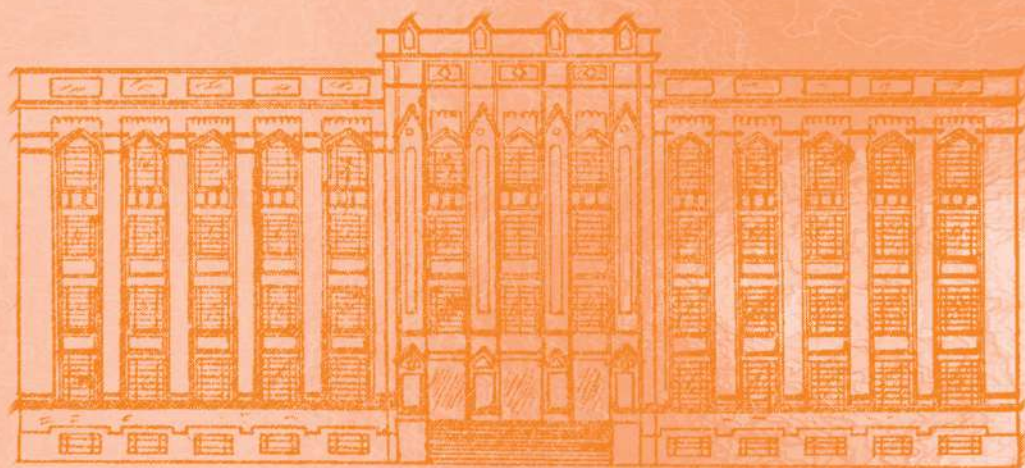


REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ

ISSN 0073-9855
RIALA6



Volume 64 número 2, 2005



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 semestral/ Bi-annual publication
Solicita-se permuta/ Exchange desired

Volume 64 número 2, 2005

ISSN 0073-9855

Julho - Dezembro - 2005

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
Marisa Ailin Hong
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,
2005, 64 (2)

ISSN 0073-9855
RIALA 6

CDD₁₈614.07205

(*) 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@ial.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/unifreqr/htm> .

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

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

Os títulos das revistas devem ser abreviados de acordo com o Index Medicus seja pela List of Journals Indexed in Index Medicus ou no "website" <http://www.nlm.nih.gov> ou pelo

Chemical Abstracts, ISI Science Citation Index, World List of Periodicals (publicado por Butterworks, Londres).

Exemplos

Artigos em revistas

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

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

- **Número com suplemento**

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

- **Volume com suplemento**

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

- **Instituição como autor**

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

- **No prelo (forthcoming)**

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

Livros e outras monografias

- **Indivíduo como autor**

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

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

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

- **Instituição como autor e editor**

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

- **Capítulo num livro**

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

- **Resumo/Trabalho de congresso publicado**

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

- **Dissertação/Tese**

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

- 1032 Valor nutricional de cogumelos comestíveis: uma revisão**
Nutritional value of edible mushrooms: a revision
Regina Prado Zanes FURLANI; Helena Teixeira GODOY 149-154
- 1033 Eletroforese em campo pulsante em bacteriologia – uma revisão técnica**
Pulsed field gel electrophoresis use in bacteriology – a technical review
Vanda D. MAGALHÃES; Joseane C. FERREIRA; Cristiane BARELLI; Ana Lúcia C. DARINI 155-161

Artigos Originais/ Original Articles

- 1034 Medidas da estabilidade oxidativa e compostos polares totais do óleo de soja refinado e da gordura vegetal hidrogenada em frituras**
Measurement of oxidative stability and total polar compounds in refined soybean oil and hydrogenated vegetable fat during frying procedure
Neuza JORGE; Patrícia de Carvalho DAMY; Mara da Silva CORSINI; Patrícia Vieira DEL RÉ 162-166
- 1035 Ácidos graxos saturados em produtos alimentícios: comparação de procedimentos na análise por cromatografia gasosa**
Saturated fatty acids in foodstuffs: comparison of procedures by means of gas chromatography analysis
Sabria AUED-PIMENTEL; Miriam Solange Fernandes CARUSO; Edna Emy KUMAGAI¹; Valter RUVIERI; Odair ZENE BON 167-172
- 1036 Água de diálise: parâmetros físico-químicos na avaliação do desempenho das membranas de osmose reversa.**
Dialysis water: Use of physical - chemicals parameters for evaluating the reverse osmosis membranes efficacy
Marise SIMÕES; Berenice M. BRÍGIDO; Elaine M.A. MAZON; Maria de Fátima C. PIRES 173-178
- 1037 Estudo integrado da qualidade das águas da bacia hidrográfica do rio Bonito em Descalvado - SP**
Integrated study on the water quality from rio Bonito watershed in Descalvado - SP
Helder Silva FONSECA; Nemésio Neves Batista SALVADOR 179-185
- 1038 Influência da irradiação gama (⁶⁰Co) na destruição da aflatoxina B₁ em amendoim (*Arachis hypogaea* L.)**
Effect of gamma-irradiation (⁶⁰Co) on aflatoxin B₁ inactivation in peanut (*Arachis hypogaea* L.)
Guilherme PRADO; Eliana P. CARVALHO; Marize S. OLIVEIRA; Jovita E. C. M. GAZZINELLI; Vanessa D. MORAES; Ricardo F. CORRÊA; Valbert N. CARDOSO; Thais V. SOARES 186-192

