, o triclosan tem sido o mais utilizado em formulações para controle da placa bacteriana, apresentando ação principalmente contra bactérias Gram-

positivas; no entanto, este ativo tem sido utilizado em associação a copolímeros, que aumentam seu espectro de ação sobre bactérias gram-negativas e leveduras^{1,7-8}.

O enxaguatório que apresenta o maior histórico de uso é composto por solução hidro-alcoólica dos óleos essenciais timol, mentol e eucaliptol. Embora sejam normalmente utilizados como flavorizantes, os óleos essenciais podem contribuir com a propriedade antimicrobiana do produto devido à presença de compostos fenólicos como seus principais constituintes, os quais agem principalmente sobre bactérias Gram-positivas e leveduras^{1-2,7-9}.

No Brasil, os enxaguatórios bucais são categorizados como produtos de higiene pessoal e cosméticos, sendo as formulações que apresentam indicações específicas, como anti-sépticos, antiplaca e de uso infantil, classificadas como produtos de grau 2 e demandam a comprovação da sua segurança e eficácia antimicrobiana¹⁰.

A avaliação da eficácia antimicrobiana de produtos anti-sépticos bucais pode ser efetuada por testes *in vivo* ou *in vitro*, sendo que estes são geralmente adaptações dos procedimentos de difusão em ágar, de determinação da concentração inibitória mínima (CIM) ou, ainda dos ensaios para determinação do tempo de redução decimal^{2-3,7-8,11}. O método de difusão em ágar pode ser utilizado apenas para a avaliação qualitativa da atividade antimicrobiana; como o fenômeno de difusão depende das propriedades físico-químicas do produto e do meio de cultura utilizado, o diâmetro da zona de inibição não pode ser considerado como parâmetro de comparação de diferentes formulações, assim como a ausência de halo de inibição de crescimento pode não ser indicativo da ausência de atividade. A concentração inibitória mínima pode ser utilizada para a avaliação quantitativa de diferentes formulações, porém este método não fornece informações referentes ao comportamento do produto durante o período de uso, sendo mais interessante a utilização de procedimentos analíticos que permitam avaliar o perfil de morte microbiana, a exemplo dos métodos de avaliação da eficácia de sistemas conservantes. Orth¹²⁻¹³ propôs a utilização do método de regressão linear para avaliar sistemas conservantes em cosméticos, que permite calcular o tempo de redução decimal (valor D), equivalente ao tempo necessário para reduzir 90% da população microbiana. Protocolos analíticos como os métodos para avaliação da atividade germicida de sanitizantes, publicado pela AOAC¹⁴ e para avaliação da atividade antimicrobiana de desinfetantes e anti-sépticos da AFNOR¹⁵⁻¹⁶ também avaliam a capacidade de reduzir populações microbianas utilizadas em testes de desafio, considerando como eficazes os produtos capazes de reduzir 99,999% da população microbiana em 30 segundos de contato, no caso do método AOAC e no tempo estabelecido de uso do produto, no caso da AFNOR.

Por não haver no país, uma metodologia oficial para avaliação da atividade anti-séptica de enxaguatórios bucais, este estudo teve como objetivo, avaliar a eficácia antimicrobiana *in vitro* de produtos comercialmente disponíveis frente a microrganismos frequentemente relacionados aos processos de afecções bucais^{4,6,11}: *Streptococcus mutans* (ATCC 25175),

Enterococcus faecalis (ATCC 19433), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e *Candida albicans* (ATCC 10231), utilizando o método de regressão linear para determinar o perfil de letalidade destes produtos, considerando os modos de uso indicados em termos de concentração e tempo de contato.

MATERIAL E MÉTODOS

Enxaguatórios bucais

O material deste estudo consistiu de seis produtos comercialmente disponíveis em farmácias e drogarias da cidade de São Paulo, Brasil, identificados de acordo com o seu componente ativo. As amostras CP e CP+OE apresentaram cloreto de cetilpiridíneo (0,5 mg/mL) como componente ativo, sendo a segunda, associada a tinturas de camomila e de mirra e a óleos de sálvia, melaleuca e eucalipto. OE corresponde à amostra composta por timol (0,6 mg/mL), eucaliptol (0,92 mg/mL), mentol (0,42 mg/mL) e salicilato de metila (0,6 mg/mL); TCS, apresentou triclosan (0,3 mg/mL) associado a copolímero, o produto CHX apresentou gluconato de clorexidina (1,2 mg/mL) e o produto FL, fluoreto de sódio (equivalente a 1000 ppm de flúor). Todos os produtos foram avaliados quanto a atividade antimicrobiana sem diluição, conforme a indicação de uso.

Preparação da suspensão microbiana

A partir das culturas-estoque de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e *Candida albicans* (ATCC 10231), foram realizados três subcultivos consecutivos em caldo Caseína de soja (DIFCO®), incubados a (36 + 1)°C por 24 horas, sendo que as culturas de *Streptococcus mutans* e de *Enterococcus faecalis* foram incubadas sob condições de microaerofilia (10% CO₂). O terceiro subcultivo foi quantificado de acordo com os compêndios farmacopêicos¹⁷, em ágar Caseína de soja (DIFCO®), utilizando as mesmas condições de incubação descritas anteriormente. Após a determinação da carga microbiana, a suspensão, mantida sob refrigeração, foi ajustada com solução salina estéril para conter entre 7,5 x 10⁷ e 1,2 x 10⁸ UFC/mL¹³⁻¹⁶.

Avaliação da atividade antimicrobiana

Cada produto foi submetido à avaliação da atividade antimicrobiana utilizando o método de regressão linear¹¹. Para determinar o perfil de letalidade (logUFC/mL vs tempo), verificou-se a capacidade de cada produto em reduzir, em escala logarítmica, as populações microbianas padronizadas após 30, 60 e 90 segundos de contato. Foi considerada como atividade satisfatória, a redução de, no mínimo, 5 Log₁₀ (equivalente à redução de 99,999%) em 60 segundos.

Confirmação da capacidade de neutralização da atividade antimicrobiana residual do anti-séptico bucal

Para garantir a validade dos resultados obtidos na enumeração de microrganismos sobreviventes após contato com o anti-séptico bucal, é necessário comprovar a neutralização da

atividade antimicrobiana do res6duo do produto transferido aos meios de cultura ap6s o tempo de contato estabelecido.

Neste estudo, o caldo Lethen (DIFCO®) foi utilizado como meio de cultura neutralizante da a76o antimicrobiana residual dos anti-s6pticos bucais e para confirmar esta capacidade neutralizante, al6quotas de 1,0 mL do produto foram adicionadas a tr6s tubos contendo 9,0 mL de caldo Lethen (DIFCO®). Em seguida, al6quotas de 0,5 mL de suspens6o microbiana contendo 1000 UFC/mL foram adicionadas a cada um dos tubos. Ap6s homogeneiza76o manual, al6quotas de 1,0 mL e de 0,1 mL foram transferidas para placas de Petri, em duplicata, homogeneizadas com 20 mL de 6gar Case6na de soja (DIFCO®) e incubadas por 48 horas sob as mesmas condi76oes de incubaq6o utilizadas na prepara76o da suspens6o microbiana. Ap6s o per6odo de incubaq6o, foi realizada a enumera76o da popula76o microbiana sobrevivente e calculada a taxa de recupera76o microbiana obtida.

Enumera76o da popula76o microbiana ap6s contato com o produto.

Tubo contendo 9,0 mL do produto, na concentra76o de uso indicada na rotulagem, foi mantido em banho-maria a (22 + 2)°C por aproximadamente 10 minutos. Em seguida, al6quota de 1,0 mL da suspens6o microbiana ajustada (contendo aproximadamente 10⁸ UFC/mL) foi transferida ao tubo e ap6s homogeneiza76o manual o tubo foi recolocado em banho. 30 segundos ap6s a adi76o do in6culo, al6quota de 1,0 mL da mistura foi transferida para tubo contendo 9,0 mL de caldo Lethen (DIFCO®), meio de cultura utilizado para neutralizar a a76o antimicrobiana residual do produto. Em seguida, procedeu-se 6 enumera76o de microrganismos¹⁷, sendo as dilui76oes decimais seriadas efetuadas em caldo Lethen (DIFCO®); al6quotas de 1,0 mL foram transferidas para placas de Petri, em duplicata, homogeneizadas com 20 mL de 6gar Case6na de soja (DIFCO®) e incubadas por 48 horas sob as mesmas condi76oes de incubaq6o utilizadas na prepara76o da suspens6o microbiana. O mesmo procedimento foi realizado ap6s 60 segundos e ap6s 90 segundos da adi76o da suspens6o microbiana.

Teste controle

Tubo contendo 9,0 mL de solu76o salina est6ril foi mantido em banho a (22 + 2)°C por aproximadamente 10

minutos. Em seguida, al6quota de 1,0 mL da suspens6o microbiana ajustada (contendo aproximadamente 10⁸ UFC/mL) foi transferida ao tubo e ap6s homogeneiza76o manual o tubo foi recolocado em banho. Ap6s 30 segundos da adi76o do in6culo, al6quota de 1,0 mL da mistura foi transferida para tubo contendo 9,0 mL de caldo Lethen (DIFCO®). Em seguida, procedeu-se 6 enumera76o de microrganismos¹⁷, sendo as dilui76oes decimais seriadas efetuadas em caldo Lethen (DIFCO®); al6quotas de 1,0 mL foram transferidas para placas de Petri, em duplicata, homogeneizadas com 20 mL de 6gar Case6na de soja (DIFCO®) e incubadas por 48 horas sob as mesmas condi76oes de incubaq6o utilizadas na prepara76o da suspens6o microbiana. O mesmo procedimento foi realizado ap6s 60 segundos e 90 minutos da adi76o da suspens6o microbiana.

RESULTADOS E DISCUSS6O

A Tabela 1 apresenta os resultados obtidos na avalia76o da capacidade do meio de cultura utilizado de neutralizar a a76o residual do anti-s6ptico bucal. De acordo com comp6ndios oficiais¹⁸, a aus6ncia de atividade antimicrobiana 6 indicada por taxas de recupera76o microbiana superiores a 70%. A avalia76o dos resultados obtidos indica que o meio de cultura selecionado para neutralizar a atividade antimicrobiana dos res6duos dos produtos ap6s per6odo do contato, caldo Lethen (DIFCO®), foi satisfat6rio. A enumera76o de microrganismos sobreviventes ap6s o per6odo de contato com o anti-s6ptico bucal, apresentada na Tabela 1, indica que n6o houve atividade antimicrobiana dos res6duos dos produtos em teste nas condi76oes experimentais.

Na avalia76o da atividade antimicrobiana dos anti-s6pticos bucais, todos os ensaios foram realizados em triplicata. Foram calculados os valores m6dios obtidos na enumera76o das popula76oes microbianas, antes e ap6s o contato com o produto e a partir destes dados, foi constru6do gr6fico do Log₁₀ UFC/mL em fun76o do tempo de contato (perfil de letalidade) para cada produto analisado (Figura 1). Os resultados indicam atividade antimicrobiana diferenciada entre os produtos frente aos microrganismos estudados.

Tabela 1. Porcentagem de recupera76o (R) de *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans* obtida durante a avalia76o da capacidade do caldo Lethen (DIFCO®) para neutralizar a76o residual dos anti-s6pticos bucais

Produto	<i>Streptococcus mutans</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Enterococcus faecalis</i>		<i>Candida albicans</i>	
	UFC	R(%)	UFC	R(%)	UFC	R(%)	UFC	R(%)
Controle	46/42/50		48/50/48		42/48/48		46/51/48	
CP	42/42/48	95,65	46/49/47	97,12	40/48/46	97,17	44/46/46	93,79
CP + OE	43/40/48	95,00	46/46/48	95,89	41/46/46	96,30	42/46/46	92,55
OE	43/40/45	92,83	48/48/44	95,89	40/46/47	96,30	44/48/46	95,24
TCS	44/40/46	94,13	45/48/46	95,07	40/45/46	95,00	42/48/44	92,55
CHX	42/39/46	91,96	44/46/42	90,35	42/42/46	94,13	42/44/46	91,10
FL	44/41/48	96,30	46/48/48	97,12	41/48/46	97,83	44/48/48	96,69

A partir dos gráficos de letalidade obtidos para cada produto analisado, foram determinadas as equações da reta, calculados o tempo de redução decimal (Valor D) e o tempo necessário para reduzir cinco ciclos logarítmicos ($T_{99,999\%}$) (Tabela 2).

Observando-se os valores D calculados a partir da equação de reta obtida, verificou-se que a amostra OE apresentou a melhor atividade antimicrobiana sobre todos os microrganismos estudados, enquanto a amostra FL apresentou a menor atividade antimicrobiana. A amostra TCS apresentou a segunda melhor atividade antibacteriana, enquanto a amostra CHX, a segunda melhor atividade antifúngica. Quanto aos produtos a base de cloreto de cetipiridíneo, a amostra CP+OE apresentou atividade antimicrobiana melhor em relação à

amostra CP, provavelmente devido à associação com óleos essenciais.

Considerando como eficaz o produto capaz de reduzir 99,999% da população microbiana após um minuto de contato, verificou-se que apenas a amostra OE reduziu mais de cinco ciclos logarítmicos de todos os microrganismos estudados. Os produtos TCS e CP+OE foram eficazes contra *Streptococcus mutans* e *Enterococcus faecalis*, enquanto que o produto CHX foi eficaz somente contra *Candida albicans*.

Os resultados obtidos neste estudo mostraram-se compatíveis com os estudos realizados por outros pesquisadores, embora estes tenham determinado a concentração inibitória mínima (CIM) na avaliação da atividade antimicrobiana. McDonnell e Russel⁷ e McBain et al¹⁹ verificaram que triclosan

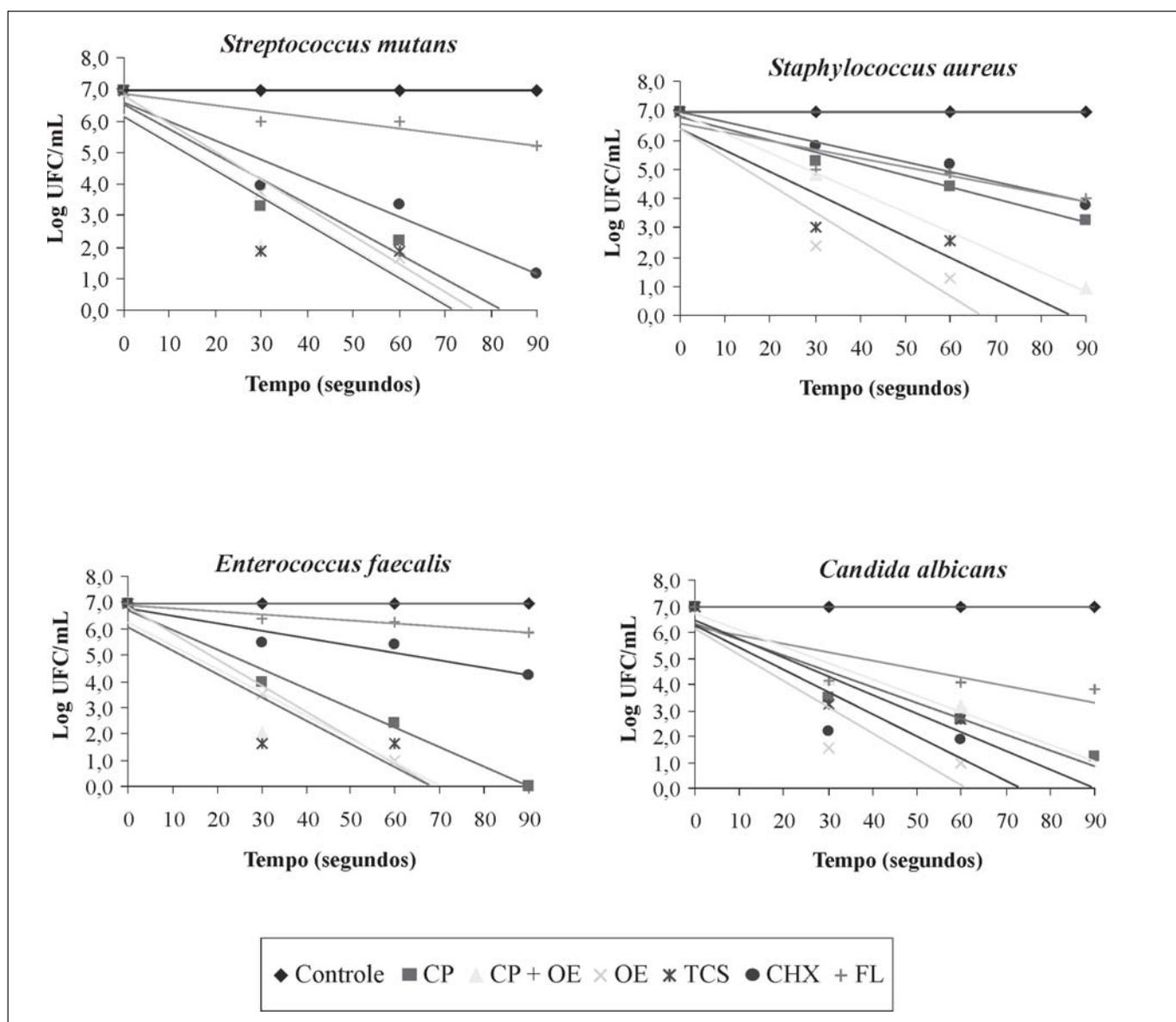


Figura 1. Redução decimal de microrganismos causada por anti-sépticos bucais

Tabela 2. Equação da reta, Valor D e o tempo para redução de 5 Log₁₀ de *Streptococcus mutans* (A), *Staphylococcus aureus* (B), *Enterococcus faecalis* (C) e *Candida albicans* (D).

(A)				(B)			
Produto	Equação	Valor D (seg)	T _{99,999%} (seg)	Produto	Equação	Valor D (seg)	T _{99,999%} (seg)
CP	y = -0,080x + 6,543	12,547	62,74	CP	y = -0,040x + 6,778	24,876	124,38
CP + OE	y = -0,085x + 6,181	11,723	58,62	CP + OE	y = -0,068x + 6,880	14,793	73,96
OE	y = -0,089x + 6,786	11,274	56,37	OE	y = -0,095x + 6,385	10,504	52,52
TCS	y = -0,085x + 6,131	11,723	58,62	TCS	y = -0,074x + 6,384	13,569	67,84
CHX	y = -0,060x + 6,565	16,556	82,78	CHX	y = -0,034x + 6,967	29,155	145,77
FL	y = -0,018x + 6,832	55,866	279,33	FL	y = -0,030x + 6,561	33,333	166,67

(C)				(D)			
Produto	Equação	Valor D (seg)	T _{99,999%} (seg)	Produto	Equação	Valor D (seg)	T _{99,999%} (seg)
CP	y = -0,075x + 6,710	13,369	66,84	CP	y = -0,061x + 6,340	16,529	82,64
CP + OE	y = -0,089x + 6,215	11,249	56,24	CP + OE	y = -0,063x + 6,681	15,873	79,37
OE	y = -0,100x + 6,824	10,050	50,25	OE	y = -0,100x + 6,159	9,970	49,85
TCS	y = -0,090x + 6,079	11,173	55,87	TCS	y = -0,072x + 6,437	13,966	69,83
CHX	y = -0,028x + 6,768	35,842	179,21	CHX	y = -0,085x + 6,231	11,723	58,62
FL	y = -0,012x + 6,867	86,957	434,78	FL	y = -0,032x + 6,173	31,348	156,74

e clorexidina apresentaram alto potencial antimicrobiano frente a bactérias orais, sendo o valor da CIM para o triclosan menor que a obtida para clorexidina. Meiller et al²⁰, que avaliaram a eficácia antifúngica de três formulações contendo óleos essenciais e uma contendo digluconato de clorexidina, verificaram que todos os produtos apresentavam atividade antifúngica na concentração comercialmente disponível, sendo que as formulações contendo óleos essenciais apresentaram os melhores resultados. Giuliana et al^{21,22} investigaram a atividade antifúngica de enxaguatórios bucais contendo cloreto de cetilpiridíneo, digluconato de clorexidina, hexetina, sanguinária e triclosan e verificaram que os produtos contendo cloreto de cetilpiridíneo foram os mais efetivos, enquanto digluconato de clorexidina foi mais efetivo que o triclosan.

Pan et al²³, Riep et al²⁴, assim como Pitten e Kramer²⁵, avaliaram a taxa de redução de populações microbianas após contato com antissépticos e verificaram que produtos contendo óleos essenciais foram mais efetivos que aqueles a base de fluoretos. Pitten e Kramer²⁶ também verificaram que produtos a base de cloreto de cetilpiridíneo reduzem entre 2 e 2,5 ciclos logarítmicos as contagens microbianas na saliva.