- 1039 Otimização de metodologia por CCD para determinação de aflatoxina M₁ em leite de cabra e investigação de sua ocorrência no Estado da Bahia**
Improvement on thin layer chromatography technique for determining aflatoxin M₁ in goat milk, and investigation of its occurrence in samples from State of Bahia
Mariana B. BOTURA; Monica M.S. SIMAS; Myrna SABINO; Maria José M. BATATINHA 193-199
- 1040 Análise de sucralose por cromatografia líquida de alta eficiência em refrigerante dietético e adoçante de mesa**
Analysis of sucralose by high performance liquid chromatography in diet soft drink and table top sweetener
Iracema de Albuquerque KIMURA; Cristiane Bonaldi CANO; Letícia Araújo Farah NAGATO; Maristela Satou MARTINS 200-204
- 1041 Qualidade química e física do leite de cabra distribuído no programa social “Pacto Novo Cariri” no Estado da Paraíba**
Chemical and physical quality of goat milk distributed in the social program “New Pact Cariri” of State of Paraíba, Brazil
Renata Â. G. PEREIRA; Rita de C. R. E. QUEIROGA; Rodrigo P. T. VIANNA; Maria Elieidy G. de OLIVEIRA ... 205-211
- 1042 Avaliação da qualidade higiênico-sanitária do leite exposto ao consumo na região metropolitana de Belém-PA**
Evaluation of milk in Brazilian Northern metropolitan region. Hygienic-sanitary quality assessment
José de Arimatéa FREITAS; Jefferson Pinto de OLIVEIRA; Glauco Antonio Rocha GALINDO 212-218
- 1043 Avaliação da atividade de água e da contaminação por bolores e leveduras em mel comercializado na cidade de São Paulo – SP, Brasil**
Assessment of water activity and molds and yeasts contamination in honey traded on São Paulo city -SP, Brazil
Celina Adriana S. DENARDI; Érica Junko NISHIMOTO; Simone C. Balian; Evelise Oliveira TELLES 219-222
- 1044 Composição centesimal e teor de colágeno em carne bovina moída**
Proximate composition and collagen content in beef minced meat
Jussara C. M. DELLA TORRE; Nelson J. BERAQUET 223-231
- 1045 Estudo da influência do cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal) sobre a concentração sérica de glicose**
Cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal) influence on the concentration of glucose in rat blood
Lucia K. O. YUYAMA; Zânia R. F. PEREIRA; Jaime P. L. AGUIAR; Danilo F. SILVA FILHO; Risonilce F. S. SOUZA; Antonia P. TEIXEIRA 232-236
- 1046 Contaminação por matérias estranhas e microrganismos em farináceos comercializados em Ribeirão Preto, SP**
Extraneous materials and microorganisms contamination in flours for sale in Ribeirão Preto, SP.
Sonia de Paula Toledo PRADO; Antonio Ribeiro FRANCO; Luiz de SOUZA; Maria Aparecida de OLIVEIRA; Marlene CORREIA 237-244
- 1047 Isolamento, caracterização e resistência a antimicrobianos de bactérias Gram-negativas aeróbias e anaeróbias facultativas de amostras de solo.**
Isolation, characterization and antimicrobial resistance of aerobic and facultatively anaerobic Gram-negative bacteria from soil samples
Paulo da SILVA; Ana Maria Machado CARNEIRO; Maria Claudia CARLONI; Marta Inês Cazentini MEDEIROS; Jaqueline Otero SILVA; Silvia Helena Chinarelli RECHE; Maria Clarice ERRERA; Suzel Nogueira NEME 245-251
- 1048 Biological response of rats to resistant starch**
Resposta biológica de ratos ao amido resistente
Melissa WALTER; Leila P. da SILVA; Daiana M. X. PERDOMO 252-257
- 1049 Importância do diagnóstico laboratorial na busca de casos de tuberculose em um hospital psiquiátrico**
Searching tuberculosis cases in a psychiatric hospital: importance of laboratory diagnosis
Hindenburg C. G. da COSTA; Ana Carolina MALASPINA; Fernando F. de MELLO; Clarice Q. F. LEITE 258-262
- 1050 Cultura primária de fibrocondrócitos de menisco de coelho**
Primary Culture of fibrocondrocytes from rabbit knee joint meniscus.
Cristina Adelaide FIGUEIREDO; Paulo Pinto JOAZEIRO 263-268

- 1051 Estudo retrospectivo dos exames de líquido cefalorraquidiano (LCR) de pacientes com suspeita clínica de neurotoxoplasmose, portadores do HIV**
 Retrospective study on cerebrospinal fluid (CSF) evaluation in HIV positive-patients with clinically suspected neurotoxoplasmosis
 Cristiane H. COSTA*; Raquel de M. ROSA; Aparecida Helena de S. GOMES; Marilyn Castelani A. ARAÚJO; Cássia M. RAFAEL 269-272

Relato de Caso/ Case Report

- 1052 Digitoxina: superdosagem em medicamento manipulado**
 Digitoxin: overdose in pharmaceutical compounded preparation
 Helena Miyoco YANO; Mariangela Tirico AURICCHIO 273-275