Alguns estudos sugerem que a atividade antimicrobiana *in vitro* pode não estar altamente correlacionada à atividade clínica¹¹, como, por exemplo, Renton-Harper et al²⁷, que verificaram que formulações contendo clorexidina apresentaram atividade antimicrobiana altamente superior ao cloreto de cetilpiridíneo e triclosan, e Monfrin e Ribeiro²⁸, que também verificaram que produtos contendo clorexidina foram os mais eficientes na redução das populações microbianas presentes na saliva de voluntários, enquanto produtos contendo triclosan apresentaram pouca redução e produtos contendo óleos essenciais não reduziram a população microbiana.

As diferenças verificadas entre os métodos de avaliação *in vivo* e *in vitro* podem estar relacionadas às características de adsorção dos agentes antimicrobianos e à menor sensibilidade aos antimicrobianos observada em biofilmes em comparação a situações em que os microrganismos estão em suspensão¹¹. Apesar de eventuais diferenças, os testes *in vitro*, utilizando culturas em suspensão, são de extrema importância como método preliminar para avaliar a atividade antimicrobiana de enxaguatórios bucais.

CONCLUSÃO

Com relação à atividade antibacteriana, o produto OE apresentou a melhor atividade antimicrobiana, seguido do produto TCS. Com relação à atividade antifúngica, também o produto OE apresentou a melhor atividade antimicrobiana, seguido do produto CHX.

REFERÊNCIAS

1. Adams D, Addy M. Mouthrinses. *Adv Dent Res* 1994; 8: 291-301.
2. Marsh, PD. Microbiological aspects of the chemical control of plaque and gingivitis. *J Dent Res* 1992; 71: 1431-8.
3. Newman MG, Hulem C, Colgate J, Anselmo C. Antibacterial susceptibility of plaque bacteria. *J Dent Res* 1979; 58: 1722-32.
4. Prista LN, Bahia MFG, Vilar E. *Dermofarmácia e Cosmética*. Porto: Assoc. Nacional de Farmácias; 1995.
5. Steinberg D, Hirschfeld Z, Tayeb I, Ben-Yosef S, David A, Friedman M. The effect of parabens in a mouthwash and incorporated into a sustained release varnish on salivary bacteria. *J Dentistry* 1999; 27: 101-6.
6. Bonadeo I. *Cosmética. Ciência y Tecnología*. Madrid: Ed Ciência, 1988.
7. McDonnell G, Russel D. Antiseptics and disinfectants. Activity, action and resistance. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12: 147-79.
8. Hobson DW; Bolsen K. Methods of testing oral and topical antiseptics and antimicrobial. In: Block SS. *Desinfection, Sterilization and Preservation*. 5 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001. p. 1329-59.
9. Nascimento GGF, Locatelli J, Freitas PC, Silva GL. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Braz J Microbiol* 2000; 31: 247-56.
10. Brasil. Resolução RDC nº 211, de 14 jul. 2005 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Estabelece a definição e classificação de produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 18 jul. 2005. Disponível em <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=17882&word=>. Acesso em 02 ago. 2005.
11. Botelho MG. Fractional inhibitory concentration index of combinations of antibacterial agents against cariogenic organisms. *J Dentistry* 2000; 28: 565-70.
12. Orth DS. Linear regression method for rapid determination of cosmetic preservative efficacy. *J Soc Cosmet Chem* 1979; 30: 321-32.
13. Sutton SVW, Porter D. Development of the antimicrobial effectiveness test as USP chapter <51>. *PDA J Pharm Sci Technol* 2002; 56: 300-11.
14. [AOAC] Association of Official Analytical Chemists. *AOAC Official Method 960.09 – Germicidal and detergent sanitizing action of disinfectants*. Official Methods of Analysis of AOAC International. 17th edition. Gaithersburg: AOAC International, 2000.
15. [AFNOR] Association Française de Normalisation. *Norme Européenne, Norme Française – NF EN 1040 – Antiseptiques et désinfectants chimiques; Activité bactericide de base – Méthode d'essai et prescriptions (phase 1)*. Paris: Association Française de Normalisation, 1997.
16. Cremieux A; Fleurette J. Methods of testing disinfectants. In: Block SS. *Desinfection, Sterilization and Preservation*. 4 ed. Philadelphia: Lea & Febiger; 1991. p. 1009-27.
17. *Farmacopéia Brasileira*. 4 ed. São Paulo: Atheneu Ed; 1988. p. v.5.1.6.-1-5
18. *United States Pharmacopeia*. 28 ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention; 2005. p. 1809-18.
19. McBain AJ, Bartolo RG, Catrenich CE, Charbonneau D, Ledder RG, Gilbert P. Effects of triclosan-containing rinse on the dynamics and antimicrobial susceptibility of in vitro plaque ecosystems. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 3531-8.
20. Meiller TF, Kelley JI, Jabra-Rizk MA, DePaola LG, Abdullahel Baqui AAM, Falkler WA. In vitro studies of the efficacy of antimicrobials against fungi. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001; 91: 663-70.
21. Giuliana G, Pizzo G, Milici ME, Musotto, GC, Giangreco R. In vitro antifungal properties of mouthrinses containing antimicrobial agents. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral radiol Endod* 1997; 68(8): 729-33.
22. Giuliana G, Pizzo G, Milici ME, Giangreco R. In vitro activities of antimicrobial agents against *Candida* species. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral radiol Endod* 1999; 87(1): 44-9.
23. Pan PH, Finnegan MB, Sturdivant L, Barnett ML. Comparative antimicrobial activity of an essential oil and an amine fluoride-stannous fluoride mouthrinse in vitro. *J Clin Periodontol* 1999; 26(7): 474-6.
24. Riep BG, Bernimoulin JP, Barnett ML. Comparative antiplaque effectiveness of an essential oil and an amine fluoride-stannous fluoride mouthrinse. *J Clin Periodontol* 1999; 26(3): 164-8.
25. Pitten FA, Kramer A. Antimicrobial efficacy of antiseptic mouthrinse solutions. *Eur J Clin Pharmacol* 1999; 55(2): 95-100.
26. Pitten FA, Kramer A. Efficacy of cetylpyridinium chloride used as oropharyngeal antiseptic. *Arzneimittelforschung* 2001; 51(7) 588-95.
27. Renton-Harper P, Addy M, Moran J, Doherty FM, Newcombe RG. A comparison of chlorhexidine, cetylpyridinium chloride, triclosan, and C31G mouthrinse products for plaque inhibition. *J Periodontol* 1996; 67(5) 486-9.
28. Monfrim RCP, Ribeiro MC. Avaliação in vitro de anti-sépticos orais sobre a microbiota da saliva. *Rev APCD* 2000; 54(5) 400-7.

Surto de intoxicação alimentar estafilocócica no município de Birigüi, São Paulo

Food-borne staphylococcal intoxication outbreak in Birigüi municipality, São Paulo State

RIALA6/1061

Aparecida de Fátima MICHELIN^{1*}, Luiz Simeão do CARMO², Iracilda Zeppone CARLOS³

* Endereço para correspondência: ¹Laboratório I DIR VI Araçatuba e Universidade Paulista – Campus Araçatuba, Rua Florêncio de Abreu, 185, 16.016-060 – Araçatuba/SP - igobi@uol.com.br

² Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.

³ Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP

Recebido: 18/08/2005 – Aceito para publicação: 29/06/2006

RESUMO

O presente trabalho descreve um surto de intoxicação alimentar ocorrido na cidade de Birigüi, São Paulo em 1998, que envolveu aproximadamente 1800 pessoas, sendo que dessas, cerca de 1200 eram crianças em idade escolar. Esses indivíduos alimentaram-se com a merenda escolar, servida nas escolas públicas do município, composta de arroz, feijão e farofa, esta contendo farinha de milho, farinha de mandioca, ervilha, milho em conserva, lingüiça tipo toscana e mortadela. *Staphylococcus* coagulase positiva e produtor de enterotoxina tipo A foi isolado da farofa, em população superior a $8,5 \times 10^7$ UFC/g. Esse achado indica que a farofa foi a fonte da contaminação bacteriana e responsável pela intoxicação alimentar.

Palavras-Chave. *S. aureus*, intoxicação alimentar, enterotoxina estafilocócica.

ABSTRACT

The present study describes a food-borne intoxication outbreak occurred in the municipality of Birigüi, São Paulo in 1998, which involved approximately 1,800 people, and among them nearly 1,200 were school age-children. These individuals had consumed the scholar meal, served at public schools of that city. This meal was constituted by the following foods: rice, beans and farofa. Farofa is made of corn or cassava flours toasted in butter or oil; and that one at issue was mixed with, canned peas, canned corn grain, Toscana sausage, and mortadela (large Italian sausage). Positive-coagulase enterotoxin-A producer *Staphylococcus* was isolated from farofa, and the bacterial populations was at $>8,5 \times 10^7$ CFU/g. This finding indicated that farofa was the source of food-borne staphylococcal intoxication.

Key Words. *S. aureus*, food-borne intoxication, staphylococcal enterotoxin.

INTRODUÇÃO

Os alimentos comumente associados com intoxicação alimentar estafilocócica são carnes, produtos cárneos, saladas contendo presunto, queijo e batata e produtos de padaria recheados com creme e produtos lácteos. Muitos desses produtos são contaminados durante a preparação, tendo como fonte de microrganismo o homem, o animal e o meio ambiente. A capacidade de desenvolvimento de enterotoxinas é maior em alimentos que estão expostos a temperaturas que permitem o crescimento de cepas de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicas¹.

Nos alimentos processados, onde ocorre destruição de *S. aureus* durante a defumação, o cozimento, a fermentação e pasteurização, a sua ocorrência indica, geralmente,

contaminação pós-processamento, proveniente da pele, boca e nariz dos manipuladores. Quando um número elevado de *S. aureus* é encontrado em alimentos processados, pode-se considerar também que a sanitização e o controle da temperatura, ou ambos, foram inadequados. Em alimentos crus, principalmente de origem animal, a presença de *S. aureus* é comum, uma vez que a fonte de estafilococos pode ser a pele, o pelo ou a pena de animais².

A quantidade de enterotoxinas estafilocócicas (SE) produzida, em alimentos ou culturas, difere em função do tipo que é secretado. A síntese de SEA, SED e SEE ocorre na fase logarítmica de crescimento, enquanto que SEB e SECs são produzidas no final da fase estacionária³.

As enterotoxinas estafilocócicas superantigênicas, consideradas protótipo dos superantígenos, são potentes

indutoras de citocinas e anticorpos, o que tem permitido uma compreensão dos eventos patológicos presentes na intoxicação de origem alimentar³. Spiekermann & Nagler-Anderson⁴ mostraram que os sintomas observados nos episódios de toxinfecção alimentar são resultantes da ação da enterotoxina estafilocócica, disseminada por via sanguínea, sobre as células T dos tecidos linfóides periféricos encontrados no intestino.

As intoxicações alimentares de origem estafilocócica são causadas principalmente pelas linhagens produtoras de coagulase⁵. Dentre essas, a espécie *S. aureus* é a mais comumente envolvida, sendo que um surto causado por *Staphylococcus intermedius* foi reportado por Khambaty et al.⁶. Contudo, também na literatura são relatados surtos causados por espécies coagulase-negativas e que são produtoras de enterotoxinas⁷.

A potencial intoxicação estafilocócica não pode ser atribuída sem que se teste a enterotoxigenicidade da cepa de *S. aureus* isolada e/ou se demonstre a presença da enterotoxina estafilocócica pré-formada no alimento. A ausência de *S. aureus* e nem mesmo a sua presença em pequeno número é garantia de que o alimento é seguro, pois condições desfavoráveis para a sobrevivência desse microrganismo podem resultar em uma diminuição de sua população ou morte da célula microbiana, mas se quantidades suficientes de enterotoxina já tiverem sido formadas, elas permanecem para induzir um quadro de intoxicação alimentar estafilocócica².

O presente estudo tem o objetivo de verificar a presença de estafilococos enterotoxigênicos nos alimentos envolvidos em um surto de intoxicação alimentar ocorrido no município de Birigüi, SP.

MATERIAL E MÉTODOS

Descrição do Surto

Em novembro de 1998, ocorreu um surto de intoxicação alimentar no município de Birigüi, Estado de São Paulo, envolvendo cerca de 1800 pessoas. Desse total, 1200 eram crianças em idade escolar, freqüentadoras das pré-escolas e escolas de ensino fundamental, no período vespertino. A alimentação servida, também denominada merenda escolar, foi preparada na cozinha piloto municipal e enviada para as escolas, sem refrigeração, através de peruas fechados. A merenda escolar servida era composta de arroz, feijão e farofa contendo farinha de mandioca e de milho, ervilha e milho verde em conserva e ainda embutidos como mortadela e lingüiça tipo toscana. A ingestão da referida merenda ocorreu por volta das quinze horas e os sintomas típicos de intoxicação alimentar, como náusea, vômito, cólica abdominal e diarreia se manifestaram entre 30 e 90 minutos após a ingestão dos alimentos.

Cerca de 90% dos indivíduos acometidos dirigiram-se aos três serviços de Pronto Atendimento existentes na cidade: Pronto Socorro Municipal, Pronto Atendimento da UNIMED e Pronto Socorro da Santa Casa de Misericórdia, sendo que cerca de 5% foram encaminhados para internação na Santa Casa de Misericórdia, onde permaneceram em observação até o dia seguinte quando receberam alta hospitalar.

Composição das Amostras para a Análise

As equipes técnicas das vigilâncias sanitárias, estadual e municipal, conjuntamente, coletaram amostras dos alimentos preparados (arroz, feijão e farofa), presentes nas escolas onde foi servida a alimentação e também na cozinha piloto, sendo que nesta, foram coletados também os ingredientes da farofa (farinha de mandioca e milho, ervilha e milho em conserva, mortadela picada e lingüiça tipo toscana). As amostras coletadas foram encaminhadas em caixa térmica com gelo reciclável para o Laboratório de Saúde Pública da Direção Regional de Araçatuba, vinculado tecnicamente ao Instituto Adolfo Lutz, onde foram conservados sob refrigeração até o início das análises bacteriológicas.

Análise Bacteriológica

Pesquisa de *Staphylococcus*²

Em frascos contendo 225 ml de água peptonada a 0,1% (Difco) tamponada, estéreis, foram adicionados 25g de cada um dos alimentos e ingredientes citados. Após homogeneização foram preparadas sucessivas diluições decimais e em seguida 0,1 ml de cada diluição foi semeado em placas de ágar Baird-Parker (Sanofi) que foram incubadas por 24 horas a 37°C em estufa bacteriológica (WTB Binder).

As colônias foram contadas e algumas dessas transferidas para tubos com agar nutriente (Difco) incubados por 24 horas a 37°C e após esse período reservados para futuros testes.

Caracterização bioquímica das colônias isoladas

Pesquisa da enzima coagulase⁸

O conteúdo parcial do crescimento bacteriano de cada tubo com agar nutriente foi transferido para tubos contendo caldo BHI (Difco) e incubados por 24 horas a 37°C e após realizado o teste da coagulase utilizando plasma de coelho.

Pesquisa de enterotoxina estafilocócica

A pesquisa de enterotoxina estafilocócica A, B e C foi realizada no Instituto Adolfo Lutz Central, na cidade de São Paulo. As cepas isoladas foram enviadas em tubo contendo ágar nutriente. A técnica empregada foi a aglutinação do látex reversa e passiva (RPLA) (Oxoid).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em todas as amostras de alimentos servidos na merenda escolar, bem como dos ingredientes que fizeram parte da composição da farofa, foi realizada a pesquisa de estafilococos. A amostra de farofa proveniente das escolas apresentou uma população de estafilococos de $2,5 \times 10^8$ UFC/g e naquela proveniente da cozinha piloto a população foi de $8,5 \times 10^7$ UFC/g. A análise de todos os ingredientes que entraram na composição da farofa, bem como do arroz e feijão cozidos também servidos na merenda escolar revelaram uma população de estafilococos inferior a 10^2 UFC/g.

As culturas de alimentos que apresentaram uma população bacteriana superior a 10^2 UFC/g, conforme portaria

Nº 451 de 19/09/1997 do Ministério da Saúde, em vigor no ano de 1998, tiveram colônias submetidas à pesquisa da enzima coagulase e à capacidade de produzir enterotoxina. Observou-se que tanto as colônias provenientes das amostras de farofa coletadas nas escolas, como daquelas coletadas na cozinha piloto, foram capazes de produzir coagulase e enterotoxina estafilocócica A.

A presença de *Staphylococcus* coagulase positiva também foi verificada em outros surtos de intoxicação alimentar e em avaliações do perfil microbiológico de alguns alimentos. A investigação de um surto de intoxicação alimentar envolvendo queijo tipo Minas frescal, em Pará de Minas, no estado de Minas Gerais, mostrou que *S. aureus* coagulase positiva, juntamente com *Salmonella* e coliformes fecais, foram a causa do referido surto¹⁰. Também no estudo da qualidade microbiológica dos alimentos de restaurantes tipo self-service da cidade de Teresina, no estado do Piauí, foi verificado que 49,20% das amostras analisadas estavam contaminadas e, dentre estas, 1,78% apresentavam contaminação por *Staphylococcus* coagulase positiva¹¹.

A presença de cepa de estafilococos produtora de enterotoxina A está de acordo com outros estudos realizados para a elucidação de surtos de intoxicação alimentar. A investigação de 18 surtos de intoxicação alimentar na cidade de Belo Horizonte, estado de Minas Gerais, apontou a presença de linhagens de *Staphylococcus* enterotoxigênicos em 14 dos isolamentos efetuados, sendo que as enterotoxinas A e B foram identificadas concomitantemente em 12 deles¹². Posteriormente, a investigação de 8 surtos de intoxicação alimentar na mesma cidade, revelou que em todos os surtos onde se isolou *Staphylococcus*, estes eram produtores de enterotoxina estafilocócica A sendo que, alguns produziam também enterotoxina tipo B e outros, tipo C¹³. A enterotoxina estafilocócica A também foi detectada em alimentos lácteos em um surto de intoxicação alimentar ocorrido no Japão, envolvendo cerca 13.420 casos¹⁴.

A pesquisa de enterotoxina estafilocócica em cepas de estafilococos coagulase-positiva e *S. aureus*, foi realizado na Itália, envolvendo alimentos comercializados e amostras de superfícies utilizadas na preparação de alimentos industrializados. Esse estudo revelou que 17,3% das amostras foram positivas para estafilococos coagulase positiva e que a presença de enterotoxinas A estava presente em cerca de 50% das amostras identificadas como *S. aureus*¹⁵. Tais resultados mostram que as condições de preparo dos alimentos nem sempre são satisfatórias e que as superfícies envolvidas nesse processo podem constituir fonte de contaminação.

A frequência de *Staphylococcus* nos estudos elucidativos de surtos de intoxicação alimentar, bem como a presença desse microrganismo nas avaliações microbiológicas dos alimentos e das condições higiênicas e sanitárias dos estabelecimentos do setor alimentício, sugerem que os manipuladores de alimentos constituem uma potencial fonte de contaminação microbiana, em especial de *Staphylococcus* enterotoxigênicos^{16,17,18}.

A presença de elevada população estafilocócica nas amostras de farofa supõe que as condições higiênicas do estabelecimento responsável pela preparação da merenda escolar são insatisfatórias e que as normas sanitárias para o preparo de alimentos foram negligenciadas. Também indicam que os estafilococos enterotoxigênicos sejam de origem humana, possivelmente dos manipuladores de alimentos, infectados e ou colonizados por *Staphylococcus* sp, uma vez que a análise de todos os ingredientes que entraram na composição da farofa apresentou níveis populacionais de estafilococos baixos (< 10² UFC/g). No tocante à temperatura, possivelmente, durante o preparo da farofa foi empregado aquecimento inferior a 60°C, temperatura mínima requerida para inviabilizar a célula de estafilococos²; já que o arroz e o feijão, que requerem temperaturas superiores para o seu preparo, apresentaram população bacteriana inferior a 10² UFC/g.

O aquecimento dos alimentos é uma medida capaz de diminuir a população estafilocócica presente, contudo deve-se considerar que para os alimentos preparados em grande quantidade o tratamento térmico pode não atingir todo o volume e permitir assim a sobrevivência de algumas células. Deve-se também levar em conta que as enterotoxinas estafilocócicas são termoestáveis e que uma vez presentes nos alimentos não serão inativadas nas temperaturas normalmente atingidas durante o aquecimento¹⁹.

A análise microbiológica dos alimentos envolvidos em surtos de intoxicação alimentar, juntamente com avaliações sanitárias e epidemiológicas, são ferramentas indispensáveis para elucidar a origem e as condições que possibilitaram a veiculação dos microrganismos e seus produtos. Desta forma o estudo do presente surto apresenta relevante importância para a saúde pública mostrando a necessidade da implantação de práticas que garantam a qualidade dos alimentos produzidos.

Assim, pode-se verificar que o surto de intoxicação alimentar foi causado pela ingestão da farofa contaminada por estafilococos coagulase positiva produtor de enterotoxina do tipo A, provavelmente proveniente de fonte humana, e que medidas corretivas e preventivas devem ser imediatamente implantadas na cozinha piloto visando garantir a qualidade sanitária dos alimentos produzidos e servidos para a população escolar.

AGRADECIMENTO

Os autores agradecem a Dr^a. Miyoko Jakabi do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo pelo apoio técnico na identificação da enterotoxina estafilocócica.

REFERÊNCIA

1. Bergdoll MS. *Staphylococcus aureus*. In: Doyle M P (Ed). *Foodborne Bacterial products*. Marcel Dekker, Inc., New York, NY, USA, 1989; 463-523.

2. Lancette GA, Tatini SR. *Staphylococcus aureus*. In: Vanderzant C, Splittstoesser DF. (Ed.). Compendium of methods for the microbiological examination of foods, 3th ed. Washington, D.C: American Public Health Association, 1992, p. 533-550.
3. Micusan VV, Thibodeau J. Superantigens of microbial origin. *Immunol* 1993; 5: 3-11.
4. Spiekermann GM, Nagler-Anderson C. Oral administration of the bacterial superantigen staphylococcal enterotoxin B induces activation and cytokine production by the T cells in murine gut-associated lymphoid tissue. *J Immunol* 1998; 161(11): 5825-31.
5. Bergdoll MS, Reiser R. Application of radio – immunoassay for detection of staphylococcal enterotoxins in foods. *J Food Prot* 1980; 43: 68-72.
6. Khambaty FM, Bennett, RW, Shah DB. Application of pulsed field gel electrophoresis to the epidemiological characterization of *Staphylococcus intermedius* implicated in a food-related outbreak. *Epidemiol Infect* 1994; 113(1): 75-81.
7. Pereira KS, Pereira JL. Estafilococos coagulase negativa: potenciais patógenos em alimentos. *Rev Hig Aliment* 2005; 19: 32-4.
8. Sperber WH, Tatini SR. Interpretation of the tube coagulase test for identification of *Staphylococcus aureus*. *Appl Microbiol* 1992; 29: 502-5.
9. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos – DINAL. Padrões microbiológicos para produtos expostos à venda ou de alguma forma destinados ao consumo. Portaria n° 451 de 19 de setembro de 1997. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, DF, Seção 1, 22 set 1997, p.21005-12.
10. Cerqueira MMOP, Souza MR, Fonseca LM, Rodrigues R, Rubinich J. Surto epidêmico de toxinfecção alimentar envolvendo queijo tipo Minas Frescal em Pará de Minas. *Arq Bras Med Vet Zootec* 1994; 46: 723-8.
11. Nunes IFS, Ferreira GP, Albuquerque WF. Perfil microbiológico dos microorganismos causadores de DTAs em restaurantes self-services na cidade de Teresina – PI. *Hig Aliment* 2002; 16: 59-62.
12. Carmo LS, Bergdoll MS. Staphylococcal food poisoning in Belo Horizonte (Brazil). *Microbiol Rev* 1990; 21: 320-3.
13. Carmo LS, Dias RS, Anunciação LLC, Bergdoll MS. Staphylococcal food poisoning in Minas Gerais State, Brazil. *Arc Bras Med Vet Zootec* 1995; 47: 113-22.
14. Asao T, Kumeda Y, Kawai T, Shibata T, Oda H, Haruki K, Nakazawa H, Kozaki S. An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low fat milk in Japan: estimation of enterotoxin a in the incriminated milk and powdered skim milk. *Epidemiol Infect* 2003; 130: 33-40.
15. Normanno G, Firinu A, Virgilio S, Mula G, Dambrosio A, Poggiu A, Decastelli L, Mioni R, Scuota S, Bolzoni G, Di Giannatale E, Salinetti AP, La Salandra G, Bartoli M, Zuccon F, Pirino T, Sias S, Parisi A, Quaglia NC, Celano GV. Coagulase-positive Staphylococci and *Staphylococcus aureus* in food products marketed in Italy. *Int J Food Microbiol* 2005; 98: 73-9.
16. Carmo LS, Dias RS, Linardi VR, Sena MJ, Santos DA. An outbreak of staphylococcal food poisoning in the Municipality of Passos, MG, Brazil. *Braz Arch Biol Technol* 2003; 46: 581-6.
17. Vanzo SP, Azevedo RVP. Detecção de *S. aureus* em manipuladores de alimentos: perfil de resistência a antibióticos e quimioterápicos. *Hig Aliment* 2003; 17: 114-23.
18. Ombui JN, Arimi SM, Kayihura M. Beef and dressed chickens as sources of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in Nairobi. *East Afr Med J* 1992; 69: 606-8.
19. Bergdoll MS. Analytical Methods for staphylococcus aureus. *Int J F Microbiol* 1990; 10: 91-9.

Aspectos morfológicos e morfométricos do cérebro de ratos na intoxicação crônica pelo organofosforado metamidofós

Morphological and morphometric aspects of rats brain in chronic organophosphate intoxication

RIALA6/1062

Nilda M. PEREZ¹, *Edenilson E. CALORE^{1,2}, Liz VILELA-DE-ALMEIDA¹, Emerson S. NARCISO³, Flávio R. PUGA³.

* Endereço para correspondência: ¹Seção de Patologia, Instituto Emílio Ribas - São Paulo, Brasil, Av. Dr. Arnaldo, 165 - CEP 01246-900 - São Paulo/SP, Brasil. FAX: (055)(011) 3721-2467 e-mail: ecalore@terra.com.br

² Departamento de Fisiopatologia Experimental, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

³ Departamento de Toxicologia, Instituto Biológico de São Paulo, São Paulo, Brasil.

Recebido: 15/09/2005 – Aceito para publicação: 22/03/2006

RESUMO

Foram descritos distúrbios neurológicos sutis após intoxicação por organofosforados. Estudos experimentais relataram necrose de neurônios, particularmente nos animais que apresentaram convulsões. O objetivo do presente trabalho foi investigar se ratos (que não tenham apresentado convulsões) expostos a um agente organofosforado, apresentaram alterações morfológicas em regiões específicas do cérebro. Os animais receberam 2.5 ou 5.0 mg/kg peso de metamidofos, uma vez por semana, por dois meses e foram decapitados dois meses e sete dias após a primeira administração da droga. Foi observada atrofia da camada molecular do córtex parietal sem perda neural em regiões específicas do cérebro. Isto pode ser devido a atrofia ou à perda de ramificações neurais mas sem perda de corpos neuronais.

Palavras-Chave. cérebro, morfometria, organofosforado, inibidores de colinesterase, excitotoxicidade.

ABSTRACT

Subtle neurological disturbs are described in organophosphorus intoxication. Experimental studies have reported neuronal necrosis particularly in animals that present seizures. The objective of the present work was to investigate if rats (without seizures) exposed to an organophosphate agent, would have morphological changes of specific regions of the brain. The animals received 2,5 or 5,0 mg/kg of methamidophos, once a week, for 2 months and were decapitated after 2 months and 7 days of drug administration. We have observed atrophy of the molecular layer of the parietal cortex without neuronal loss in specific cerebral regions. This would be due to atrophy or loss of neuronal ramifications but without neuronal loss.

Key Words. brain, morphometry, organophosphate, cholinesterase inhibitors, excitotoxicity.

INTRODUÇÃO

A intoxicação aguda por organofosforados tem grande importância epidemiológica para seres humanos e animais^{1,2,3}. Os principais sintomas destas intoxicações são decorrentes da hiperestimulação do sistema nervoso autônomo parassimpático resultando no que se denomina Síndrome Colinérgica Aguda por organofosforados. Entre estes sintomas se destacam um grande aumento na secreção brônquica, broncoespasmo, bradicardia, alteração nos níveis pressóricos e também, convulsão, coma e paralisia do centro respiratório. Além disso, descreve-se uma Síndrome da Neurotoxicidade Intermediária (Síndrome Intermediária) também relacionada à intoxicação por organofosforados. Os sintomas da síndrome intermediária são relacionados à fraqueza dos músculos inervados pelos nervos

craniais e são observados de 24 a 96 horas após a Síndrome Colinérgica Aguda. A Síndrome da Neurotoxicidade retardada relacionada aos organofosforados (OPIDN) é caracterizada por polineuropatia motora distal, surgindo de 1 a 3 semanas após a exposição a alguns compostos organofosforados. As manifestações clínicas são fraqueza muscular, seguida de espasticidade, hiperreflexia, clonus, reflexos anormais e sinais de liberação piramidal^{4,5}. O mecanismo de indução da OPIDN parece estar associado à inibição de uma enzima, a carboxil-esterase neuronal não específica (neurophatic target esterase - NTE). Acredita-se que a NTE desempenha um importante papel no metabolismo de lípidios neuronais^{6,7}.

Seqüelas neurológicas da intoxicação por organofosforados também foram descritas, incluindo disfunção neuropsicológica⁸. Há evidências que os pacientes cronicamente

expostos podem desenvolver distúrbios comportamentais como depressão e déficits de atenção⁹. Parron¹⁰ et al sugeriram que há um aumento do risco de suicídio entre pessoas expostas aos inseticidas quando comparado a outras pessoas com características socioeconômicas e demográficas semelhantes. Estudos experimentais demonstraram efeitos neurocomportamentais em ratos como a diminuição da atividade locomotora e exploratória¹¹.

Como o ser humano pode ser exposto aos organofosforados por longos períodos, particularmente os trabalhadores rurais sem proteção adequada, o objetivo do presente trabalho foi investigar em um modelo experimental, se ratos (que não tenham apresentado convulsões ou sinais de hipóxia) expostos à baixas doses de um agente organofosforado, podem exibir alterações morfológicas em regiões específicas do cérebro.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados dezoito ratos machos albinos adultos da linhagem Wistar, pesando em média 280g. Os grupos experimentais receberam o organofosforado O, S-dimetilfosforoamidotionato (metamidofós). A DL50 oral desta substância para ratos foi previamente determinada (18 mg/kg peso). Os animais tiveram livre acesso à ração comercial e à água até 12 horas antes da administração do metamidofós (jejum noturno). Na manhã seguinte, 2 grupos de 6 animais receberam por via gástrica, respectivamente 2,5mg/kg peso (G2,5) e 5,0mg/kg peso (G5,0) de metamidofós uma vez por semana por dois meses. Um grupo controle de 6 animais recebeu o glicerofórmol por via gástrica pelo mesmo período de administração. Os sintomas de intoxicação, assim como a ocorrência de possíveis convulsões, foram observados durante 12 horas após cada administração. Os animais foram decapitados uma semana após a última administração do composto.

Os encéfalos foram dissecados e seccionados transversalmente na porção central (correspondendo ao sulco central). As amostras foram fixadas em paraformaldeído 4% e incluídas em parafina. Foram realizados 20 cortes seriados do cérebro (8 ¼m de espessura) em direção à região occipital. Os cortes foram submetidos à coloração pela hematoxilina eosina ou cresil-violeta e visualizadas ao microscópio óptico.

Morfometria: foram realizados estudos morfométricos por microscopia óptica em áreas específicas do cérebro (camada piramidal interna, camada piramidal externa do córtex cerebral e núcleo caudado).

Contagem dos neurônios: 10 imagens de cada área acima especificada foram fotografadas com aumento de 40x, usando uma câmera digital adaptada à um microscópio óptico e à um sistema digital de análise de imagens. A contagem dos neurônios foi realizada manualmente. Os neurônios foram identificados pela visualização direta por microscopia óptica. Somente os neurônios piramidais característicos (com os nucléolos claramente visíveis) foram contados nas camadas piramidal

cortical interna e externa. Somente os grandes neurônios do núcleo caudado foram contados. As células parcialmente representadas (não claramente identificadas) foram excluídas da contagem.

Espessura da camada molecular: Foi determinada a espessura da camada molecular do córtex parietal. Para a reprodutibilidade dos dados foi considerado em cada corte seriado, à área de menor espessura à um campo microscópico (40x) lateralmente ao sulco sagital superior, nos mesmos cortes seriados acima descritos. As imagens foram obtidas com objetiva 40x, e com a ajuda de um sistema de análise de imagens, foram obtidas as medidas da espessura cortical, traçando-se uma linha perpendicular que se iniciava no limite entre a camada molecular e a camada piramidal terminando na superfície do córtex (20 cortes de cada animal de cada grupo). A área analisada é formada principalmente por ramificações neurais.

Os dados foram submetidos à análise estatística usando o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis (consideramos o nível de significância de 0,05).

RESULTADOS

Os animais do grupo intoxicado com 5 mg/kg peso durante 2 meses apresentaram sintomas moderados como tremores e fasciculação no período seguinte à primeira administração. Dois animais deste grupo apresentaram convulsões e foram excluídos do estudo. Nas administrações seguintes os animais não apresentaram nenhum sintoma. Os animais do grupo G2,5 não apresentaram nenhum sintoma de intoxicação. Pela análise qualitativa por microscopia óptica não foi observada necrose ou perda neuronal no grupo tratado e não foi observada diferença entre grupos tratado e controle.

Análise morfométrica.

As médias e o desvio padrão da contagem neuronal na camada piramidal interna no grupo controle foram 24.067 ± 3.826 , no grupo G2,5 foram 26.000 ± 4.472 e no grupo G5,0 foram 23.567 ± 4.018 . Não houve diferença significativa entre estes grupos ($p > 0,05$).

As médias e o desvio padrão da contagem neuronal na camada piramidal externa no grupo controle foram 24.317 ± 5.199 , no grupo G2,5 foram 26.500 ± 4.020 e no grupo G5,0 foram 22.767 ± 4.485 . Não houve diferença significativa entre estes grupos ($p > 0,05$).

As médias e o desvio padrão da contagem neuronal no núcleo caudado no grupo controle foram 25.850 ± 5.725 , no grupo G2,5 foram 23.400 ± 4.005 e no grupo G5,0 foram 26.050 ± 5.143 . Não houve diferença significativa entre estes grupos ($p > 0,05$) (tabela 1).

As médias e o desvio padrão da espessura da camada molecular foram $127.214 \pm 19.187 \mu\text{m}$ no grupo controle, 123.495 ± 12.497 no grupo G2,5 e 114.473 ± 14.429 no grupo G5,0. Embora tenhamos observado uma tendência à diminuição da espessura da camada molecular no grupo que recebeu 2.5

mg/kg de metamidofós, não foi observada diferença estatística significativa entre este grupo e o grupo controle ($p > 0,05$). Entretanto, pela análise estatística, a camada molecular do grupo G5,0 era mais delgada comparada ao grupo controle ($p < 0,001$) e ao grupo G2,5 ($p < 0,05$) (KW=28888) (tabela 2).

DISCUSSÃO

Alguns estudos experimentais relatam necrose neuronal no hipocampo, no córtex entorinal e frontal, no complexo amigdaloide, no núcleo caudado e no tálamo frontal pela intoxicação aguda por organofosforados^{12,13,14,15,16}. Como foram observadas convulsões ou insuficiência respiratória em praticamente todos os animais destes estudos, é provável que outros fatores como a anoxia sejam responsáveis por estas mudanças morfológicas.

Estudos em animais que sofreram intoxicação aguda por organofosforados e que não tenham apresentado convulsões são escassos, tendo sido observadas apenas lesões morfológicas mínimas, por exemplo, degeneração da mielina nas raízes dorsal e ventral do nervo espinal, após administração de triclorfonio¹⁷.

Nossos estudos, no entanto, indicam que a administração repetitiva (crônica) do agente anticolinesterásico metamidofós em doses subletais (menos de 1/3 de DL50), produziu afilamento da camada molecular do córtex parietal, o que foi demonstrado por estudos morfométricos. Entretanto, esta alteração não é acompanhada por perda neuronal das camadas piramidal interna e externa, e do núcleo caudado. Devido ao fato da camada molecular ser constituída basicamente por ramificações dendríticas e axonais dos neurônios, nós podemos concluir que em doses baixas e repetitivas, este organofosforado (metamidofós) possivelmente induza à perda ou afilamento de ramificações neuronais. Uma hipótese para explicar essas lesões cerebrais após a administração de compostos organofosforados seria a liberação excessiva de neurotransmissores, similar ao que acontece na excitotoxicidade por glutamato no estado de mal epilético. Esta hipótese é sustentada por Lallement¹⁸ et al que descreveram o efeito protetor de Gk-11, composto antiglutamatérgico, na intoxicação experimental pelo organofosforado soman.

Mesmo a exposição à doses subletais de organofosforados pode induzir efeitos neurotóxicos nos animais¹⁹. Ahlbom²⁰ et al observaram a diminuição da densidade dos receptores colinérgicos muscarínicos nos cérebros dos ratos expostos ao composto disopropilfluorofosfato (DFP). Entretanto, algumas evidências sugerem que os efeitos neurológicos observados após a administração de organofosforados seriam não somente devido à hiperatividade ou às convulsões “colinérgicas”. A disponibilidade de outros neurotransmissores podem estar alteradas, em consequência do excesso de atividade colinérgica. Esta liberação seria responsável, pelo menos em parte, pelas seqüelas neurológicas.

EL Etri²¹ et al, observaram uma diminuição dos níveis de norepinefrina nos ratos que apresentaram convulsões após uma única administração do composto organofosforado soman. Embora os níveis de dopamina e de serotonina não tenham se modificado nestes animais, os níveis de ácido 5-hidroxiindolacético (um metabolito da serotonina), e ácido 3,4-dihidroxifenilacético e ácido homovanílico (metabolito da dopamina) foram alterados, indicando um aumento de “turnovers” de dopamina e de serotonina. De acordo com estes autores, estes resultados sugerem que a mudança dos níveis de norepinefrina podem ter um papel importante na indução das convulsões após intoxicação por organofosforados. É importante indicar que o estado de mal epilético de qualquer etiologia pode induzir a perda neuronal no sistema nervoso central,

Tabela 1. Contagem neuronal em áreas cerebrais específicas.

Áreas Cerebrais	Contagem de Neurônios	Análise de variação
Camada piramidal interna	Controle	24.067 ± 3.826
	2,5 mg/kg	26.000 ± 4.472 NS ($p > 0,05$)
	5,0 mg/kg	23.567 ± 4.018 NS ($p > 0,05$)
Camada piramidal externa	Controle	24.317 ± 5.199
	2,5 mg/kg	26.500 ± 4.020 NS ($p > 0,05$)
	5,0 mg/kg	22.767 ± 4.485 NS ($p > 0,05$)
Núcleo basal	Controle	25.850 ± 5.725
	2,5 mg/kg	23.400 ± 4.005 NS ($p > 0,05$)
	5,0 mg/kg	26.050 ± 5.143 NS ($p > 0,05$)

S = significante; NS = não significante.

Foram obtidas 10 imagens de cada área específica (camada piramidal interna, camada piramidal externa do córtex cerebral e o núcleo caudado) em cada secção seriada. Os neurônios foram identificados em visualização direta por microscopia óptica. Somente os neurônios piramidais característicos (com nucléolo claramente visível) foram contados nas camadas piramidal cortical interna e externa. Somente os grandes neurônios do núcleo caudado foram contados. Não houve diferença significativa da contagem neuronal na camada piramidal interna, na camada piramidal externa e no núcleo caudado ($p > 0,05$).

Tabela 2. Espessura da camada molecular do cortex parietal.

Grupos	Espessura da camada molecular	Comparação estatística com controle
Controle	127.214 ± 19.187	
2,5 mg/kg	123.495 ± 12.497	NS ($p > 0,05$)
5,0 mg/kg	114.473 ± 14.429	S ($p < 0,001$)

S = significante; NS = não significante.

A camada molecular do grupo que recebeu 5.0 mg/kg (G5,0) de metamidofós era mais delgada comparada ao grupo de controle ($p < 0,001$) e ao grupo que recebeu 2.5 mg/kg ($p < 0,05$) (KW=28888).

particularmente no hipocampo. Estas lesões são relacionadas à liberação excessiva de neurotransmissores estimuladores como o glutamato^{22,23}.