RESUMOS DE TESES E DISSERTAÇÕES

- Estudo comparativo entre os métodos ELISA e Imunofluorescência Indireta na análise de amostras de sangue de cães provenientes de municípios endêmicos e enzoóticos para leishmaniose visceral americana**
 ELISA and Indirect Immunofluorescence tests: Comparative study in the analyses of
 Silva, R. M. Da 276
- Investigation of the yeasts from biotic source, in colonization state and infection, and non-biotic sources in the hospitals for different molecular techniques**
 Investigação de leveduras no âmbito hospitalar por diferentes técnicas moleculares
 Oliveira e Silva, R. B. de 277
- Herpesvírus humano tipo 8 (HHV-8): estudo de segmentos alvo do genoma viral em amostras de sangue, saliva e urina de pacientes infectados pelo HIV/aids, com e sem Sarcoma de Kaposi**
 Human Herpesvirus type 8 (HHV-8): Study of target segments of the HHV-8 genoma in blood, saliva and urine of HIV/aids infected patients with or without Kaposi's Sarcoma.
 Santos-Fortuna, E.de los 278
- Medidas dos teores de tocoferóis e estabilidade oxidativa em óleos de fritura**
 Tocopherol rates and oxidative stability measurement in frying oils
 Corsini, M. da S 279
- Evaluation of the immune response in rabbits immunized intranasally with antigens of *Neisseria meningitidis* B selected for the immunotypes L3,7,9[↑] or 8[↑] with monoclonal antibodies**
 Avaliação da resposta imune em coelhos pela via de imunização nasal com antígenos de *Neisseria meningitidis* B selecionados para os imunotipos L3,7,9[↑] e L8[↑] por meio de anticorpos monoclonais
 Ferraz, A. S. 279-280
- Immunogenicity of intranasally administered class 5C protein of *Neisseria meningitidis* in mice.**
 Estudo da Imunogenicidade da proteína de Classe 5C de *Neisseria meningitidis* B em camundongos imunizados pela via nasal
 Carmo, A. M. dos S. 280-281
- Amperometric immunosensor using Tc85-11 protein and investigations of the protein interaction with anti-T. *cruzi* antibody by atomic force microscopy**
 Imunossensor amperométrico empregando a proteína Tc85-11 e investigações da interação da proteína com anticorpo anti-T *cruzi* por microscopia de força atômica
 Ferreira, A. A. P 281-282
- Colaboradores 283-284

Valor nutricional de cogumelos comestíveis: uma revisão

Nutritional value of edible mushrooms: a revision

RIALA6/1032

Regina Prado Zanes FURLANI^{1*}; Helena Teixeira GODOY²

* Endereço para correspondência: ¹ Centro de Química de Alimentos e Nutrição Aplicada, Instituto de Tecnologia de Alimentos ITAL, Av. Brasil, 2880 - Campinas-SP. CEP 13070-178 e-mail: rfurlani@ital.sp.gov.br

² Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas

Recebido: 01/04/2005 – Aceito para publicação: 23/09/2005

RESUMO

Os cogumelos têm sido tratados como uma iguaria e podem ser apreciados tanto pelas suas características gastronômicas, conferindo sabor e aroma, como também pelo seu valor nutricional. Para a caracterização nutricional de um alimento um trabalho utilizando metodologias adequadas de análises deve ser realizado. Esta revisão apresenta dados de diversos autores, nacionais e internacionais, que realizaram análises quantitativas da composição de cogumelos comestíveis, avaliando o valor nutricional e as diferenças entre meios de cultivos e espécies.

Palavras-Chave. cogumelo, fungos comestíveis, valor nutricional.

ABSTRACT

Mushrooms have been considered as a delicacy, and they can be appreciated for their gastronomic characteristics, conferring flavor and aroma, and for nutritional value as well. For characterizing food nutritional properties, a study using adequate analytical methodologies must be carried out. This review presents data reported by several national and international authors who performed quantitative analyses on edible mushrooms compositions, in order to evaluate the nutritional value, and the differences among the distinct ways of cultivation and among species.

Key words: mushroom, edible fungi, nutritional value.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----|
| Introdução | 149 |
| Valor Nutricional | 150 |
| Proteínas | 150 |
| Lipídeos | 151 |
| Carboidratos e fibra alimentar | 152 |
| Vitaminas | 152 |
| Fatores que influenciam a composição | 152 |
| Conclusões | 153 |
| Referências | 154 |

INTRODUÇÃO

A relação humana com os cogumelos é muito antiga e fascinante. Ao longo da história eles foram sendo utilizados com as mais diferentes finalidades. Os egípcios, por exemplo, acreditavam que os cogumelos eram um presente do deus Osíris. Os antigos romanos também achavam que era um alimento divino por acreditarem que os cogumelos foram atirados para a Terra

através de raios jogados por Júpiter durante uma tempestade¹. Já na Grécia antiga, os guerreiros acreditavam que os cogumelos proviam de força e coragem. No Egito, os faraós os utilizavam como presente especial e em Roma diziam ser o “alimento dos deuses” e, portanto, deviam ser servidos apenas em ocasiões especiais. Entre os chineses os cogumelos eram considerados verdadeiros “elixir da vida” e utilizados como alimentos bons para a saúde, e até mesmo entre os índios mexicanos eram

utilizados como alucinógenos em rituais religiosos e feitiçarias, bem como com propósito terapêutico². Embora muitas culturas venham usando os cogumelos tanto pela sua importância gastronômica quanto pelo seu valor medicinal, o seu emprego como alimento funcional é mais notado nas culturas orientais, nas quais a aplicação de cogumelos para se manter a saúde teve início há milhares de anos, como na China. O cogumelo shiitake, bem conhecido pelos japoneses e asiáticos, tornou-se o segundo cogumelo mais cultivado em todo o mundo. Junto ao costume alimentar dos asiáticos há também a forte tradição do uso dos cogumelos medicinalmente, datada há mais de 2000 anos³.