Outras alterações metabólicas devido a intoxicação por organofosforados descritas previamente como a diminuição dos níveis cerebrais de glicose e o aumento da atividade da fosforilase do glicogenio, descrita por Sarin & Gill²⁴ não explicam as mudanças nos padrões neurocomportamentais dos animais nem as alterações morfológicas descritas. Seria difícil relacionar as alterações morfológicas que nós descrevemos no presente trabalho com sintomas clínicos específicos descritos após intoxicação por organofosforados. Entretanto, acreditamos que estas mudanças morfológicas sejam ainda mais disseminadas, afetando outras regiões cerebrais.

REFERÊNCIAS

1. Tafuri J, Roberts J. Organophosphate poisoning. *Ann Emerg Med* 1987; 16: 193-202.
2. Ecobichon DJ. Toxic effects of pesticides. In Casarett And Doull's Toxicology: The basic science of Poisons (C.D. Klaassen. Ed.) 5th ed., McGraw-Hill, New York. 643-89, 1996.
3. Burn JD, Leighton FA. Further studies of brain cholinesterase: cholinergic receptor ratios in the diagnosis of acute lethal poisoning of birds by anticholinesterase pesticides. *J Wildlife Diseases* 1996; 32: 216-24.
4. Cavanagh JB. The toxic effects of tri-ortho-cresyl phosphate on nervous system, an experimental study in hen. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 1954; 17: 163-72.
5. Sprague GL, Bickford AA. Effect of multiple diisopropylfluorophosphate injections in hens: behavioral and histological investigation. *J Toxicol Environ Health* 1981; 8: 973-88.
6. Johnson MK. Organophosphates and delayed neuropathy - Its NTE alive and well? *Toxicol Appl. Pharmacol* 1990; 102: 385-99.
7. Lotti M. The pathogenesis of organophosphate polyneuropathy. *Crit. Rev Toxicol* 1992; 21: 465-87.
8. Rosenstock L, Keifer M, Daniell WE, mc Monnell R, Claypoole K. The Pesticide health Effects Study Group. Chronic central nervous system effects of acute organophosphate pesticide intoxication. *Lancet* 1991; 338: 223-37.
9. Levin HS, Rodnitzky RL. Behavioral effects of organophosphate in man. *Clin Toxicol* 1976; 9(3): 391-403.
10. Parrón T, Hernández FA, Villanueva E. Increased risk of suicide with exposure to pesticides in an intensive agricultural area. A 12-year retrospective study. *Forensic Sci Int*, May 1996; 79: 53-63.
11. Socko R, Gralewicz S, Gorny R. Long-term behavioural effects of a repeated exposure to chlorphenvinphos in rats. *Int J Occupational Med Environmental Health* 1999; 12: 105-17.
12. Lemerrier G, Carpentier H, Sentenac-Roumanou Morlis P. Histological and Histochemical Changes in the Central Nervous System of the Rat Poisoned by an Irreversible Anticholinesterase Organophosphorus Compound. *Acta Neuropathol* 1983; 61: 123-9.
13. Petras JM. Brain pathology induced by organophosphate poisoning with the nerve agent soman. *Medical Defense Bioscience Review, United States Army Medical research Institute of Chemical Defense* 1884; 407-14.
14. Wall HG, Jaax NK, Hayward IJ. Brain lesions in rhesus monkeys after acute soman intoxication. *Medical Defense Bioscience Review, United States Army Medical research Institute Of Chemical Defense, Aberdeen Proving Ground, MD* 1987, 155-62.
15. Baze WB. Soman-induced morphological changes: an over view in the non-human primate. *J. Applied Toxicol* 1993; 13: 173-7.
16. Britt JO, Martin JL, Okerberg CV, Dick EJ. Histopathologic Changes in the Brain, Heart and Skeletal Muscle of Rhesus Macaques, Ten days after Exposure to Soman (na Organophosphorus Nerve Agent). *Comparative Medicine* 2000; 50:133-9.
17. Sheets, L.P., Hamilton, B.F., Sangha, G.K., Thyssen JH. Subchronic Neurotoxicity Screening Studies with Six Organophosphate Insecticides: An Assessment of Behaviour and Morphology Relative to Cholinesterase Inhibition. *Fundamental and Applied Toxicol* 1997, 35: 101-19.
18. Lallement GD, Clarencon D, Masqueliez D. Nerve agent poisoning in primates: antilethal, anti-epileptic and neuroprotective effects of GK-11. *Arch Toxicol* 1998; 72: 84-92.
19. Kassa J, Koupilová M, Herink J, Vachek J. The long term influence of low-level sarin exposure on behavioral and neurophysiological functions in rats. *Acta Medica* 2001; 44(1): 21-7.
20. Ahlbom J, Fredriksson A, Eriksson P. Exposure to na organophosphate (DFP) during a defined period in neonatal life induces permanent changes in brain muscarinic receptors and behaviour in adult mice. *Brain Research* 1995; 677: 13-9.
21. El Etri MM, Nickell WT, Ennis M, Skau KA, Shipley MT. Brain norepinephrine reductions in soman-intoxicated rats: association with convulsions and AchE inhibition, time course, and relation to other monoamines. *Exp Neurol* 1992; 118(2):153-63.
22. Olney JW. Excitatory amino acids and neuropsychiatric disorders. *Biol Psychiatric* 1989; 26: 505-25.
23. Scorza FA, Arida RM, Priel MR, Calderazo L, Cavalheiro EA. Glucose utilization during status epilepticus in an epilepsy model induced by pilocarpine. *Arq Neuropsiquiatr* 2002; 60: 198-203.
24. Sarin S, Gill KD. Dichlorvos induced alterations in glucose homeostasis: Possible implications on the state of neuronal function rats. *Mol Cell Biochemistry* 1999; 199: 87-92.

Neisseria meningitidis serogroup C polysaccharide production by varying the bacteria inoculum and the initial glucose concentration

Produção de polissacarídeo de *Neisseria meningitidis* sorogrupo C variando o inóculo e a concentração inicial de glicose

RIALA6/1063

Luciana Juncioni de ARAUZ^{1*}, Júlia BARUQUE-RAMOS², Haroldo HISS³, Rose Leila MOTA³, Maria Esther RICCI-SILVA³, Isaías RAW³

* Endereço para correspondência: ¹Instituto Adolfo Lutz, Seção de Meios de Cultura, Av. Dr. Arnaldo, 355, CEP 01246-902, São Paulo, SP. E-mail: ljarauz@ial.sp.gov.br

² Universidade de São Paulo (ECHA – USP), Av. Arlindo Bettio, 1000 - CEP 03828-000, São Paulo, SP.

³ Instituto Butantan, Centro de Biotecnologia, Av. Dr. Vital Brazil, 1500 - CEP 05503-900, São Paulo, SP.

Recebido: 01/02/2006 – Aceito para publicação: 08/05/2006

RESUMO

A produção de polissacarídeo para a produção de vacina específica contra *N. meningitidis* sorogrupo C é o principal produto obtido dos cultivos deste microorganismo. Para uma análise comparativa da produção de polissacarídeo variando as quantidades de inóculo e as concentrações iniciais de glicose, realizaram-se quatro ensaios, empregando planejamento fatorial 2², em duplicata. As amostras foram retiradas a cada duas horas para a determinação da concentração celular, pH, glicose e concentração de polissacarídeo. O critério analítico foi baseado na concentração final de polissacarídeo e no fator de conversão célula/polissacarídeo ($Y_{p/x}$). Os melhores resultados de concentração final de polissacarídeo (0,105 g/L) e $Y_{p/x}$ (0,078) ocorreram na condição de cultivo com maior inóculo (densidade óptica de cerca de 0,1 a 540 nm). O polissacarídeo obtido ao final desse cultivo foi eluído em gel-cromatografia para determinação de peso molecular, sendo um antígeno adequado para a produção da vacina.

Palavras-Chave. *Neisseria meningitidis*, concentração de glicose, inóculo, meio de cultura, vacina, polissacarídeo.

ABSTRACT

Polysaccharide for producing a specific vaccine against *N. meningitidis* (serogroup C) is the principal product obtained from this microorganism cultures. In order to assess the polysaccharide production varying the bacteria inoculum bulk, and the initial glucose concentrations, four assays were carried out in duplicate based on factorial 2² planning design. Samples were collected from the cultures every two hours for determining cell concentration (expressed as dry biomass), pH, glucose and polysaccharide concentration. The comparative criteria were based on the final polysaccharide concentrations, and the cell/polysaccharide ($Y_{p/x}$) yield coefficient. The bacteria culture employing the highest inoculum bulk (optical density \cong 0.1 at 540nm) presented the best result of final polysaccharide concentration (0.105 g/L), and $Y_{p/x}$ (0.078). The polysaccharide further purified on gel chromatography column following the molecular mass criterion, was the suitable antigen for vaccine production.

Key Words. *Neisseria meningitidis*, glucose concentration, inoculum, culture medium, vaccine, polysaccharide.

INTRODUCTION

Meningococcal disease occurs both as an endemic and epidemic disease in most parts of the world with significant morbidity and mortality. Despite all the advances in prevention, diagnosis and treatment, the disease continues to have high mortality (5 – 10%)¹. The five major pathogenic serogroups of the Gram-negative encapsulated bacterium *Neisseria meningitidis* are A, B, C, Y, and W135².

Since 1971, two great epidemics have occurred in Brazil: the first epidemic was caused by *N. meningitidis* group C and the second by group A. The last outbreak began in April, 1974 with a higher incidence than the previous one³.

Meningococcal vaccine development began in the 1930s with killed whole-cell and exotoxin vaccines, but widespread use of polysaccharide vaccines did not begin until the 1970's⁴. Currently available polysaccharide vaccines are effective in preventing disease caused by serogroups A, C, Y, and W-135 in older children and adults but do not promote good long-term protection in young children. Vaccines that protect against serogroup B disease are still in development⁵.

For the vaccine production, a great amount of *N. meningitidis* (serogroup C) polysaccharide, which constitutes the antigen for the vaccine against meningitis is needed. But little information is available in the literature about production of this polysaccharide on an industrial scale⁶.

The most employed culture medium for growth of *N. meningitidis* is Frantz medium, according the study of Paz et al.⁶. These authors compared two other culture media in assays carried out in a bioreactor, which presented a worse polysaccharide yield than the Frantz medium.

Aiming at the setting of operational parameters in order to increase polysaccharide yield, the present study investigated the effects of variation of inoculum (determined by optical density) and initial glucose concentration on cell and polysaccharide production. Molecular weight and gel chromatography partition coefficient (K_d) of the polysaccharide in the best condition were higher than 100 kDa and 0.3, respectively, as required to induce an adequate immunogenic response⁷.

MATERIAL AND METHODS

Cultivation of the microorganism

The inoculum was prepared according to Gotschlich *et al.*⁸. The contents of two ampoules, containing the meningococcal strain IMC 2135 (supplied by Instituto Adolfo Lutz, SP, Brazil), maintained in 0.5 mL of Greaves medium⁹ at 70°C, having a mean value of 6.0×10^6 CFU.mL⁻¹, were streaked out onto four Müller-Hinton agar slant tubes¹⁰. The tubes were incubated at 35°C during 12 h in a candle jar (5-10% CO₂). The microorganisms from each slant tube were resuspended in the culture medium and transferred to 500 mL conical flasks,

containing 100 mL of this medium. The flasks were incubated at 35°C for 12 h in a rotary shaker (New Brunswick Model G25, New Jersey, NY) at 140 rpm. Possible contaminations of cultures were monitored by Gram staining technique¹¹. The medium for cultivation was sterilized by filtration through a 0.2 µm Millipore filter. Frantz medium¹² composition (per liter) was: L-glutamic acid, 1.6 g; NaCl, 6.0 g; Na₂HPO₄.7H₂O, 4.67 g; NH₄Cl, 1.25 g; KCl, 0.09 g; L-cystein.HCl.H₂O, 0.02 g; dialyzed yeast extract, 2.0 g; MgSO₄.7H₂O, 1.23 g; glucose, 5.0 g. The pH was adjusted to 7.4 with a 5 N NaOH solution. Four cultivation runs were carried out in duplicate according to the factorial 2² planning design¹³. Assays were conducted for 12 hours and the molecular weight for the best result was verified.

Analytical methods

Inoculum cell concentration was determined by optical density (O.D.) at 540 nm using 1 cm optical pathway glass chambers. Cell concentration was expressed as dry biomass weight per liter (g.L⁻¹) after centrifugation of a known-volume sample at 8,700xg during 30 minutes, followed by pellet drying at 60°C for 48 h. Measurements of pH were performed with a bench pHmeter (Micronal, mod. 374, São Paulo, Brazil). Glucose concentration was measured using the glucose oxidase colorimetric method¹⁴. Polysaccharide concentration was determined after cell disruption and precipitation by addition of Cetavlon (Merck Lab., Darmstadt, Germany) to the sample, according to Gotschlich et al.⁸. After preliminary centrifugation of the sample (8,700xg, 30 minutes), the supernatant was discarded, while the biomass was resuspended in 1.0 M CaCl₂.2H₂O and centrifuged again under the same conditions. The supernatant, containing the suspended polysaccharide, was used for polysaccharide determination by the resorcinol-HCl colorimetric method^{8,15}, which is sensitive regarding polysaccharide monomers (sialic acids) formed after acid hydrolysis of the supernatant. For molecular weight determinations, a column (1.5 x 85 cm) previously filled up with Sepharose 4B-CL (Pharmacia, Uppsala, Sweden) was frequently calibrated using a saturated mixture of riboflavin and Blue Dextran (to determine the void volume) and eluted with a 1.0 M ammonium acetate solution (pH = 7.0) containing 0.1% SDS^{16,17}. Dextran with known molecular weights were eluted through the column for calibration. Dextran concentrations were determined by the phenol-sulfuric method¹⁴ and the correspondence between the logarithm of the molecular weights and the elution volume was established. The polysaccharides from samples purified with ethanol were injected (0.2 mL) and the content of collected fractions (3 mL each) was determined by the above resorcinol-HCl method. The partition coefficient (K_d) represents a way to normalize the peak of elution measured in different gel chromatography columns¹⁷. It is defined as:

$$K_d = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o} \quad (\text{Equation 1})$$

where: V_e = elution volume (located at sample peak); V_t = total volume (between Blue Dextran and riboflavin peaks) and V_o = void volume (located at Blue Dextran peak).

RESULTS AND DISCUSSION

Figure 1 shows the behavior kinetics of each group of assays (defined in Table 1). According this Table, assays 1 and 2 are performed with low initial O.D. values (respectively 0.023 and 0.026) whereas assays 3 and 4, with the greatest ones (respectively 0.105 and 0.085). On the other hand, initial

values of glucose concentration of 3 and 5 g.L⁻¹ were alternated with low and high values of initial O.D. The highest concentrations of polysaccharide were obtained in assays 3 and 4 (respectively, 0.104 and 0.105 g.L⁻¹ at the end of the culture), where the initial O.D. values were the highest, even considering that these assays had different initial concentrations of glucose. In this way, contrary to the inexpressive effect of initial glucose concentration at the employed range in the present study, the effect of the initial value of O.D. in the studied range is actually significant on polysaccharide production (according to Student's *t* test at 5% significance level).

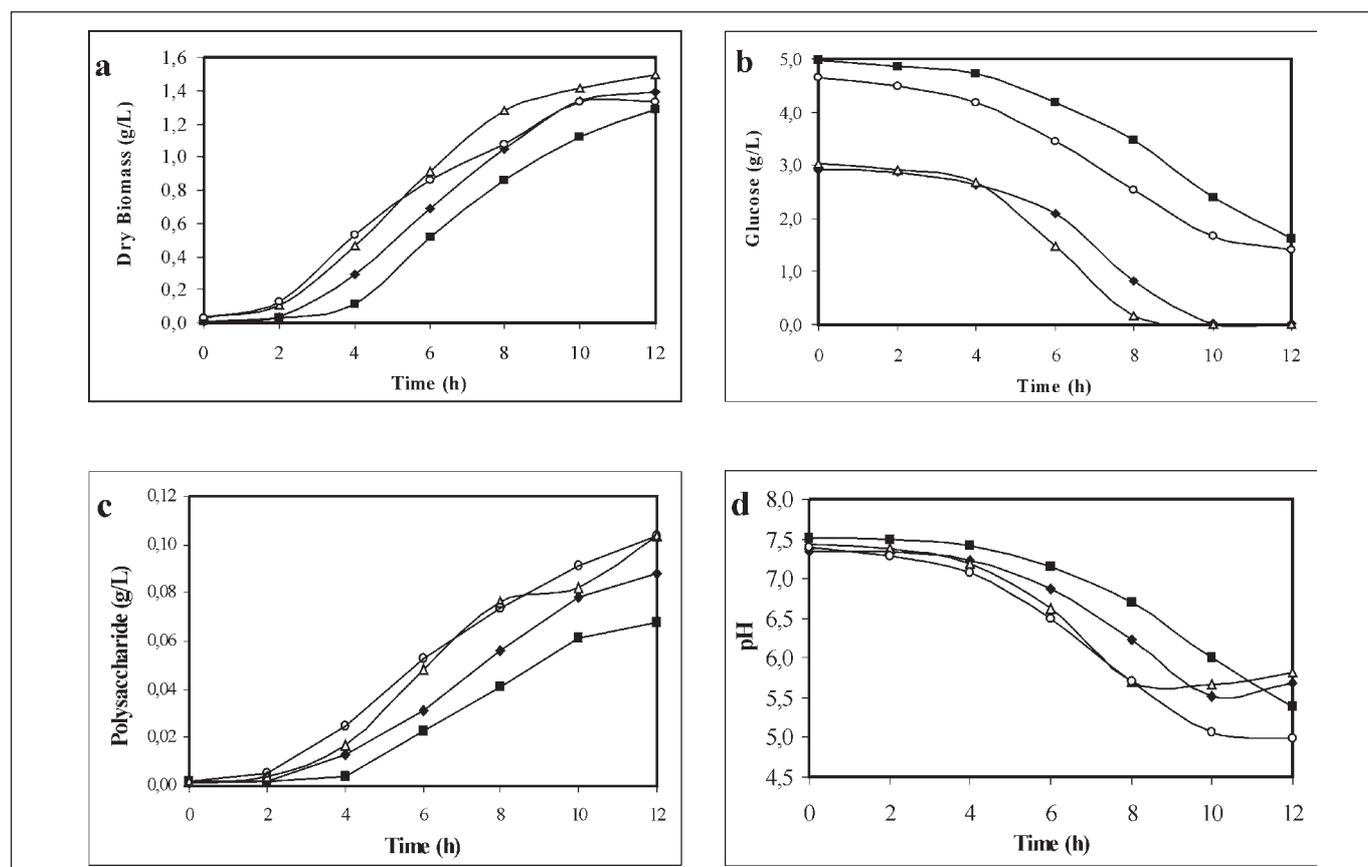


Figure 1. (a): Growth, (b): glucose consumption, (c): polysaccharide formation and (d): pH kinetics – Assay 1 (♦): initial O.D.=0.023 and initial glucose concentration= 3g.L⁻¹; Assay 2 (■) : initial O.D.=0.026 and initial glucose concentration=5 g.L⁻¹; Assay 3 (Δ): initial O.D.=0.105 and initial glucose concentration=3 g.L⁻¹; Assay 4 (o): initial O.D.=0.085 and initial glucose concentration=5 g.L⁻¹.

Table 1. Average values of initial O.D. (540 nm), initial glucose concentration, maximum specific growth rate (μ_{max}), final dry biomass concentration (X_f), final polysaccharide concentration (P_f) and cell/polysaccharide yield factor ($Y_{p/x}$) for assays 1 to 4.

Assay number	Initial O.D. (540 nm)	Glucose (g.L ⁻¹)	μ_{max}	X_f (g.L ⁻¹)	P_f (g.L ⁻¹)	$Y_{p/x}$ (g.L ⁻¹)
1	0.023	3.0	0.70	1.39	0.088	0.063
2	0.026	5.0	0.59	1.28	0.068	0.053
3	0.105	3.0	0.47	1.50	0.104	0.069
4	0.085	5.0	0.54	1.33	0.105	0.078

All the assays began with pH values near 7.4 (Fig. 1d), which was decreasing along the cultivation time, due to formation of acid metabolites produced during cell growth. In assays 2 and 4, which had initial elevated glucose concentration (near 5 g.L⁻¹), the final pH values were near 5.0 at the end of the process, whereas in assays 1 and 3 (with initial glucose concentration near 3 g.L⁻¹), the pH values at the end of the process were near 6.0. All pH curves showed the same behavior until the 8th cultivation hour. However in assays 1 and 3, the glucose concentration became low from the 8th cultivation hour on and disappeared completely at the end of the process (Figure 1b). During this period (between the 8th and 12th cultivation hours), pH values increased slightly, probably due to the use of amino acids as alternative carbon source. On the other hand, in assays 2 and 4, which still had glucose for consumption, the pH values continued to fall and finished with values near 5 at the end of cultivation. However, the lack of glucose did not affect the polysaccharide production (Table 1 and Figure 1c). In addition, considering that in assays 2 and 4 the residual values of glucose were near 1.5 g.L⁻¹ (Figure 1b), its concentration can be adjusted in further formulations to avoid waste of this compound at the end of culture.

Figure 1a shows bacterial growth kinetics profile in the exponential phase until the 10th hour, when cultivations reach the stationary growth phase. Comparing these results with glucose consumption kinetics (Figure 1b), it seems that substrate consumption had little influence on cell growth and polysaccharide production kinetics (Figure 1c). However, even in the stationary growth phase, the production of polysaccharide continues. Thus, polysaccharide formation could or not have been associated with cell growth. This behavior had already been observed by the authors^{6,18,19}.

The data are comparable with the results described in the literature for bioreactor scale production. Paz et al.⁶ obtained a concentration of 0.06 g.L⁻¹ for a 12-hour bioreactor cultivation. This value is compatible with the results obtained in the current study (Table 1 and Figure 1c). These authors also studied other

synthetic media and demonstrated that Frantz medium presented the best results for the obtention of polysaccharide from *Neisseria meningitidis* (serogroup C) culture.

The relationship between biomass and polysaccharide production is extremely important in large-scale production. Since, in order to lower the costs of capsular polysaccharide production (through the culture of serogroup C *N. meningitidis*) and the purification process of the obtained capsular polysaccharide, two criteria are essential: attaining the maximum polysaccharide concentration at the end of the culture process in a shaker (P_p) and simultaneously attaining the maximum cell/polysaccharide yield factor (Y_{p/x}), bearing in mind that, in the purification process, the rest of the cell structure is a contaminant⁶.

In the present study, from a comparison of results presented in Table 1, it is evident that the greatest polysaccharide final concentration was obtained in assays 3 and 4 (namely, 0.104 and 0.105 g.L⁻¹ at the end of cultivation), but assay 4 shows the best process condition to present the best Y_{p/x} (0.078 g.g⁻¹). The worst results were those obtained in assays 1 and 2 (respectively, 0.063 and 0.053 g.L⁻¹), where the greatest values of maximum specific growth rate (0.70 and 0.59 h⁻¹) occurred.

The polysaccharide obtained from assay 4, which presented the greatest final polysaccharide concentration and Y_{p/x} was injected in the chromatography column to determinate molecular weight. The purified polysaccharide must be analyzed for purity (chemical determinations) and molecular size for potency prior to formulation of the final product. According to the World Health Organization, until 1980, molecular weight determination was carried out with Sepharose 4B resin and K_d value could not be greater than 0.4²⁰. Since 1981 the determination must be accomplished with Sepharose CL-4B and the polysaccharide ought to be eluted before reaching K_d = 0.5, which represents at least 75% of recovery for total *N. meningitidis* (serogroup C) polysaccharide^{21,22}.

The determination, as presented in Figure 2, performed on sample from assay 4, showed a mean molecular weight in the range of 400-500 kDa, with K_d lower than 0.3 and recovery rate (percent amount of polysaccharide recovered before reaching K_d = 0.5) higher than 92%, being suitable as antigen for the vaccine elaboration.

CONCLUSION

The effect of initial glucose concentration is inexpressive in the employed range in the present study, whereas the effect of the inoculum in the studied range is actually significant as regards polysaccharide production. Polysaccharide was produced in all the assays, however the best results were obtained using the greatest inoculum values. The acquired data are comparable with the results described in the literature for bioreactor scale production. In addition, the analyzed polysaccharide sample followed the standard criteria for molecular weight, being suitable for vaccine elaboration.

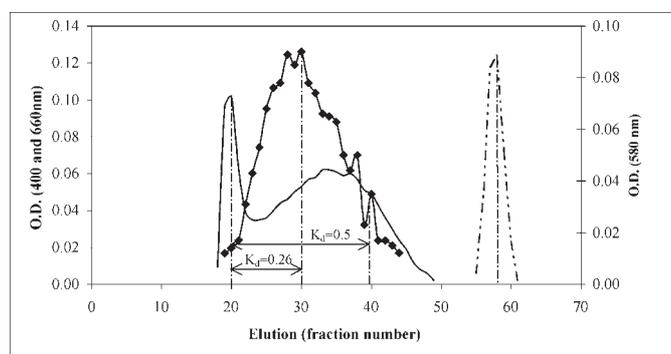


Figure 2. Gel chromatography profile: (—) Blue Dextran 2.10⁶ Da (O.D. 660 nm); (---) Riboflavin 376.4 Da (O.D. 400 nm); (◆) Polysaccharide from assay 4 (O.D. 580 nm measured after resorcinol-HCl reaction of the elution fractions). Partition coefficient K_d=0.26, recovery yield (percent amount of polysaccharide recovered before reaching K_d=0.5) close to 92% and estimated molecular weight of 480 kDa.

REFERENCES

1. Memish ZA, Alrajhi AA. Meningococcal disease. *Saudi Med J* Mar 2002; 23:259-64.
2. Danzig L. Meningococcal vaccines. *Pediatr Infect Dis J* Dec 2004; 23(12 Suppl): 285-92.
3. Tanizaki MM, Garcia LR, Baraque-Ramos J, Leite LCC, Hissa H, Furuta JA, Cabrera-Crespo J, Raw I. Purification of meningococcal group C polysaccharide by a procedure suitable for scale-up. *J Microbiol Methods* 1996; 27: 19-23.
4. Collins CL, Pollard AJ. Meningococcal vaccines. *Curr Opin Investig Drugs* 2002; 3: 975-9.
5. Soriano-Gabarro, M.; Stuart, J.M.; Rosenstein, N.E. Vaccines for the prevention of meningococcal disease in children. *Semin Pediatr Infect Dis* 2002; 13:182-9.
6. Paz MF, Baraque-Ramos J, Hiss H, Leal MBB, Vicentin MA, Raw I. Polysaccharide production in batch process of *Neisseria meningitidis* serogroup C comparing Frantz, modified Frantz and Catlin 6 media. *Braz J Microbiol* 2003; 34: 27-32.
7. Frasch CE. Production and control of *Neisseria meningitidis* vaccines. In: *Advances in biotechnological processes: bacterial vaccines*. New York: A. Mizrahi Ed., John Wiley & Sons; 1990 (Vol. 13). p. 123-45.
8. Gotschlich EC, Liu TY, Artenstein MD. Human immunity to the meningococcus.3. Preparation and immunochemical properties of the group A, group B, and group C meningococcal polysaccharides. *J Exp Med* 1969; 129: 1349-65.
9. Greaves RIN. Preservation of living cells by freeze-drying. *Ann NY Acad Sci* 1960; 85: 723-8.
10. Müller H, Hinton JA. A Protein-Free Medium for Primary Isolation of the Gonococcus and Meningococcus. *Proc Soc Exp Biol Med* 1941; 48: 330.
11. Bier O. *Microbiologia e Imunologia*. 24th ed. São Paulo: Ed. Melhoramentos; 1985. 1234 pp.
12. Frantz IDJr. Growth requirements of the meningococcus. *J Bacteriol* 1942; 43: 757-61.
13. Box GEP, Hunter WG, Hunter JS. *Statistics for Experimenters*. New York: John Wiley & Sons; 1978. 653pp.
14. Spiro RG. Analysis of sugar found in glycoproteins. In: Spiro RG, editors. *Methods in Enzymology*. New York: Academic Press; 1966 (Vol. 8). p. 3-13.
15. Svennerholm L. Quantitative estimation of sialic acids. II. A colorimetric Resorcinol-hydrochloric acid method. *Bioch et Bioph* 1957; 24: 604-11.
16. Gotschlich EC, Fraser BA, Nishimura O, Robbins JB, Liu TY. Lipid on capsular polysaccharides of gram-negative bacteria. *J Biol Chem* 1981; 256: 8915-21.
17. Pharmacia Biotech. *Gel Filtration: principle and methods*, 6th. ed, Uppsala: Edition Pharmacia, 1997, 103 pp.
18. Baraque-Ramos J, Hiss H, Vicentin MA, Paz MF, Peixoto A, Leal MBB, Gonçalves PC, Raw I. Batch cultivation kinetics of *Neisseria meningitidis* (serogroup C) in Frantz medium I. Growth and polysaccharide production. *Arch Biol Technol* 1996; 39: 215-20.
19. Baraque-Ramos J, Hiss H, Vicentin MA, Paz MF, Peixoto A, Leal MBB, Sato RA, Vassoler U, Raw I. Nitrogen consumption during batch cultivation of *Neisseria meningitidis* (serogroup C) in Frantz medium. *Braz J Microbiol* 2001; 32: 305-10.
20. WHO Expert Committee on Biological Standardization, Twenty-seventh report Annex 2, Requirements for meningococcal polysaccharide vaccine. *WHO Report Series* 594; 1976. p.50-75.
21. WHO Expert Committee on Biological Standardization, Thirty-first report Annex 6, Requirements for meningococcal polysaccharide vaccine. *WHO Report Series* 658; 1981. p. 174-84.
22. Baraque-Ramos J, Hiss H, Arauz LJ, Mota RL, Ricci-Silva ME, Paz MF, Tanizaki MM, Raw I. Polysaccharide production of *Neisseria meningitidis* (serogroup C) in batch and fed-batch cultivations. *Biochem Eng J* 2005; 23: 231-40.

Avaliação da sensibilidade de *Daphnia magna* Straus, 1820 (Cladóccera, Crustácea) ao dicromato de potássio

Assessment of *Daphnia magna* Straus, 1820 (Cladóccera, Crustáccera) susceptibility to potassium dichromate

RIALA6/1064

Ana Claudia B. ALVES^{1*}, Jacira SILVANO¹

* Endereço para correspondência: ¹ Universidade do Extremo Sul Catarinense, Rod. Jorge Lacerda, Km 4,5, Sangão, Criciúma, SC, CEP 88800-000. ana-ab@bol.com.br.*

¹ Curso de Ciências Biológicas, Universidade do Extremo Sul Catarinense, Sangão, Criciúma, SC.

RESUMO

As análises ecotoxicológicas determinam os efeitos deletérios causados a um organismo por um agente tóxico. O microcrustáceo *Daphnia magna* é um dos organismos mais usados em bioensaios de toxicidade. Para garantir a confiabilidade dos resultados é necessário avaliar a sensibilidade das dáfias que pode ser influenciada pelas condições de cultivo em laboratório. O dicromato de potássio, 10 mg/L, foi utilizado como substância referência para obter a faixa de sensibilidade. O presente trabalho avalia os testes de sensibilidade realizados de março de 2004 a março de 2005 no Laboratório de Ecotoxicologia do Instituto de Pesquisas Ambientais e Tecnológicas, IPAT, da Universidade do Extremo Sul Catarinense, UNESC, segundo a norma ABNT NBR 12713. Os indivíduos entre 2 e 24 horas de idade foram testados em soluções com diferentes concentrações. O valor médio da CE50 de 1,28 mg/L está dentro da faixa limite para dicromato de potássio conforme a norma ISO 6341. De acordo com as comparações feitas entre os dados do presente estudo com os valores estabelecidos pela norma ISO e com os relatados por outros autores, pode-se inferir que as dáfias, cultivadas no Laboratório de Ecotoxicologia do IPAT, estão aptas a serem utilizadas em testes de toxicidade.

Palavras-Chave. *Daphnia*, dicromato de potássio, ecotoxicologia, bioensaio/ métodos.

ABSTRACT

The ecotoxicology analyses determine the deleterious effect caused by a toxic agent on an organism. Microcrustacean *Daphnia magna* is one of the most used organisms for performing toxicity bioassay. To guarantee the reliability of results, evaluation of the dafnias sensitivity is required as they can be influenced by the culture conditions. The present work evaluated the sensitivity testing performed from March 2004 to March 2005 in the Laboratory of Ecotoxicology of Instituto de Pesquisas Ambientais e Tecnológicas (IPAT)- University do Extremo Sul Catarinense (UNESC), following the criteria from ABNT NBR 12713 norm. The potassium dichromate in a concentration of 10 mg/L was used as reference substance to get the sensitivity band. The organisms aged from 2 to 24 hours were tested in solutions containing different concentrations of potassium dichromate. The CE(I)50 mean value of 1.28 mg/L indicates that it is within the potassium dichromate band limit, in accordance to ISO 6341 norm criteria. Comparing this finding with the value established by ISO and with the data reported by other authors, it can be inferred that the dafnias cultivated in the Laboratory of Ecotoxicology at IPAT have been suitable for being employed on toxicity assays

Key Words. *Daphnia*, potassium dichromate, ecotoxicology, bioassay/ methods

INTRODUÇÃO

A toxicidade é a propriedade do agente químico causar efeito danoso a um organismo, quando este é exposto a determinadas concentrações em determinado espaço de tempo. Para verificar a toxicidade se faz necessário análises ecotoxicológicas, também chamadas bioensaios, as quais visam determinar os efeitos deletérios para a comunidade aquática causada por agente tóxico sem a preocupação de identificá-los¹.

Nos ensaios de toxicidade, freqüentemente, são utilizados bioindicadores que podem ser definidos como organismos vivos indicadores de contaminação. Neste processo de biomonitoramento pode-se utilizar membros da flora ou fauna, onde os mais comuns seriam os peixes, microcrustáceos, algas, fungos e bactérias².

Assim a Ecotoxicologia através do monitoramento de toxicidade deve ser valorizada como uso sistemático de respostas biológicas, a fim de avaliar mudanças ambientais. Atualmente *Daphnia magna* STRAUS, 1820 é um dos organismos, zooplânctônicos, mais utilizados em testes toxicológicos em vários países³ e reage sensivelmente à ampla gama agentes tóxicos⁴.

A *Daphnia magna* é um microcrustáceo de água doce com tamanho médio entre 5 e 6 mm, que alimenta-se principalmente de algas unicelulares⁵. Em condições ambientais favoráveis, reproduz-se por partenogênese, originando apenas fêmeas⁴. É também uma espécie cosmopolita no Hemisfério Norte⁶, pelágica e vive em ambientes eutróficos. Tem um tempo de geração curto, o que torna o cultivo fácil.

Para obter resultados confiáveis nos testes de toxicidade é necessário avaliar a sensibilidade dos organismos-teste⁴. As condições de vida desses organismos são avaliadas de acordo com normas indicativas da faixa de sensibilidade das daphnias a uma substância referência. O presente trabalho visa obter a faixa de sensibilidade das dafnias ao dicromato de potássio conforme norma ISO 6341. Teste de sensibilidade fora da faixa definida na norma é sinal de alteração de algum fator durante o teste, o que implica numa avaliação completa do mesmo.

MATERIAIS E MÉTODOS

O teste de sensibilidade foi realizado de acordo com as normas estabelecidas pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) presentes na NBR 12713. O microcrustáceo *Daphnia magna* é cultivado no laboratório de Ecotoxicologia do Instituto de Pesquisas Ambientais e Tecnológicas, IPAT, da Universidade do Extremo Sul Catarinense, UNESC, onde são mantidas em estufa incubadora a temperatura controlada de 20°C e fotoperíodo de 16 horas/dia controlado por "timer" eletrônico. São alimentadas diariamente com algas verdes da espécie *Scenedesmus subspicatus*, também cultivadas no mesmo laboratório de acordo com CETESB (1990)¹. Os indivíduos utilizados para o teste são jovens que têm entre 2 h a 24 h.

A sensibilidade das daphnias foi testada utilizando uma solução padrão de dicromato de potássio com concentração de 10 mg/L. No experimento foram preparadas soluções teste nas concentrações: 0,55; 0,70; 0,85; 1,00; 1,15; 1,30; 1,45; 1,60; 1,75 mg/L. Em cada série de experimento 10 daphnias são expostas em béqueres de 25 mL (com duas repetições para cada diluição), totalizando 20 indivíduos, e ainda no controle, ou seja a exposição de daphnias somente em água de diluição. Após 24 horas de exposição em incubadora com fotoperíodo e temperatura controlados, foram observados o número de organismos que não apresentaram mobilidade. Calculando em seguida a CE (I)50 (concentração efetiva) que se baseia nas condições em que não ocorra mortalidade das dafnias, quando estas são expostas ao dicromato de potássio em determinado tempo e concentração. Este percentual é o mais significativo para ser extrapolado a uma população¹. O cálculo da CE50 foi realizado através do método das Próbitas ou Trimmed Spearman-Kärber⁷. Em cada experimento foram também avaliados o pH, o oxigênio dissolvido e a dureza da água de diluição¹⁰.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A água de diluição, do dicromato de potássio, utilizada no teste foi avaliada quanto ao pH, dureza e oxigênio dissolvido, conforme tabela 1. O pH indica a concentração dos íons hidrogênio H⁺ em uma solução e expressa a condição ácida (< 7) ou alcalina (> 7), sendo que valores de pH afastados da neutralidade (pH 7) podem afetar a vida aquática⁸. A dureza

Tabela 1. Valores de oxigênio dissolvido (OD), pH e dureza da água de diluição do Teste de Sensibilidade entre março/2004 e março/2005.

	OD (mg/L)	pH	Dureza (mg/L CaCO ₃)
MAR/04	5,0	7,7	241,1
ABR	4,9	7,6	233,89
MAI	5	7,7	251,27
JUN	5,1	7,7	241,1
JUL	4,9	7,7	241,73
AGO	4,8	7,6	241,57
SET	5	7,8	238,41
OUT	4,7	7,7	246,96
NOV	4,8	7,8	243,69
DEZ	4,7	7,7	236,5
JAN/05	4,6	7,8	250,88
FEV	4,6	7,7	254,8
MAR	4,9	7,6	246,96
MÉDIA	4,8 ± 0,04	7,7 ± 0,02	243,76 ± 1,70
DES. PAD.	0,155	0,07	5,89
KNIE e LOPES (2004)	> 4,0	7,8 ± 0,2	250 ± 25

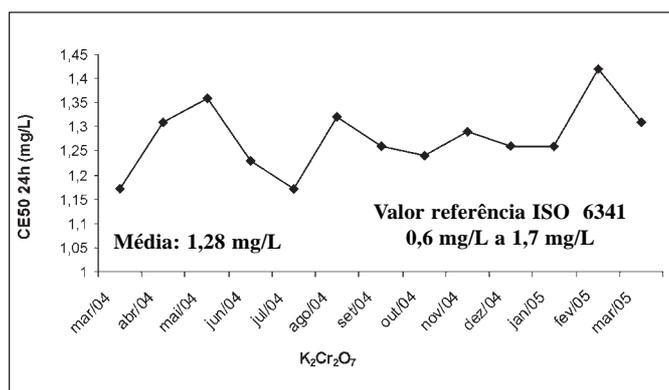


Figura 1. Carta controle da sensibilidade de *Daphnia magna* para a substância de referência $K_2Cr_2O_7$.

reflete o teor de cálcio e magnésio que estão combinados a carbonato ou bicarbonato⁹ e o grau de dureza influencia a toxicidade¹⁰. O oxigênio dissolvido é um teste padrão no controle da poluição da água e um dos mais importantes gases dissolvidos para caracterização e dinâmica de um ecossistema aquático, sua concentração varia em função da temperatura e aeração da água¹⁰. Na água de diluição estas variáveis permaneceram dentro da faixa estabelecida em⁴ conforme Tabela 1. Estas variáveis estando dentro da faixa estabelecida garantem que os resultados reflitam realmente a amostra.

De acordo com a Figura 1 a média da sensibilidade (CE; 24HS) obtida neste trabalho foi de 1,28 mg/L de dicromato de potássio, estando os valores compreendidos de 0,6 mg/L a 1,7 mg/L, valor este em conformidade com a norma ISO 6341. A média de $1,01 \pm 0,15$ mg/L⁴, enquanto a média de 1,7 mg/L¹¹, valor no limite máximo permitido pela norma utilizada como referência neste trabalho. De acordo com as comparações com os outros autores e com a ISO 6341 as daphnias cultivadas no laboratório estão aptas a serem utilizadas nos testes de toxicidade.

É importante realizar estes testes pelo menos uma vez por mês para garantir a confiabilidade dos resultados.