Recentemente o consumo de cogumelos também está aumentando na cultura ocidental, envolvendo um grande número de espécies além do popular “champignon”⁴. Um grande crescimento pode ser atestado pelos seguintes números: em 1993, a produção anual mundial foi de 1,95 milhões de toneladas e em 2003 ela saltou para 3,19 milhões de toneladas, ou seja mais de 60% em 10 anos⁵. A produção do Brasil não se encontra nessa estatística mundial e segundo Vilela (2004)⁶, o país não possui estatísticas oficiais sobre a produção de cogumelos, mas sabe-se que a maior região produtora está localizada no Alto Tietê, em São Paulo.

Hoje, os cogumelos são considerados por muitos pesquisadores como alimentos nutracêuticos ou funcionais fisiológicos, fato que tem estimulado também os atuais produtores brasileiros e novos produtores na busca de técnicas mais produtivas e na introdução de outras espécies. Atualmente, o cultivo dos cogumelos no Brasil vem crescendo, já que a cultura possibilita reciclar economicamente certos resíduos agrícolas e agro-industriais. Sob o ponto de vista nutricional, devido ao alto valor protéico, o cultivo dos cogumelos tem sido apontado como uma alternativa para acrescentar a oferta de proteínas aos países com alto índice de desnutrição. A utilização de certas espécies, em forma de chá ou cápsulas, como preventivo de algumas doenças, também acelerou a produção de cogumelos².

São conhecidas cerca de 2000 espécies de cogumelos comestíveis, mas apenas 25 delas são comercialmente cultivadas⁷. No Brasil, as principais espécies comestíveis cultivadas são *Agaricus bisporus*, *Lentinula edodes* e *Pleurotus spp*⁸ e recentemente, a espécie *A. blazei* tem despertado interesse da medicina popular devido às suas possíveis propriedades medicinais e tem sido exportado do Brasil, principalmente para o Japão⁹.

O conhecido “champignon” (*A. bisporus*) foi a primeira espécie a ser cultivada no Brasil e é a espécie mais cultivada no mundo. No estado de São Paulo, principalmente na região de Mogi das Cruzes, o cultivo ainda é realizado de forma rudimentar, geralmente realizado por famílias chinesas que herdaram as técnicas por muitas gerações e sem conhecimentos científicos mais aprofundados⁷. Segundo a literatura nacional, o início do cultivo em escala comercial parece datar dos anos 50, quando imigrantes italianos se fixaram em Cabreúva e Atibaia, no estado

de São Paulo e na mesma época imigrantes chineses instalaram-se em Mogi das Cruzes¹⁰. A alimentação do povo brasileiro usando proteína microbiana, na qual os cogumelos estão inseridos, é recente e restrita a algumas regiões onde prevalecem núcleos de imigrantes asiáticos. Estes povos trouxeram para o Brasil hábitos alimentares alternativos, dentre os quais o consumo de cogumelos¹¹.

A cultura do shiitake (*L. edodes*) foi iniciada na China há cerca de 800 anos. Esse cogumelo é o de segundo maior consumo no mundo^{7,12}. O Japão aperfeiçoou o cultivo e atualmente é o maior produtor mundial. São citados na literatura aspectos medicinais e terapêuticos do shiitake devido a um grande número de compostos biologicamente ativos que já foram isolados e purificados. Muitas pesquisas estão sendo desenvolvidas para a melhor avaliação desse potencial¹². A medicina popular indica o shiitake para fortificar e restaurar o organismo. É indicado para todas as enfermidades que envolvam o enfraquecimento do sistema imunológico. Chang e Miles² descrevem efeitos antiviral e antitumoral em extrato aquoso desse cogumelo.

O *A. blazei* foi descoberto no Brasil e tem sido alvo de estudo no Japão desde a década de 80¹³. Essa espécie tem sido utilizada em forma de chás, cápsulas e também como alimento para prevenção de câncer, doenças do aparelho circulatório, digestivo e urinário, dentre outras.

Os cogumelos apresentam um alto teor de proteína e também são fontes de minerais e fibras alimentares. O teor de lipídeos é baixo, mas a relação entre ácidos graxos insaturados e saturados varia de 2 a 4,5:1¹⁴. Segundo Breene¹⁴, os cogumelos podem ser uma boa fonte de vitamina B₁, B₂, niacina, biotina e vitamina C.

VALOR NUTRICIONAL

Desconsiderando-se o alto teor de água, a composição de macronutrientes em cogumelos é relativamente alta e apresentam um baixo valor calórico. Cogumelos “in natura” apresentam teores de umidade que variam de 73,7 a 94,7 %^{1,2,15,16,17,18,19,20,21}.

Várias publicações, artigos de metodologia, revisões ou livros descrevem o cogumelo como um alimento de alto valor protéico, fonte de fibra alimentar e vitaminas, além de terem um baixo teor de lipídeos^{1,2,3,14}.

Proteínas

Os cogumelos são considerados uma boa fonte de proteínas¹⁴. Para a maioria dos alimentos o teor de proteína é calculado utilizando-se um fator de correção a partir do conteúdo de nitrogênio orgânico presente. O fator 6,25 assume que as proteínas contêm 16% de nitrogênio e que são totalmente digeríveis. Esse fator despreza quantidades de compostos nitrogenados não protéicos presentes em alimentos e que são, na grande maioria, insignificantes. Os cogumelos, porém,

possuem uma significativa quantidade de compostos nitrogenados não protéicos, na forma de quitina, em suas paredes celulares e tais compostos não são digeríveis. Para não superestimar o conteúdo protéico de cogumelos o fator 4,38 é adotado, pois esse valor assume que apenas 70% dos compostos nitrogenados existentes no cogumelo sejam digeríveis pelo organismo humano ($0,70 \times 6,25 = 4,38$)¹⁴. Esse fator recomendado pode não representar o valor correto para proteína em cogumelos, já que pode haver diferenças entre espécies para o teor de quitina, amônia e outros compostos nitrogenados não protéicos²².

Dados reunidos por Chang e Miles² apontam que o *A. bisporus* contém, em base seca, de 23,9 a 34,8% de proteína bruta. Para *Pleurotus* esse valor varia de 10,5 a 30,4% e para *L. edodes*, 13,4 a 17,5%. Esses dados foram compilados de diversos autores e o fator de conversão utilizado foi de 4,38. Mattila et al.²³ também descrevem cogumelos como fonte de proteínas contendo 19 a 35% em base seca, valores também compilados da literatura.

Vários trabalhos publicados na literatura internacional e alguns nacionais, a maioria utilizando metodologia descrita pela "Association of Official Analytical Chemists"²⁴, também conferem alto valor protéico aos cogumelos. Alguns deles avaliam a composição em termos de aminoácidos^{22,25,26,27}.

Ranzani e Sturion²¹ analisaram a composição de aminoácidos em espécies de *Pleurotus* spp. e em todas as espécies analisadas foram detectados todos os aminoácidos essenciais que constituíam de 42,57 a 56,38 % da proteína presente nesses cogumelos. Também em *Pleurotus*, Wang et al.²⁵ verificaram a alta presença de aminoácidos essenciais, 126,7 mg/g, em peso seco, de um total de 347,5 mg/g de aminoácidos totais. Esse cogumelo apresentou, segundo os autores, todos os aminoácidos essenciais. Manzi et al.¹ verificaram que amostras de *A. bisporus* continham todos os aminoácidos essenciais e os mais abundantes foram o ácido glutâmico e aspártico e a arginina.

No Brasil, Sturion e Oetterer²¹ avaliaram a composição química de três espécies de *Pleurotus* spp. e os conteúdos de proteína que os autores encontram variaram de 17,38 a 25,31%. Também no Brasil, Ranzani e Sturion²² analisaram espécies de *Pleurotus* spp. cultivados em folha de bananeira e o teor de proteína bruta ($N \times 4,38$) variou entre as espécies de 17,4 a 24,1%. Na espécie *P. ostreatus*, Manzi et al.¹ determinaram proteína pelo método da AOAC²⁴ e em 8 amostras analisadas, da mesma espécie, obtiveram valores que variaram de 19,93 a 34,73% em base seca. Os autores utilizaram o mesmo substrato e o fator de correção utilizado foi de 4,38. Nesse mesmo trabalho também foram determinados os teores de proteína em outras espécies, como o *P. eryngii*, *P. pulmonarius* e os valores obtidos foram de 22,74 a 30,48%. A comparação entre as espécies mostrou que houve uma grande variabilidade dos teores de proteína, que, segundo os autores, pode ser explicado pela concentração de quitina presente em cada espécie. Yang et al.²⁰, em Taiwan, verificaram que em amostra de *P. ostreatus*, proveniente de mercado local, analisada segundo o método oficial e utilizando o fator de correção de 4,38, o teor de proteína foi de 23,9%.

Dentre os muitos fatores que podem influenciar o valor protéico dos cogumelos talvez o mais importante seja o substrato.

Rios-Hurtado et al.²⁸ cultivaram *Pleurotus* em quatro substratos diferentes e obtiveram valores de proteína que variaram de 14,69 a 38,13%, em base seca, para cogumelos cultivados em palha de arroz e folha de bananeira, respectivamente. Os autores não relataram o fator utilizado para conversão de nitrogênio em proteína. Wang et al.²⁵ cultivaram a mesma espécie em bagaço de grãos malteados (resíduo de cervejaria) e utilizando o fator de 6,25 para conversão de nitrogênio em proteína, encontraram valores de 41,5 a 53,3% de proteína, em base seca.

Ekanem e Ubengama²⁹ verificaram que o estágio de maturação (botão e totalmente desenvolvido) em amostras de *P. ostreatus* influencia significativamente ($p < 0,05$) o teor de proteína, no cogumelo ainda botão o valor foi de 28% e para o totalmente desenvolvido foi de 40,25%.

Manzi et al.¹⁷, avaliaram as perdas de proteína após o cozimento de *P. ostreatus* e concluíram que o processamento, pelo decréscimo da quantidade de água, aumentou significativamente os teores de proteína, passando de 1,61 % para 2,53%, em base úmida. Entretanto, como os valores não foram apresentados em base seca a avaliação da perda do teor protéico pelo processamento não pode ser estimada.