CONCLUSÃO

De acordo com os resultados dos testes de sensibilidade, durante o período de março de 2004 a março de 2005, as daphnias utilizadas no Laboratório de Ecotoxicologia da UNESC mantiveram-se dentro da faixa estabelecida pela ISO 6341, indicando ser de boa qualidade e aptas a serem utilizadas nos testes de toxicidade.

REFERÊNCIAS

1. CETESB, Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental. Procedimentos para utilização de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos. São Paulo: CETESB, 1990.
2. Buikema ALJ, Niederlehner BR, Cairns JJ. Biological. Monitoring Part IV. Toxicity Testing. *Water Res*, 1982; 16: 239-62.
3. Nikunen E, Miettinen Y. *Daphnia magna* as a indicator of acute toxicity of waste waters. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 1985; 35: 368-74.
4. Knie JLW, Lopes EWB. Testes ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações. Florianópolis: FATMA/GTZ. 2004.
5. Motte dit Falisse N *et al.* La sensibilité de *Daphnia magna* pour le dichromate de potassium varie au cours de son existence. 2003; 5:1.
6. USEPA. Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. 4th edition. 2002.
7. Hamilton, M.A, Russo, RC, Thurton, RV. Trimmed Spearman-Kärber method for Estimating Median Lethal Concentrations in Toxicity Bioassays. *Environ Sci Technol*, New York, v. 11, n. 7, p. 714-9. 1977.
8. Sperling M. Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos. Belo Horizonte: FCO, v. 1. 1996; 239p.
9. Esteves FA. Fundamentos de limnologia. Rio de Janeiro: Interciência/FINEP, 1988. 575 p.
10. Förstner U, Wittmann GTW. Metal pollution in the aquatic environmental. 2nd edn Berlin: Springer-Verlag, 1981. 486 p.
11. Müller HG. Acute Toxicity of Potassium Dichromate to *Daphnia magna* as a Function of the Water Quality. *Bull. Environ Contam Toxicol* 1980; 25, 113-7,

Exame direto no diagnóstico de *Paracoccidioides brasiliensis* realizados nos Laboratórios Regionais do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brasil

Use of direct microscopic examination for *Paracoccidioides brasiliensis* diagnosis at Instituto Adolfo Lutz (IAL) Regional Laboratories Network, state of São Paulo, Brazil

RIALA6/1065

Sérgio S. MOREIRA^{1*}, Jaqueline O. SILVA², Maria do Carmo A. M. MEIRA³, Leonilda C. GALLE⁴, Elizabete C. A. RODRIGUES⁵, Milena Z. GARCIA⁶, Jane P. SANTOS¹⁰, Maria Cecília B. SOARES⁷, Aguida MARIA⁸, Rosana Bellan de OLIVEIRA E SILVA⁹

* Endereço para correspondência: Seção de Micologia, Instituto Adolfo Lutz, Regional Campinas, Rua São Carlos, 720, Vila Industrial, Campinas/SP, Brasil, CEP 13.035-420. Telefone: (55 19) 3272-7977, fax (55 19) 3273-1698, e-mail: ssmoreira@ial.sp.gov.br
Laboratórios Regionais do Instituto Adolfo Lutz: Campinas¹; Ribeirão Preto²; Sorocaba³; Presidente Prudente⁴, São José do Rio Preto⁵; Bauru⁶; Santos⁷; Taubaté⁸; Rio Claro⁹, Laboratório I – Araçatuba – DIR VI¹⁰.
Recebido: 30/06/2005 – Aceito para publicação: 20/06/2006

RESUMO

Paracoccidioidomicose (PCM) é uma doença sistêmica causada pelo fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis*. Apresenta-se como infecção pulmonar primária assintomática, aguda, sub-aguda ou crônica. Para ratificar a importância do exame direto, de baixo custo e complexidade, no diagnóstico da PCM, foi realizado um levantamento de amostras clínicas nos Laboratórios Regionais do IAL (LR-IAL) e Laboratório I Araçatuba – DIR VI, no período de janeiro de 1996 a dezembro de 2002. Foram analisadas 3807 amostras de origem pulmonar e 25 amostras extrapulmonares, preparadas de acordo com suas peculiaridades. Detectou-se significativa quantidade de solicitações de exames com informações incompletas quanto aos dados do paciente. Foi demonstrada positividade em 4% das amostras pulmonares (predominando no adulto do sexo masculino) assim como em amostras extrapulmonares (88%). A diferença na demanda natural das solicitações para este diagnóstico, entre os Regionais, pode estar relacionada com endemicidade da região, busca e/ou suspeita da doença e encaminhamento das amostras para os Laboratórios de Referência da Rede Pública. Após 98 anos da descrição pioneira por Adolfo Lutz, a doença ainda é foco de preocupação para a Saúde Pública.

Palavras-Chave . paracoccidioidomicose, epidemiologia, exame direto, diagnóstico.

ABSTRACT

Paracoccidioidomycosis (PCM), an autochthonous disease from Latin America, is a systemic disease caused by a dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. It is supposed that this microorganism infects hosts when conidia in aerosol form are inhaled by individuals, causing primary acute, subacute, or even chronic lung infection. In order to give evidence of the significance in diagnosing PCM by means of direct microscopic examination, which is of low cost, and easy to perform assay, a study was carried out analyzing clinical samples from IAL Regional Laboratories Network collected during the period from January 1996 to December 2002. A total of 3,807 clinical samples from lung, and 25 extra-pulmonary clinical samples were prepared by conventional procedures. Significant quantity of exam request forms with incomplete data on patient age, profession, and birthplace was observed. Additionally, samples from male patients were more frequently requested for PCM diagnosis than from female subjects. Positive lung samples were detected in 4%, being predominantly from male patient aged from 31 to 70 years old. Positive extra-lung samples were also detected, which demonstrated the presence of this disease in other organs. Although PCM mortality rate have still been increasing in Brazil, due to systemic mycosis, PCM has not included among diseases for compulsory notification yet. PCM has still been a focus of Public Health attention even 98 years have passed since the first description was made by the investigator Adolfo Lutz.

Key Words. paracoccidioidomycosis, epidemiology, direct microscopic examination, laboratory diagnosis.

INTRODUÇÃO

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma doença sistêmica, causada por *Paracoccidioides brasiliensis*, fungo dimórfico, conhecido apenas em sua forma assexuada, considerado saprobiota do solo. Adolfo Lutz, no Brasil, descreveu a doença em 1908, enquanto Diretor do Instituto Bacteriológico de São Paulo. Em sua publicação, o autor descreve os aspectos clínicos, histopatológicos e microbiológicos, reconhecendo a natureza fúngica do microrganismo¹.

A PCM, antigamente denominada Blastomicose Sul Americana, é doença sistêmica autóctone da América Latina, com a maior casuística registrada no Brasil, Argentina, Colômbia e Venezuela^{2,3,4}. Acredita-se que a porta de entrada do microrganismo seja através da inalação dos conídios, levando à uma infecção pulmonar primária cuja forma pode ser desde assintomática, a aguda, sub-aguda ou crônica. Pode ocorrer disseminação para outros órgãos e sistemas, notadamente a mucosa oral, as glândulas adrenais, o sistema retículo endotelial, a pele, o trato genital e raramente o Sistema Nervoso Central^{5,6,7,8,9}.

A prevalência da PCM é variável nos países autóctones e, também, em um mesmo país, nas suas diferentes regiões¹⁰. O maior número de casos tem sido assinalado no Brasil, onde a prevalência, os aspectos clínicos e epidemiológicos variam conforme a região¹¹. Portanto, no Brasil a doença é um importante problema de Saúde Pública em que o número de casos excede a 6.000^{3,12}. Em regiões altamente endêmicas, a doença é estimada em 1 a 3 casos por 100.000 habitantes¹³.

Inquéritos epidemiológicos utilizando testes cutâneos com paracoccidioidina demonstram que a paracoccidioidomicose é endêmica em quase todos os estados brasileiros^{14,15,16}.

A incidência ocorre predominantemente em adultos do sexo masculino entre 30 e 60 anos de idade, habitantes ou trabalhadores da zona rural^{2,3,17}. Em um estudo de 422 casos de PCM, entre 1980 e 1999, Paniago et al.¹⁷ encontraram como média de idade 43,4 anos, com a proporção entre o sexo masculino e feminino de 10:1 e 45,5% dos doentes eram trabalhadores rurais. Assim, a importância da PCM em saúde coletiva, está ligada aos custos sociais e econômicos derivados não apenas da doença em atividade, que ocorre em indivíduos na sua fase mais produtiva de vida, como também das freqüentes seqüelas secundárias a esta micose, motivo comum de incapacitação para o trabalho².

A PCM é rara em crianças abaixo de 14 anos de idade e, portanto, em um estudo realizado por Gonçalves et al.¹⁸ foi demonstrada que em 15 anos houve 36 casos da doença na forma aguda em crianças entre 3 e 12 anos de idade, nativas de zona rural do estado do Rio de Janeiro. Outros autores têm chamado a atenção sobre a importância de se valorizar epidemiologicamente as crianças que apresentavam a fase aguda ou subaguda da PCM, especialmente porque estas crianças na

América Latina estão envolvidas nas diversas atividades agropecuárias desde os primeiros anos de vida. Estes dados servem como marcadores para rastreamento mais direcionado até o micro ambiente onde se suspeita que viva o fungo e de onde se origina a infecção humana^{13,19}.

A associação de PCM e AIDS tem sido pouco relatada; e uma das razões é a PCM prevalecer em áreas rurais e a AIDS ocorrer em áreas predominantemente urbanas^{20,21}.

É incontestável o fato de que o diagnóstico de certeza de processos infecciosos derive da demonstração e do reconhecimento do agente, incluindo exame a fresco. No exame direto, o agente *P.brasiliensis*, é observado como célula hialina, arredondada, única ou com brotamentos, assumindo às vezes os aspectos de “mickey mouse” e roda de leme; as paredes são birrefringentes e esverdeadas. No citoplasma, núcleos e organelas são observados.

O presente trabalho teve por objetivo mostrar a incidência da PCM no Estado de São Paulo, através dos diagnósticos do agente etiológico da PCM, realizados nos Laboratórios Regionais do Instituto Adolfo Lutz (LR-IAL). Estudos regionais de casos isolados contribuem para o melhor conhecimento da endemia.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas 3807 amostras clínicas de origem pulmonar (escarro, lavado bronco-alveolar, lavado brônquico, escovado brônquico) e 25 extrapulmonar (hemocultura, aspirado de linfonodos, lesão ganglionar e bucal), de pacientes atendidos pela área de abrangência dos LR-IAL de Campinas, Ribeirão Preto, Sorocaba, Presidente Prudente, São José do Rio Preto, Bauru, Santos, Taubaté, Rio Claro e Laboratório I Araçatuba- DIR VI, para diagnóstico de doença fúngica, no período de janeiro de 1996 a dezembro de 2002.

Os materiais líquidos (lavado brônquico, escovado brônquico, lavado bronco-alveolar) foram centrifugados a 10.000 x g por 15 minutos, com o objetivo de concentrar o material a ser analisado. Outros materiais como escarro e aspirado de linfonodos foram submetidos a digestão com agentes mucolíticos (N- acetil- cisteína) durante 24 horas e centrifugados. Após, os sedimentos foram colocados entre lâmina e lamínula para observação direta ao microscópio óptico.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No período entre janeiro de 1996 a dezembro de 2002 foram realizados nos LR-IAL, 3832 exames à fresco para pesquisa de PCM em amostras clínicas de origem pulmonar (99,4%) e extra pulmonar (0,6%). A Figura 1 mostra a distribuição destas amostras nos diferentes Laboratórios Regionais. O maior número de exames ocorreu em amostras de escarro, devido de ser um material biológico de fácil coleta e

indicado para o diagnóstico diferencial de agentes associados à pneumopatias. Observou-se que o Regional de Sorocaba apresenta 53,4% do total de amostras; acredita-se que isto ocorra pelo fato de realizar também exame sorológico para PCM. Os Laboratórios Regionais de Rio Claro e Bauru iniciaram a realização do exame direto para PCM a partir do ano de 2000.

Verificou-se que em relação ao sexo, houve maior suspeita da doença no sexo masculino 66,2% (Figura 2) durante o período em estudo.

Em ambos os sexos, a faixa etária de maior suspeita foi de 31 a 70 anos, conforme indica a Figura 3. O volume de amostras sem informação da idade do paciente é ressaltado nesta figura, demonstrando falha no preenchimento correto da solicitação do exame.

A positividade encontrada dentre as amostras pulmonares analisadas foi de 4%, predominando, em todos os LR-IAL, a faixa etária de 31 a 60 anos, para ambos os sexos, conforme demonstrado na (Figura 4), estando de acordo com a literatura existente¹⁷.

Foram avaliadas 25 amostras de origem extrapulmonar, com diagnóstico positivo em 22 amostras (88%), demonstrando a presença desta doença em outros órgãos. Cermeño et al.²³ em um recente estudo da casuística das micoses em um Hospital Universitário na Venezuela, foi detectado 4,7% de micoses profundas com 1,7% de paracoccidioidomicose (n=8). A ocorrência da micose foi nos pulmões⁵, em mucosa de orofaringe² e ganglionar¹. Micose ganglionar também tem sido detectada por outros autores²⁴.

A positividade do exame direto não foi homogênea entre os diferentes laboratórios. O Laboratório Regional de Rio Claro detectou maior positividade nas amostras (11,5%), seguido de Santos (8,8%), Campinas (8%), Araçatuba (7,3%), Taubaté (3,6%), Ribeirão Preto (3,1%), Sorocaba (3,1%), Presidente Prudente (2,7%), São José do Rio Preto (1,4%) e Bauru (1,3%). Acreditamos que esta diferença de positividade entre os Regionais se deve a uma demanda espontânea das regiões, de acordo com a sintomatologia do paciente que procura a unidade

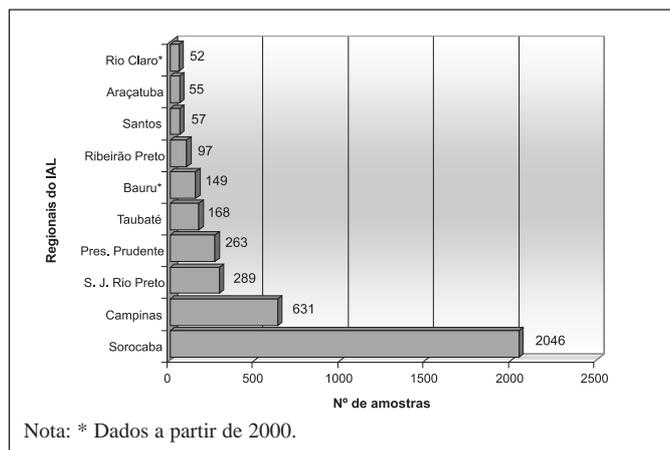


Figura 1. Distribuição de amostras de origem pulmonar recebidas para diagnóstico de paracoccidioidomicose realizados no período de janeiro de 1996 a dezembro de 2002, nos Laboratórios Regionais do Instituto Adolfo Lutz.

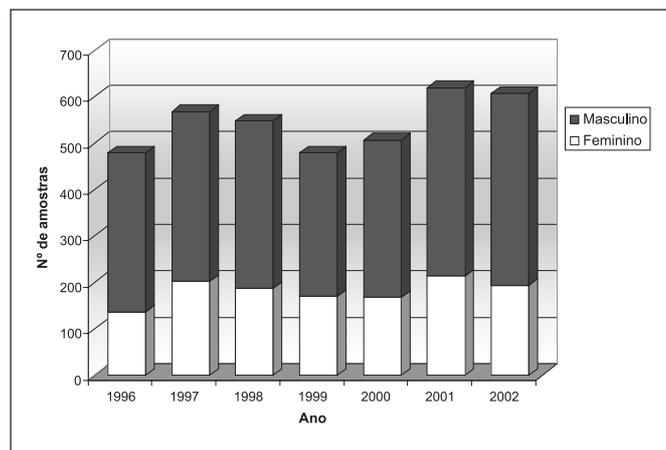


Figura 2. Distribuição anual das amostras de origem pulmonar, recebidas nos Laboratórios Regionais do Instituto Adolfo Lutz, para o diagnóstico de paracoccidioidomicose, em relação ao sexo, no período de janeiro de 1996 a dezembro de 2002.

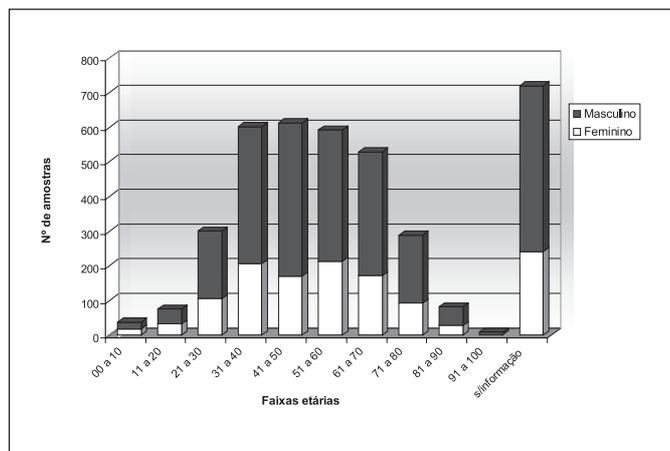


Figura 3. Distribuição por faixa etária e sexo, de amostras de origem pulmonar, recebidas nos Laboratórios Regionais do Instituto Adolfo Lutz, para o diagnóstico de paracoccidioidomicose, no período entre janeiro de 1996 a dezembro de 2002.

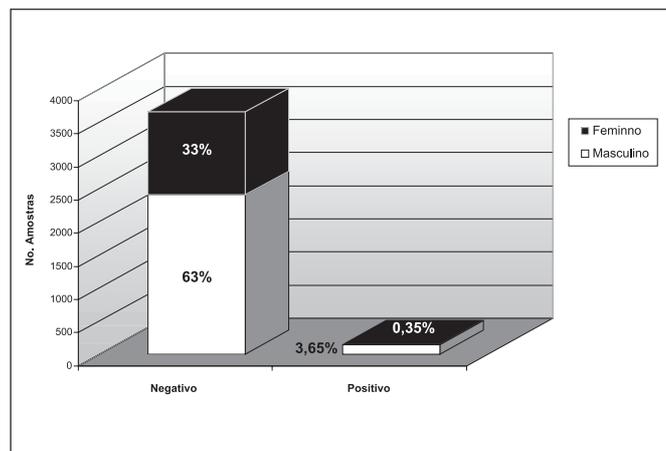


Figura 4. Diagnóstico de *Paracoccidioides brasiliensis* em espécimes clínicos de origem pulmonar examinados por exame direto nos Laboratórios Regionais do Instituto Adolfo Lutz, entre janeiro de 96 a dezembro de 2002.

de doenças respiratórias (serviço especializado/ pneumologia) da rede de atendimento do Sistema Único de Saúde.

A PCM, no Brasil, destaca-se como oitava causa de mortalidade entre as doenças predominantemente crônicas e a mais elevada taxa de mortalidade entre as micoses sistêmicas. Segundo Coutinho et al.²² a taxa de mortalidade anual é de 1,45/milhão de habitante, podendo ser usada como indicador para definir a doença como importante agravo de saúde no Brasil apesar de não ser considerada doença de notificação obrigatória em todas as regiões.

Os dados encontrados têm valor epidemiológico, pois, demonstram a incidência da PCM, doença de grande importância e comprometimento, nas regiões de abrangência dos LR-IAL. Ressalta - se também a importância do diagnóstico através do exame direto que apesar da baixa complexibilidade e custo, devem ser realizados por profissionais capacitados. Segundo Brummer et al.²⁵ o melhor e mais rápido caminho para estabelecer o diagnóstico deste agente fúngico é o exame direto a partir de amostras clínicas que permitam sua detecção. Em uma série de estudos por diferentes grupos na América Latina, a sensibilidade do exame direto variou entre 85 a 100%.

CONCLUSÕES

O diagnóstico definitivo da PCM é obtido principalmente por exame a fresco do material biológico através do exame direto, que ressaltamos ser de baixo custo e baixa complexidade, no entanto, requer profissional qualificado e com treinamento para reconhecimento da estrutura do agente no material analisado.

A diferença na demanda natural das solicitações para este diagnóstico entre os LR-IAL, pode estar relacionada com endemicidade da região, busca e/ou suspeita da doença e encaminhamento das amostras para os Laboratórios de referência da Rede Pública.

Observamos que os estudos epidemiológicos poderiam ser realizados caso o preenchimento das requisições de exames fossem realizados com maior critério e rigor. Porém, a casuística estudada neste trabalho apresentou dados suficientes que corroboram com a literatura existente¹⁷.