Em *A. bisporus* os teores de proteína apresentados por diversos autores variaram de 26,8%¹⁶ a 39,32%¹⁸, em base seca.

Os teores protéicos encontrados para os cogumelos de diferentes regiões da Espanha e em diferentes épocas não foram significativamente diferentes, ficando em uma faixa de 2,5 a 2,8%, em base úmida³⁰. No entanto Manzi et al.¹⁷, encontraram teores de proteína mais baixos (1,3 a 1,6%).

Em se tratando de uma das espécies de cogumelo mais consumida, principalmente na forma de conserva, alguns trabalhos na literatura avaliaram o teor protéico dos champignons enlatados (conserva). Matin-Belloso e Llanos-Barbiobero³¹ encontraram teores de proteína de 2% (base úmida). Vetter¹⁸ encontrou valores de 35,1% e 40,6% para cogumelos em conserva fatiados e inteiros, respectivamente (base seca).

Manzi et al.¹⁷, analisando duas amostras de *A. bisporus* encontraram valores de proteína maiores para as amostras após o cozimento e congelamento.

Em 1998, Longvah e Deosthale¹⁹, utilizando fator de correção de 6,25, encontraram 22,8% de proteína em amostras de shiitake desidratados adquiridos no mercado local de Manipur, na Índia. Yang et al.²⁰ analisaram duas amostras da espécie *L. edodes* e encontraram 19,7 e 20,5% de proteína.

Lipídeos

Os cogumelos apresentam uma baixa quantidade de lipídeos, variando entre 1,1 e 8,3% em base seca, segundo dados compilados por Chang e Miles².

No Brasil, Sturion e Oetterer²¹ avaliaram o teor de lipídeos em *Pleurotus* cultivado em quatro diferentes substratos e

obtiveram valores que variaram entre 1,54 e 1,86%.

Longvah e Deosthale¹⁹ analisaram cogumelos comestíveis provenientes do nordeste da Índia. Encontraram 2,1% de gordura em base seca na espécie *L. edodes* e na análise dos ácidos graxos, concluíram que 77,7% dos lipídeos eram constituídos por ácidos graxos insaturados, com predominância para o linoléico. Esses valores confirmam os dados de Hadar e Cohen-Arazi²⁶ e de Senatore et al.²⁷

Cogumelos comercializados em Taiwan e analisados por Yang et al.²⁰ apresentaram teores de lipídeos que variaram de 2,16% (*P. ostreatus*) a 6,3% (*L. edodes*), valores em base seca. Um trabalho conduzido no Japão²⁵ apresentou resultados que variaram de 4,3 a 4,7% de lipídeos (base seca) em *P. ostreatus* que foram cultivados em resíduos de cervejaria. Na Itália, Manzi et al.¹⁷ encontraram 0,33 e 0,36% de lipídeos, em base úmida, para *A. bisporus* e *P. ostreatus*, respectivamente. Em um trabalho recente realizado na Colômbia, Rios-Hurtado et al.²⁸ analisaram *Pleurotus* que foram cultivados em diferentes substratos e os valores para lipídeos foram de 0,78 a 2,72%, esses valores estão expressos em 100g de parte comestível.

Carboidratos e fibra alimentar

Os carboidratos são os constituintes principais do cogumelo, com exceção da água. Na revisão apresentada por Breene¹⁴ os carboidratos constituem de 3 a 28% e as fibras representam 3 a 32%, em base seca. O autor cita que o *A. bisporus*, um cogumelo muito estudado, contém pentoses (xilose e ribose), hexoses (glucose, galactose, manose), sacarose, metil pentoses (ramose, fucose) e outros açúcares (manitol, inositol, ácidos galacturônico e glicurônico e glicosamina). O polímero da N acetilglicosamina, chamado de quitina, é um polissacarídeo estrutural importante encontrado na parede celular do cogumelo³².

A maioria dos trabalhos analíticos encontrados na literatura calcula o teor de carboidratos em cogumelos por diferença^{17,20,31,33}. Os valores variam para cada espécie, *Pleurotus* spp apresentam teores entre 6,69 e 7,59%, em base úmida; *L. edodes* entre 5,37 e 5,85% e *A. bisporus* 0,80 e 5,24%. Esses valores excluem as fibras.

Fibra alimentar são os polissacarídeos e a lignina de vegetais que não são digeridos pelas enzimas digestivas do homem e são classificadas, quanto à sua solubilidade em água, como fibras solúveis e insolúveis sendo compostas por celulose, hemiceluloses, gomas, pectinas e mucilagens. Devido aos efeitos fisiológicos das fibras alimentares alguns autores se dedicaram a quantificar a fibra alimentar em cogumelos.

Manzi et al.¹⁷ encontraram 4,10% de fibra alimentar em *P. ostreatus* e 1,98% em *A. bisporus*, em base úmida. Já Bautista-Justo et al.³³ encontraram em três diferentes cepas de *P. ostreatus* valores entre de 32,14 a 36,81%, em base seca. Cheung¹⁵ analisou o chapéu e a haste de três espécies de cogumelos (*L. edodes*, *L. shimeji* e *Pleurotus*); para o *L. edodes* o valor de fibra alimentar foi de 44,9% e 52,7%; para o *L. shimeji* foi de 44% e 39,2% e para o *Pleurotus* spp., 42,6% e 42,2% para o chapéu e haste,

respectivamente. Em 1997, novamente Cheung¹⁶ analisou *A. bisporus* e obteve 18,2% de fibra alimentar. Todos os valores apresentados por esse autor foram em base seca.