Após 98 anos da descrição pioneira por Adolfo Lutz, a PCM ainda é foco de preocupação para a Saúde Pública, pois a taxa de positividade variou de 1,3 a 11,5% nos exames direto realizados na rede dos LR-IAL, podendo ser ainda maior caso fosse uma doença de notificação.

REFERÊNCIAS

1. Lutz A. Uma micose pseudococcídica localizada na boca e observada no Brasil: contribuição ao conhecimento das hifoblastomicoses americanas. *Brasil Méd* 1908; 22: 121-4.
2. Telles F. Paracoccidioidomicose. *Boletim Epidemiológico da Secretaria de Estado da Saúde no Paraná*. [http://www.saude.pr.gov.br/] 03/11/2003
3. Lacaz CS, Porto E, Martins JEC. Paracoccidioidomicose. In: Lacaz CS, Porto E, Martins JEC. *Micologia médica: fungos, actinomicetos e algas de interesse médico* 8ª ed. São Paulo: Ed. Savier; 1991. p.248-98.
4. Negroni R. Paracoccidioidomycosis (South American Blastomycosis, Lutz Mycosis). *Int J Derm* 1993; 32: 847-59.
5. Severo LC, Kauer CL, Oliveira FM, Rigati RA, Hartmann AA, Londero AT. Paracoccidioidomycosis of the male genital tract. Report of eleven cases and review of Brazilian literature. *Rev Inst Med Trop* 2000; 42: 38-40.
6. Bastos AGD, Martins AG, Cunha FC, Marques MPC, Melo PP, Tomita S, Alonso VMO. Paracoccidioidomicose Laríngea. Estudo retrospectivo de 21 anos. *Rev Brás Otorrinolaringologia* 2001; 67: 84-5.
7. Villa LA, Tobón A, Restrepo A, Calle D, Rosero DS, Gómez BL. Central Nervous System Paracoccidioidomycosis. Reports of a case successfully treated with Itraconazol. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 2000; 42: 231-4.
8. Pereira W C, Raphael A, Sallum J. Lesões neurológicas na blastomicose sul americana. Estudo anátomo-patológico de 14 casos. *Arq Neuropsiquiatr* 1965; 23: 95-112.
9. Pla MP, Hartung C, Medonza P, Stukanoff A, Moreno M J. Neuroparacoccidioidomycosis: case reports and review. *Mycopathologia* 1994; 127: 139-44.
10. Greer DL, Retrepo A. La epidemiologia de la paracoccidioidomycosis. *Bol de la Of Sanit Panamericana* 1977; 82: 428-45.
11. Veras KN. Paracoccidioidomicose. Estudo epidemiológico e clínico de pacientes internados no Hospital de Doenças Infecto-Contagiosas (HIDC) em Teresina, Piauí. Identificação de reserváreas nos Estados do Pará e Maranhão [Tese de Mestrado]. Teresina PI: Instituto Oswaldo Cruz/ Universidade Federal do Piauí, 1995. 156 pp.
12. Londero AT, Ramos CD. Paracoccidioidomicose: estudo clínico micológico de 260 casos observados no interior do Rio Grande do Sul. *J. Pneumol* 1990; 16:129-32.
13. Restrepo-Moreno, A. Ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*. In: Franco M, Lacaz CM., Restrepo-Moreno A, Delnegro G. editores. *Paracoccidioidomycosis*. Boca Raton: CRC Press, 1994.
14. Fava SDC, Favaretto C, Costa E, Cucel C. Distribuição geográfica e mortalidade da Paracoccidioidomicose no Estado de São Paulo. *Rev Microbiol* 1987; 18: 349-56.
15. Pereira AJCS, Barbosa W. Inquérito intradérmico para paracoccidioidomicose em Goiânia, *Rev Patol Trop* 1988; 17: 157-86.
16. Silva-Vergara ML, Martinez R. Inquérito epidemiológico com paracoccidioidina e histoplasmina em área agrícola de café em Ibiá, Minas Gerais, Brasil. *Rev Iberoam Micol* 1998; 15: 294-7.
17. Paniago AMM, Aguiar JIA, Aguiar ES, Cunha RV, Pereira GROL, Londero AT, Wanke B. Paracoccidioidomicose: estudo clínico e epidemiológico de 422 casos observados no Estado de Mato Grosso do Sul. *Rev Soc Bras Med Trop* 2003; 36:455-9.
18. Gonçalves AJR, Londero AT, Terra GMF, Rosebaum R, Abreu TF, Nogueira SA. Paracoccidioidomycosis in children in the State of Rio de Janeiro (Brasil). Geographic distribution and the study of a "reservarea". *Rev Med Trop S Paulo* 1998; 40: 11-3.
19. Wanke B, Londero AT. Epidemiology and Paracoccidioidomycosis Infection. In: Franco M, Lacaz CM., Restrepo-Moreno A, Delnegro G. editores. *Paracoccidioidomycosis*. Boca Raton: CRC Press, 1994. p.109-20.
20. Tobón AM, Orozco B, Estrada Santiago JA, Ramillo E, Bedout C, Arango M, Restrepo A. Paracoccidioidomycosis and AIDS: Report of the first two colombian cases. *Rev Med Trop S Paulo* 1998; 40: 377-81.
21. Aires MA, Alves CAC, Ferreira AV, Moreira IM, Pappalardo MCSM, Peluso D, Silva RJC. Bone Paracoccidioidomycosis in an HIV-Positive Patient. *Braz J Infect Dis* 1997; 1: 260-5.
22. Coutinho Z.F, Silva D, Lazerda M. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980 – 1995). *Cad Saúde Pública* 2002; 18(5): 1441-54.
23. Cermeño JR, Hernández I, Godoy G, Cabello I, Cermeño JJ, Orellán Y, Blanco Y. Casuística de las micosis en el Hospital Universitario "Ruiz Y Páez. Ciudad Bolívar, Venezuela, 2002. *Invest Clin* 2005; 46: 37-42.
24. Fernando OP, Ciro MV, Juan Carlos FL, Rosario VM, Juan AP, Kristien VB, Oscar NC, Jorge AZ, Beatriz BR, Eduardo GH. Micosis ganglionar: Report de 7 casos en el Hospital Nacional Cayetano Heredia Lima-Perú y Revisión de la literatura. *Rev Med Hered* 2004; 15 (4): 211-7.
25. Brummer E, Castaneda E, Restrepo A. Paracoccidioidomycosis an update. *Clin Microbiol Rev* 1993; 6(2): 89-117.

A determinação de nitrato em águas por espectrofotometria UV: usos e precauções

The nitrate determination in water by UV spectrophotometry: uses and precautions

RIALA6/1066

Marco A. M. SOUTO¹, Marina M. OKADA¹, Isaura A. OKADA¹, Sérgio DOVIDAUSKAS^{1*}

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

Recebido: 31/03/2006 – Aceito para publicação: 04/07/2006

RESUMO

Esta breve comunicação procura ressaltar algumas interferências espectrais na determinação de nitrato em águas por métodos espectrofotométricos na região UV. São analisados dois métodos: o primeiro utiliza a absorbância em 220 nm (com correção empírica para a presença de matéria orgânica) e o segundo faz a leitura da absorbância em 205 nm (sem qualquer tipo de correção). Usando este segundo método, foi realizado um estudo de interferência para o íon cloreto. Observou-se que a interferência de cloreto é notada em concentrações acima de 50 mg L⁻¹, aproximadamente. Ademais, algumas atividades de interferência do íon nitrito e de surfatantes foram também investigadas.

Palavras-Chave. nitrato, espectrofotometria UV, água, interferências espectrais.

ABSTRACT

The present short communication proposes to point out some spectral interferences on nitrate determination in water by means of UV spectrophotometry methods. Two techniques were analysed: the first technique employed absorbance value at 220 nm (with empirical correction in presence of organic material), and for the second one the absorbance value at 205 nm (without any correction factor) was used for reaction reading. Based on the second technique an interference study on chloride ion was performed. Chloride interference was noted at concentrations above 50 mg L⁻¹ approximately. Additionally, some interferences activities from nitrite and surfactants were shallowly investigated.

Key Words. nitrate, UV spectrophotometry, water, spectral interferences.

INTRODUÇÃO

A determinação precisa e acurada das concentrações de nitrato em águas para consumo humano tem se tornado objeto de interesse em Saúde Pública frente à contaminação antropogênica do meio ambiente e às associações que se tem feito entre o consumo de águas com níveis elevados de nitrato e a incidência de metahemoglobinemia e de diversos tipos de câncer^{1,2,3,4}. O íon nitrato ocorre geralmente em concentrações relativamente baixas em águas superficiais, mas pode atingir níveis altos em águas subterrâneas; é encontrado em pequenas quantidades em águas residuárias domésticas, mas alcança concentrações superiores a 30 mg de nitrato como nitrogênio por litro em efluentes de plantas de tratamento biológico nitrificante⁵. Um limite de 10 mg de nitrato como N/L em águas potáveis tem sido imposto em países como o Brasil⁶ e os Estados Unidos⁵.

Embora existam vários métodos analíticos disponíveis, a determinação da concentração de nitrato em soluções aquosas não é tarefa trivial: os procedimentos, em sua maioria, são relativamente complexos e as faixas de concentração de alguns dos métodos analíticos são limitadas, além de existir a alta probabilidade da presença de interferentes. A cromatografia iônica, por exemplo, embora permita medidas rápidas e simultâneas com outros íons de interesse (como cloreto, fosfato, sulfato e nitrito), é uma técnica relativamente cara, não estando livre de interferentes; já métodos envolvendo a pré-redução do nitrato para nitrito em coluna de cádmio, seguido de desenvolvimento de cor por diazotização, são trabalhosos e, novamente, sujeitos à interferentes⁵. Assim, os métodos mais simples disponíveis, baseados em espectrofotometria na região UV, são extremamente atraentes devido não somente à simplicidade mas também devido ao baixo custo. Contudo, tais métodos também sofrem sérias limitações no que diz respeito a

interferentes, sendo imprescindível que o analista esteja atento a tal situação.

O primeiro (e mais antigo) método UV constitui-se na acidificação de 50 mL da amostra de água com 1 mL de HCl 1 mol L⁻¹, seguindo-se leitura da absorbância em 220 nm com correção para absorção não específica (oriunda de matéria orgânica porventura presente) e comparação com curva padrão previamente estabelecida⁵. Esta correção totalmente empírica é baseada na leitura da absorção em 275 nm, onde nitrato não absorve. Para calcular a absorção devida ao nitrato, subtrai-se do sinal em 220 nm duas vezes a absorção em 275 nm (neste método, estima-se que a absorção devida a compostos orgânicos seja duas vezes maior em 220 nm do que em 275 nm), salientando-se que se esta correção (a absorbância em 275 nm multiplicada por 2) for maior do que 10% do valor da absorbância em 220 nm, o método não deve ser aplicado devido à suspeita de quantidade considerável de compostos orgânicos interferindo significativamente no sinal. Interessante observar que no artigo de Mazon et al.⁷, este critério não foi adequadamente descrito. Transcrevendo *ipsis litteris* do quarto parágrafo, primeira coluna, da página 112 da “Revista do Instituto Adolfo Lutz”, onde consta o referido artigo: “...*O valor da absorbância referente ao íon nitrato ($\lambda=220$ nm) deve ser corrigido para interferências de compostos orgânicos ($\lambda=275$ nm) através da fórmula: $A = A_{220} - 2A_{275}$. Se o valor das absorbância corrigida (A) for maior que 10% do valor da absorbância a 220 nm (A_{220}), o método não deve ser usado...*” Usando a simbologia dos autores, a condição para ser possível a utilização do método seria $A < 0,1 \cdot A_{220}$ – no entanto, o método original recomenda o limite $2 \cdot A_{275} < 0,1 \cdot A_{220}$.

Devido à sua natureza empírica, este fator de correção depende da origem da água e, conseqüentemente, pode variar; idealmente, ele deve ser estabelecido pelo analista através de estudos baseados em técnicas de adição de padrões e em análises por outros métodos analíticos (cromatografia iônica ou potenciometria com eletrodo íon seletivo, por exemplo). Em resumo: uma correção adequada poderia exigir que a absorção em 275 nm fosse multiplicada por um número diferente de 2, ou até mesmo que não fosse aplicada. Tal fato adquire importância se levarmos em consideração as dimensões de um país como o Brasil e a diversidade das origens das águas consumidas pela população nas diferentes regiões.

Este método (leitura em 220 nm, correção em 275 nm) é oriundo do “Standard Methods for Examination of Water and Wastewater”⁵. Curiosamente, ele foi inicialmente desenvolvido na década de 50 não para a análise de nitrato em águas, mas sim para a análise de nitrato (como contaminante) em carbonatos de metais alcalino terrosos, utilizados na indústria eletrônica como materiais de recobrimento de catodos: Bastian et al.⁸ trataram amostras dos carbonatos com ácido perclórico, seguindo-se leituras das absorbâncias em 210 ou 220 nm – os autores decidiram não trabalhar com o comprimento de onda da máxima absorção (203 nm, nas condições analíticas empregadas) por considerar que muitas interferências tornavam-se muito mais importantes em 203 nm do que nos outros dois

comprimentos de onda, o que não justificava a relativamente pequena melhoria na sensibilidade ao se efetuar a leitura em comprimentos de onda menores. Estimaram, por exemplo, que a interferência do íon cloreto era aproximadamente 20 vezes maior em 203 do que em 210 nm. Além disso, a correção para orgânicos não foi aplicada por, simplesmente, não ser necessária: as matrizes eram inorgânicas.

Em 1961 o método para a determinação de nitrato por espectrofotometria UV em 220/275 nm foi proposto para águas potáveis em uma forma muito semelhante à atual – somente o fator de correção era diferente: Goldman e Jacobs⁹ propuseram que a absorbância em 275 nm fosse multiplicada por 2,5 antes de ser subtraída da absorbância em 220 nm. Finalmente, este método UV, como é aplicado hoje, consta como método tentativo na 13ª edição do “Standard Methods for Examination of Water and Wastewater” de 1971¹⁰ que já indicava como interferentes os surfatantes e os íons nitrito e Cr⁶⁺, além da provável presença de orgânicos – a acidificação com HCl 1 mol L⁻¹ elimina a interferência de hidróxido e de carbonatos (até 1000 mg L⁻¹, como CaCO₃).

Um segundo método UV para a análise de nitrato em águas foi proposto recentemente¹¹. É baseado na acidificação de 100 mL da amostra de água com 1 mL de HCl 1 mol L⁻¹, seguindo-se leitura da absorbância em 205 nm (sem qualquer tipo de correção) e comparação com curva padrão previamente estabelecida. Chama a atenção na descrição deste método, a falta de qualquer tipo de informação a respeito de interferentes, principalmente levando-se em consideração a região de comprimentos de onda que faz uso, muito sujeita à absorção não somente de compostos orgânicos mas também de espécies inorgânicas como Cl⁻, por exemplo, como discutido anteriormente.

Desta forma, e focalizando a atenção na questão das interferências espectrais, é objetivo desta comunicação fazer uma contribuição inicial à discussão quanto à segura e confiável aplicabilidade do método UV de leitura direta da absorbância em 205 nm na determinação de nitrato em águas para consumo humano, frente a suas limitações intrínsecas (oriundas da região do espectro eletromagnético em que procura trabalhar), tendo em vista sua recente proposição no livro “Métodos físico-químicos para análise de alimentos”¹¹, preparado pelo Instituto Adolfo Lutz e editado pelo Ministério da Saúde.

MATERIAL E MÉTODOS

O HCl, o KNO₃, o NaNO₂ e o NaCl utilizados (todos da marca Merck) eram de grau analítico. O detergente neutro Extran® (Merck) foi utilizado diluindo-se o produto concentrado. As soluções padrão 100 mg L⁻¹ em NO₃⁻, 100 mg L⁻¹ em NO₂⁻ e 1000 mg L⁻¹ em Cl⁻ foram preparadas como descrito na literatura¹¹ a partir de KNO₃, NaNO₂ e NaCl, respectivamente.

As medidas de absorbância, assim como o registro dos espectros eletrônicos de soluções aquosas de NaCl, de NaNO₂ e de Extran® neutro, foram realizadas em espectrofotômetro marca Hach modelo DR 4000U.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No intuito de constatar a extensão da absorção de cloreto na região UV de interesse, foram preparadas 5 soluções padrão de Cl^- em água destilada e desionizada, a partir de diluições da solução padrão 1000 mg L^{-1} . Após as preparações, as soluções continham 50, 100, 150, 250 e 350 mg L^{-1} de Cl^- . Esta última concentração foi incluída no estudo por ser aproximadamente a mesma que a produzida pela adição de 1 mL de $\text{HCl } 1 \text{ mol L}^{-1}$ a 100 mL de água isenta de cloretos. Os espectros eletrônicos foram então registrados entre 200 e 225 nm e estão mostrados na Figura 1A, onde podemos observar que, realmente, a absorção de cloreto torna-se cada vez maior à medida que decresce o comprimento de onda, sendo menos significativa em 210 nm e nula em 220 nm . O coeficiente de absorção molar (ϵ) em 205 nm foi estimado em $3,1 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$ (a solução 1 mL de $\text{HCl } 1 \text{ mol L}^{-1}/100 \text{ mL}$ de água apresentou uma absorbância em torno de 0,028). A alternativa de se utilizar H_2SO_4 nas mesmas condições (1 mL de H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}/100 \text{ mL}$ de água) diminuiria a interferência espectral pois a absorbância em 205 nm nestas condições é, aproximadamente, 0,010, mas a possibilidade de turvação da solução pela precipitação de sulfatos pouco solúveis poderia comprometer o resultado, uma vez que os dois métodos aqui discutidos são de calibração univariada. Por exemplo: ao se adicionar 1 mL de H_2SO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ a 100 mL de uma amostra de água contendo

20 mg de Ca^{2+} (500 mg L^{-1} como CaCO_3 , o valor máximo permitido para a dureza de uma água para consumo humano segundo a Portaria 518⁶), o quociente de reação de precipitação Q_{ps} do CaSO_4 é aproximadamente $2,5 \times 10^{-5}$, um valor um pouco maior que o produto de solubilidade K_{ps} do CaSO_4 (igual a $2,4 \times 10^{-5}$ a 25°C)¹²; a interferência pode adquirir mais importância se a amostra de água estiver sujeita à presença de outros cátions que produzam sulfatos com valores de K_{ps} ainda menores (por exemplo, os íons contaminantes Ba^{2+} e Pb^{2+})¹².