Vitaminas

Segundo Breene¹⁴ os cogumelos podem ser uma boa fonte de vitamina B₁, B₂, niacina, biotina e vitamina C. Poucos trabalhos analisaram essas vitaminas em cogumelos e somente nos últimos anos é que dados analíticos estão disponíveis na literatura internacional.

Llanos et al.³⁰ analisaram vitaminas B₁, B₂, B₆ e C em *A. bisporus* de três principais zonas produtoras na Espanha. As análises foram conduzidas em três períodos do ano e a média dos resultados foi 0,10; 0,29; 0,09 e 11,50 mg/100g de vitaminas B₁, B₂, B₆ e C, respectivamente. A metodologia utilizada foi cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Três cepas de *P. ostreatus* provenientes do México foram analisadas para vitaminas B₁, B₂, C e niacina. Os valores encontrados foram 1,92 a 1,96 mg/100g para tiamina, 3,31 a 3,70 mg/100g para riboflavina, 35,98 a 36,56 mg/100g para niacina e 28 a 35 mg/100g para ácido ascórbico, sendo todos os dados expressos em base seca³³.

Esteve et al.³⁴ utilizaram a CLAE para analisar as vitaminas B₁ e B₂ em *A. bisporus* cultivados na Espanha, e os valores encontrados foram 1,0 e 6,4 µg/g respectivamente. Novamente na Espanha, Martin-Belloso e Llanos-Barriobero³¹ também analisaram *A. bisporus* para vitaminas B₁, B₂ e B₆ e os resultados apresentados foram 0,41; 1,62 e 0,42mg/kg, respectivamente.

Na Finlândia, Mattila et al.⁴ caracterizaram *A. bisporus* (branco e marrom), *L. edodes* e *P. ostreatus* para vitaminas B₁, B₂, B₁₂, C, D, niacina e folatos totais e verificaram que os cogumelos são boas fontes de vitaminas, principalmente de B₂, niacina e folatos. A espécie *L. edodes* foi a que apresentou teores mais elevados das vitaminas C (2,1mg/100g), B₁₂ (0,07µg/100g) e D (0,1 µg/100g). A espécie *P. ostreatus* apresentou maiores teores das vitaminas B₁ (0,07mg/100g) e folatos (51µg/100g) e a espécie *A. bisporus* (marrom) apresentou maior teor de niacina (4,1 mg/100g) e a mesma espécie branca apresentou maior teor de vitamina B₂ (0,39 mg/100g).

Rios-Hurtado et al.²⁸ analisaram *P. ostreatus* cultivados em diferentes substratos. Os valores para nicotinamida variaram de 8,89 a 26,58, para tiamina 0,61 a 9,91, para piridoxina 0,83 a 68,27, para vitamina C de 1,19 a 194,14 e riboflavina não foi detectada. Esses valores estão expressos em mg/100g de parte comestível e não foi especificado se os resultados são em base seca ou úmida.

FATORES QUE INFLUENCIAM A COMPOSIÇÃO

Os dados coletados nessa revisão mostram que existe uma grande diferença nas porcentagens de macro e micro nutrientes encontrados nos cogumelos. Esses valores, muitas

vezes discrepantes, podem ter origem em diversos pontos, desde a escolha da espécie, cepas e variedades até o tipo de substrato utilizado, o grau de maturação e o tipo de armazenamento e o processo de conservação^{1,21,25,35,36,37,38}.

No Brasil, Sturion e Oetterer²¹ determinaram a composição química dos corpos de frutificação de três espécies de *Pleurotus* cultivados em quatro diferentes substratos. Foi avaliado o teor de umidade, nitrogênio, extrato etéreo, fibra bruta, celulose, hemicelulose, lignina, cinza, micro e macro nutrientes. Os resultados obtidos pelos autores demonstraram que a composição química dos cogumelos variou, além da espécie, com o substrato utilizado sendo os componentes mais afetados a proteína, a fração fibrosa e os minerais.

Em 1996, em um trabalho conduzido por Rangunathan et al.³⁵ foram verificados a eficiência biológica e alguns nutrientes nos corpos de frutificação de três espécies de *Pleurotus* (*P. sajor-caju*, *P. platypus* e *P. citrinopileatus*) cultivados em cinco tipos de substratos diferentes (palha de arroz, de milho, bagaço de cana, fibra de coco, e uma mistura desses resíduos). As diferentes espécies cultivadas em substratos distintos apresentaram valores de 84,7 a 91,9% de umidade, 40,6 a 46,6% de carboidratos, 26,9 a 42,5% de proteína. A eficiência biológica (produtividade) variou entre 25,1 a 46,6% e os cogumelos apresentaram 0,8 a 2,5 mg/g de cálcio, 5,1 a 15,2 mg/g de ferro, 0,49 a 18,8 mg/g de potássio, 9,2 a 14,1 mg/g de magnésio, 0,5 a 1,32 mg/g de sódio e 113 a 218 mg/g de fósforo. Os autores concluíram que a palha de arroz favorece o crescimento da espécie *P. sajor-caju*, fibra de coco favorece *P. platypus* e bagaço de cana de açúcar, *P. citrinopileatus*, mas não fazem correlação entre as espécies e os substratos utilizados para os teores de nutrientes encontrados.