Para estimar o impacto desta absorção de cloreto em 205 nm na determinação de nitrato em águas através do método proposto pelo Instituto Adolfo Lutz¹¹, foram preparadas 35 soluções padrão $1,00 \text{ mg L}^{-1}$ em nitrato a partir da solução estoque 100 mg L^{-1} , contaminando-se as soluções com concentrações crescentes de cloreto a partir da solução 1000 mg L^{-1} em cloreto. Cada contaminação foi efetuada em 7 réplicas e cada solução apresentou um volume final de 100 mL . Assim, 7 soluções padrão $1,00 \text{ mg L}^{-1}$ em nitrato não foram contaminadas (concentração de cloreto adicionado na forma de $\text{NaCl} = 0 \text{ mg L}^{-1}$), outras 7 foram contaminadas com 50 mg L^{-1} de Cl^- , outras 7 com 100 mg L^{-1} de Cl^- , e assim sucessivamente até uma contaminação máxima de 250 mg L^{-1} em Cl^- (esta concentração coincide com o valor máximo permitido para cloreto segundo a Portaria 518⁶, que estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de

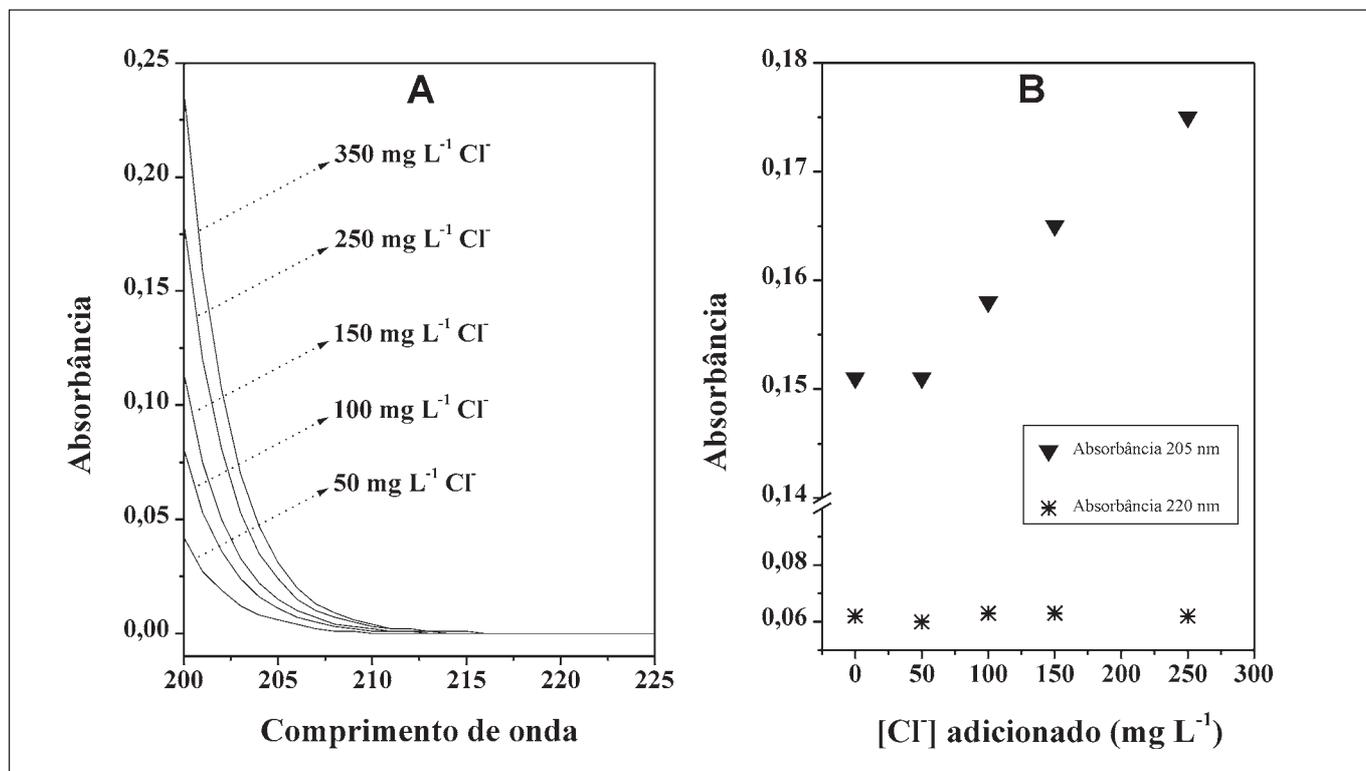


Figura 1. (A) Espectros eletrônicos de soluções padrão de cloreto. (B) Absorção em 205 e 220 nm de soluções padrão $1,00 \text{ mg L}^{-1}$ em nitrato, contaminadas com concentrações crescentes de cloreto.

potabilidade). A seguir, após a adição de 1 mL de HCl 1 mol L⁻¹ a cada solução, foram realizadas as leituras de absorvância em 205 e 220 nm. Os resultados, mostrados na Figura 1B, sugerem que a interferência positiva de cloreto na absorção de nitrato em 205 nm passa a ser observada a partir de 50 mg L⁻¹, aproximadamente. Por outro lado, pode também ser observado nesta Figura 1B que a absorção em 220 nm de soluções padrão 1,00 mg L⁻¹ em nitrato não sofre interferência na faixa de concentração de cloreto investigada (0 a 250 mg L⁻¹).

Esta interferência positiva de cloreto conduz a uma questão prática importante: ao utilizarmos o método proposto pelo Instituto Adolfo Lutz, estamos introduzindo um interferente através da adição de 1 mL de HCl 1 mol L⁻¹. Para que esta adição não resulte em desvios de exatidão, o branco da análise (água destilada e desionizada), as soluções padrão da curva de calibração e as amostras de água devem receber exatamente a mesma quantidade de HCl. Tal fato não é salientado na descrição do método e adquire importância se levarmos em consideração que é prática comum fazer este tipo de adição através de pipetas graduadas não calibradas (ou de outros dosadores não calibrados). Interessante notar que Mazon et al.⁷, ao modificar este método fazendo a adição de 1 mL de HCl 1 mol L⁻¹ a 50 mL das soluções padrão de nitrato e das amostras, observaram desvios de linearidade da curva de calibração além de perda de precisão: uma provável origem para estas dificuldades pode estar relacionada ao aumento da concentração do interferente Cl⁻ (de 350 para 700 mg L⁻¹,

aproximadamente) ao se diminuir o volume das soluções – uma variação, por exemplo, de ± 10% no volume adicionado de HCl (0,9 a 1,1 mL) produziria concentrações de Cl⁻ na faixa de 630 a 770 mg L⁻¹, causando diferentes contribuições ao sinal supostamente oriundo apenas do íon nitrato.

Outro possível interferente inorgânico no método proposto pelo Instituto Adolfo Lutz é o íon nitrito. A acidificação com 1 mL de HCl 1 mol L⁻¹ conduz à formação de HNO₂ propiciando, inclusive, mecanismos mais favoráveis para a transformação nitrito → nitrato: HNO₂ em meio aquoso prontamente desproporciona-se através da reação $3\text{HNO}_{2(aq)} \rightarrow \text{NO}_{3(aq)}^- + 2\text{NO}_{(g)} + \text{H}_3\text{O}_{(aq)}^+$, com potencial padrão e constante de equilíbrio iguais a 0,05V e 50, respectivamente¹³. Esta acidificação reduz a absorção na região, mas não a níveis que possam ser negligenciados, como indicado na Figura 2A. Nesta figura também podemos observar a já relatada interferência deste íon no método descrito no “Standard Methods for Examination of Water and Wastewater” (leitura da absorvância em 220 nm)⁵.

Um outro interferente citado no método do “Standard Methods for Examination of Water and Wastewater” e que também influencia os resultados no método proposto pelo Instituto Adolfo Lutz é a presença de surfatantes. A Figura 2B mostra o espectro eletrônico de um surfatante muito utilizado por laboratórios na limpeza de vidrarias de precisão. Interessante observar que, neste caso, apesar da significativa absorção na região de interesse, o monitoramento de orgânicos pela leitura

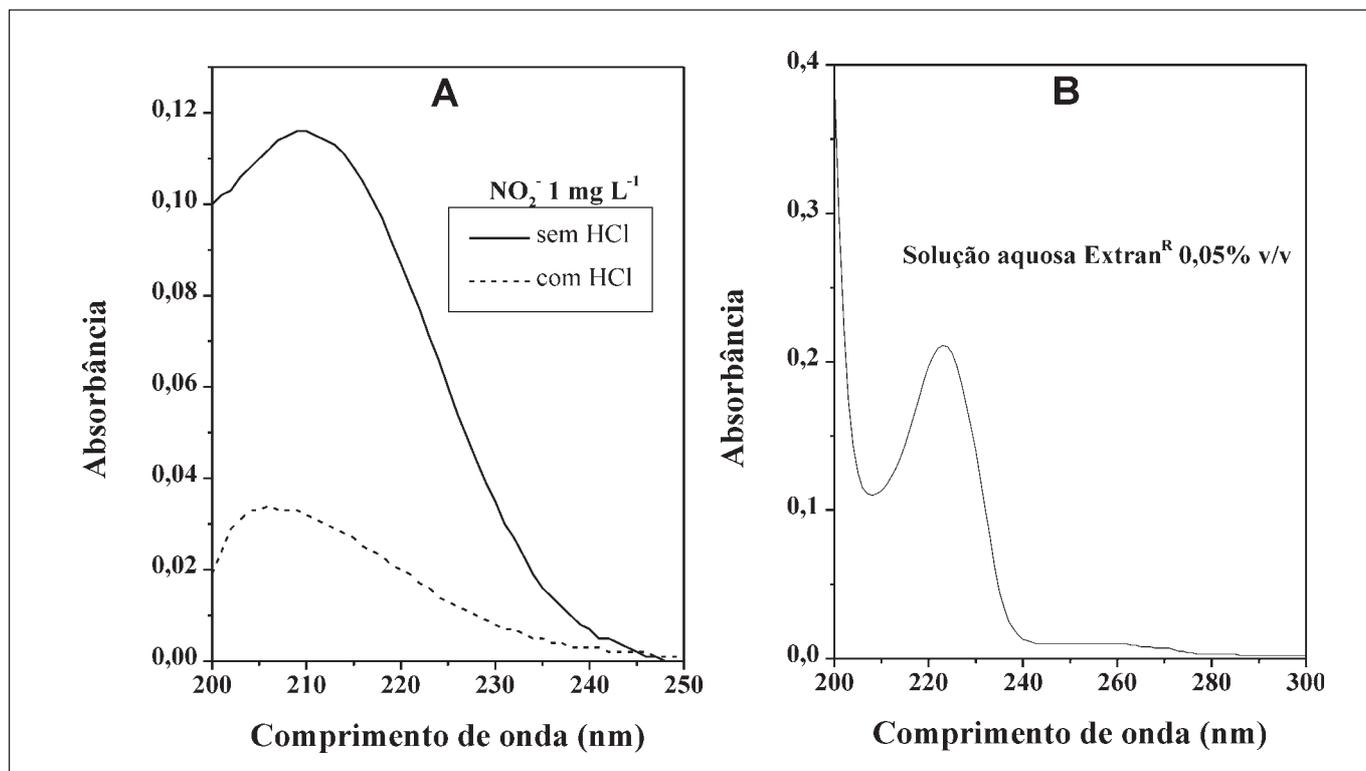


Figura 2. (A) Espectros eletrônicos de solução aquosa de nitrito 1 mg L⁻¹ na ausência (linha cheia) e presença (linha tracejada) de HCl. (B) Espectro eletrônico de solução aquosa de Extran® neutro 0,05 % v/v. *Clin Microbiol Rev* 1993; 6(2): 89-117.

da absorvância em 275 nm não produziria o efeito esperado, ou seja, um controle sobre a presença do contaminante interferindo no sinal analítico, uma vez que o surfatante analisado possui absorção muito baixa em 275 nm. Em resumo: ambos os métodos (“Standard Methods for Examination of Water and Wastewater” e Instituto Adolfo Lutz) são vulneráveis a este tipo de interferência.

CONCLUSÕES

Métodos espectrofotométricos UV para a determinação de nitrato em águas são extremamente atraentes devido à simplicidade e ao baixo custo, mas o uso de tais métodos deve ser criterioso tendo em vista as interferências na região do espectro em que procuram trabalhar e o conhecimento prévio que se deve ter da origem da amostra de água a ser analisada. O método oriundo do “Standard Methods for Examination of Water and Wastewater”, embora inclua em seu procedimento uma correção para a presença de orgânicos, não é absolutamente infalível neste propósito pois a correção é essencialmente empírica. Por outro lado, o método proposto pelo Instituto Adolfo Lutz, que apresenta a deficiência de introduzir o interferente íon cloreto, além de presumir já antes da análise da água que se trata de uma amostra sem qualquer tipo de contaminação orgânica, presume também que espécies inorgânicas não estarão presentes em quantidades suficientes para causar interferências. Se considerarmos a diversidade de origens das águas para consumo humano em um país com as dimensões do Brasil, tais suposições podem conduzir a resultados carentes de exatidão.

O exposto acima indica que os dois métodos espectrofotométricos UV citados para a determinação de nitrato em águas não devem ser utilizados como análises conclusivas, mas, isto sim, podem atuar como uma avaliação exploratória inicial, procurando-se determinar aproximadamente a faixa de concentração de NO_3^- , de modo a escolher a estratégia analítica mais adequada à análise (diazotização, cromatografia de íons, etc), como já sugerido anteriormente^{5,10}. Por exemplo: o método de leitura em 220 e 275 nm poderia ser o mais útil para realizar de forma exploratória um grande número de amostras de águas potáveis para verificar a aceitabilidade tendo-se em mente a Saúde Pública – se alguma amostra apresentasse teor significativo de NO_3^- , este teor poderia ser confirmado por técnicas alternativas.

Apesar das dificuldades apontadas, a espectrofotometria UV, assim como outras técnicas analíticas, têm tido a gama de aplicações significativamente aumentada, assim como melhorada a qualidade dos resultados, pela aplicação de métodos quimiométricos¹⁴. Karlsson et al.¹⁵, por exemplo, utilizaram a espectrofotometria UV com calibração multivariada na determinação de nitrato em águas residuárias da cidade de Estocolmo (Suécia), sem qualquer tipo de pré-tratamento (como

filtração, decantação, etc) ou adição de reagentes, utilizando 316 valores de absorvância na faixa entre 190 a 820 nm. Segundos os autores, outros analitos podem também ser simultaneamente determinados quantitativamente (como fósforo total, nitrogênio total, nitrogênio amoniacal e ferro). Contudo, os mesmos autores alertam que o modelo de calibração desenvolvido não implica que o mesmo possa ser utilizado em áreas geográficas com diferentes parques industriais daquele existente em Estocolmo.

REFERÊNCIAS

1. Baird C. Environmental Chemistry. 2nd ed. New York: W. H. Freeman and Company; 2000.
2. Weyer PJ, Cerhan JR, Kross BC, Hallberg GR, Kantamneni J, Breuer G, et al. Municipal drinking water nitrate level and cancer risk in older women: the Iowa women's health study. *Epidemiology* 2001;11:327-38.
3. Ward MH, Mark SD, Cantor KP, Weisenburger DD, Correa-Villasenor A, Law GR, et al. Non-Hodgkin's lymphoma and nitrate in drinking water. *J Epidemiol Community Health* 2000;54:772-3.
4. Cocco P, Broccia G, Aru G, Casula P, Muntoni S, Cantor KP, et al. Nitrate in community water supplies and incidence of non-Hodgkin's lymphoma in Sardinia, Italy. *J Epidemiol Community Health* 2003;57:510-1.
5. American Public Health Association (US), American Water Works Association (US), Water Environment Federation (US). Inorganic nonmetallic constituents / Nitrate. Eaton AD, Clesceri LS, Greenberg AE, editores. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* 19th ed. Washington (DC): American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation; 1995. p. 4-85 e 4-86.
6. Brasil. Portaria nº 518 de 2004 do Ministério da Saúde. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 26 mar. 2004.
7. Mazon EMA, Oliveira ACG, Brígido BM, Freitas VPS. Estudo comparativo de métodos para a determinação de nitrato em águas para consumo humano. *Rev Inst Adolfo Lutz* 2005;64:110-6.
8. Bastian R, Webwerling R, Paliilla F. Ultraviolet spectrophotometric determination of nitrate - Application to analysis of alkaline earth carbonates. *Anal Chem* 1957;29:1795-7.
9. Goldman E, Jacobs R. Determination of nitrates by ultraviolet absorption. *J Am Water Works Assoc* 1961;53:187-91.
10. American Public Health Association (US), American Water Works Association (US), Water Pollution Control Federation (US). Physical and chemical examination of natural and treated waters in the absence of gross pollution / Nitrogen (Nitrate). Taras MJ, Greenberg AE, Hoak RD, Rand MC, editores. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 13th ed. Washington (DC): American Public Health Association (US), American Water Works Association (US), Water Pollution Control Federation (US); 1971. p. 237-9.
11. Instituto Adolfo Lutz. Métodos físico-químicos para análise de alimentos 4^a ed. Brasília: Ministério da Saúde / Agência Nacional de Vigilância Sanitária; 2005.
12. Atkins P, Jones L. Princípios de Química - Questionando a vida moderna e o meio ambiente. Cararelli I, Zukerman-Spector J, Camillo RL, Lemos FCD, Santos RHA, Gambardella MTP et al tradutores. Porto Alegre: Bookman; 2002.
13. Shriver DF, Atkins PW. Inorganic Chemistry. 3rd ed. Oxford: Oxford University Press; 1999. p.384.
14. Miller JN, Miller JC. Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry. 4th ed. Dorchester: Pearson Education Limited; 2000.
15. Karlsson M, Karlberg B, Olsson RJO. Determination of nitrate in municipal waste water by UV spectroscopy. *Anal Chim Acta* 1995;312:107-13.

Nasal immunization in rabbits with *Neisseria lactamica*: the importance of the cross reactive antigens

Tunes, C. F. **Imunização nasal em coelhos com *Neisseria lactamica* : importância dos antígenos de reatividade cruzada.** São Paulo, SP, 2006 [Dissertação de Mestrado - Programa de Pós- Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/ Instituto Butantan/ IPT]. Orientadora: Profa. Dra. Elizabeth De Gaspari

Neisseria lactamica, a commensal bacterium non-pathogenic to human beings and usually found in the upper respiratory tract of children, is closely related to pathogenic *Neisseria meningitidis*. Colonization with *N. lactamica* can be responsible for evolving natural immunity to meningococcal infection in childhood, when rates of meningococcus carriers are low. These features lead to suggest that *N. lactamica* components can be key-elements in the production of a new vaccine for *N. meningitidis*. As little is known about dynamic carriers and *N. lactamica* population diversity in children, it has been difficult choosing a representative for preparing an adequate immunogenic product. A protocol was proposed to study immunogenicity of *whole cells* of *N. lactamica*, *N. meningitidis*, *N. sicca* or *N. meningitidis c* (carrier-isolated) by i.n. immunization in rabbits considering the natural pathogen entry route. Oropharynx-isolated *N. lactamica*, *N. meningitidis*, *N. sicca*, or *N. meningitidis c* were i.n. inoculated into adult rabbits, in a concentration of optical density 1.0 at 650nm in a volume of 1000 µL. The rabbits were immunized four times at seven-day intervals. *N. subflava*, *N. elongata*, *N. sicca*, *N. perflava*, *N. mucosa* strains isolated from CSF and blood were

also used. The rabbits developed levels of specific IgG antibodies in serum, as determined by ELISA using *whole cells* of homologous and heterologous strains. Serum from rabbits immunized with *N. lactamica*, *N. meningitidis*, and *N. sicca* or *N. meningitidis c*, presented IgG antibodies reactive to 5 to 130 kDa antigens on immunoblot. Antibodies in serum from rabbits immunized with *N. lactamica* failed to induce high concentration of antibodies with bactericidal activity against *N. meningitidis*; however, this activity could be observed with antibodies produced by rabbits i.n. immunized with *N. meningitidis*. High avidity IgG antibodies were produced, although a significant correlation between bactericidal activity and induction of IgG antibodies of high avidity could not be determined, mainly in rabbits immunized with *N. lactamica*. Intranasal immunization of *N. lactamica whole cells* was suitable to efficiently sensitize mucosal immune system in rabbit model.

Tese depositada na Biblioteca do Instituto de Ciências
Biomédicas da USP
Email: egaspari@ial.sp.gov.br

Ação antioxidante do α -tocoferol e do extrato de alecrim em óleo de soja submetido à termoxidação

Ramalho V. C. - **Antioxidant action of α -tocopherol and rosemary extract in soybean oil under thermoxidation.** São José do Rio Preto, SP, 2005 [Dissertação de Doutorado - Universidade Estadual Paulista – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – UNESP]. Orientador: Profa. Dra. Neuza Jorge

The aims of this work were to evaluate, in thermoxidation conditions, the behavior and antioxidant activity of α -tocopherol naturally present in soybean oil and the one added in purified soybean oil, the behavior and antioxidant activity of rosemary extract added in soybean oil with its original and purified tocopherols and, also, to verify rosemary influence on the resistance of natural α -tocoferol or the one added in soybean oil. In order to do that, three experiments were carried out. In the first one, a number of α -tocopherol or rosemary extract concentrations were added to the oil purified with alumina and, through a preliminary determination of the antioxidant activity, the concentrations of 600mg/kg for α -tocoferol and 1000mg/kg for rosemary extract were selected in order to be submitted to the further experiments. In the second and third experiments, the purified oil added with the selected concentrations of the cited antioxidants or the mixture of them and the natural oil added with the selected concentration of rosemary extract were heated until the temperature of 180°C during ten hours. The results obtained from the analytical determinations were submitted to variance analysis, in a

factorial scheme, employing the completely randomized statistical design, in order to determine the influence of antioxidant factors and periods of heating in relation to the oil alterations. From the obtained results, both α -tocopherol and rosemary extract demonstrated having a protecting effect on soybean oil against the oxidation originated by high temperature, but, in all analytical determinations, α -tocopherol action was superior in relation to the one from rosemary extract. The mixture of the two antioxidants, added in purified soybean oil, promoted a higher protecting effect comparing to the one obtained by the application of each one separately. In natural soybean oil, rosemary extract also came to be efficient in delaying oxidation. It was also observed that, during the heating, both natural α -tocopherol and the one added were more stable in the presence of rosemary extract.

Dissertação está disponível na Biblioteca do IBILCE
– UNESP – São José do Rio Preto - SP
E-mail: valeria_ramalho@yahoo.com.br

ISSN 0073-9855



9 770073 985009