Yildiz et al.³⁶ estudaram a espécie *P. ostreatus* cultivada em diferentes substratos. Foram utilizados como fonte lignocelulósica as palhas de sorgo, de amendoim, de soja e de trigo. A relação carbono/nitrogênio dos substratos variou entre 25,13 a 81,08. Os autores analisaram os elementos orgânicos (C, H e N), proteínas, minerais (K, Ca, Cu, Zn Mn e Fe) e também a produção que foi calculada a partir do peso do substrato. Os autores encontraram diferenças significativas entre os tipos de substratos utilizados. Palhas de soja e amendoim tiveram uma produção superior quando comparadas com trigo e a palha de sorgo foi o substrato menos produtivo. Quanto ao teor de proteína, as palhas de sorgo, amendoim e soja produziram cogumelos com quantidades superiores aos produzidos com palha de trigo. Também houve diferenças nas concentrações de minerais, dependendo de cada substrato utilizado.

Manzi et al.¹ estudaram diferentes espécies e cepas, cultivadas no mesmo substrato, em relação a nutrientes. Para a espécie *P. ostreatus*, as diferentes cepas analisadas apresentaram teores de proteína que variaram entre 19,93 e 34,73%. Essa variação pode ser atribuída desde fatores comumente citados na literatura até às mudanças genéticas que a espécie vem sofrendo.

Também analisando três cepas diferentes de *P. ostreatus*,

Bautista-Justo et al.³³, no México, obtiveram valores significativamente diferentes para proteína (24,6 a 28,5%), fibra alimentar (32,1 a 36,8%) e carboidratos (26,3 a 30,5%) nas três cepas analisadas. Para lipídeos (1,1 a 1,8%), uma cepa mostrou-se inferior às outras e, para umidade, nenhuma cepa se mostrou diferente. Os conteúdos de vitaminas nessas cepas analisadas não se mostraram diferentes. Os valores médios apresentados pelos autores foram de 36,2mg/100g para niacina, 3,5mg/100g para riboflavina, 1,9mg/100g para tiamina e 31mg/100g para ácido ascórbico. Para os minerais cálcio (0,8 a 1,8%) e fósforo (0,5 a 0,9%) os valores foram significativamente diferentes para as três cepas. Os valores foram apresentados em base seca.

Três substratos à base de bagaço de grãos malteados (resíduo de cervejaria), suplementados com diferentes níveis de farelo de trigo, arroz, aveia, milho e resíduo de soja (*okara*), foram utilizados por Wang et al.²⁵ para o cultivo de *P. ostreatus*. Os autores avaliaram a eficiência biológica (razão entre o peso da produção e o peso inicial do substrato), a composição centesimal, aminoácidos e teores de vitaminas (B₁, B₂, niacina e ácido ascórbico) e minerais. Concluíram que resíduo de cervejaria é um bom substrato para o cultivo de *P. ostreatus* e que houve variação na composição dos cogumelos, dependendo da quantidade e do tipo de farelo adicionado.

Rangunathan e Swaminathab³⁷ cultivaram espécies de *Pleurotus* em diferentes substratos (resíduos agrícolas). Nesse trabalho, verificaram que não houve interferência do tipo de resíduo utilizado na composição dos cogumelos.

Em 2003, Rios Hurtado et al.²⁸ produziram *P. sajor-caju* em quatro substratos lignocelulósicos (serragem, palha de milho, folha de bananeira e palha de arroz) e avaliaram a variação da composição dos corpos de frutificação. As maiores diferenças foram para proteína (14,69 a 38,13%), carboidratos (9,38 a 44%), vitamina B₆ (0,83 a 68,27 mg/100g) e vitamina C (1,19 a 194,14 mg/100g). Os cogumelos cultivados em palha de arroz apresentaram o menor teor protéico (14,69%) e os menores teores de vitaminas. Já o cogumelo cultivado em folha de bananeira apresentou apenas 9,38% de carboidratos, mas apresentou o maior teor de vitaminas C e B₆, 194,32 e 68,27 mg/100g, respectivamente.

Recentemente, Banik e Nandi³⁸ avaliaram o efeito da suplementação da palha de arroz com o lodo residual da produção de biogás e verificaram um aumento da produtividade, de 63,1 a 108,9% e também nos níveis de proteína, que chegaram a um acréscimo de até 57% dependendo do tipo de lodo utilizado.

CONCLUSÕES

Embora haja uma grande diferença na composição, dependendo das espécies e dos meios de cultivo utilizados para a produção de cogumelos comestíveis, estes podem ser considerados excelentes alimentos devido às características nutricionais, pois apresentam alto teor de proteínas e carboidratos e baixos teores de gordura, resultando em um baixo

valor calórico. Os cogumelos têm considerável quantidade de fibra alimentar e podem ser consideradas fontes de aminoácidos essenciais. Embora não possam ser consideradas fontes de vitaminas podem contribuir com o aporte das mesmas na dieta.

REFERÊNCIAS

- Manzi P, Gambelli L, Marconi S, Vivanti V, Pizzoferrato L. Nutrients in edible mushrooms: an inter-species comparative study. *Food Chem* 1999, 65(4): 477-82.
- Chang ST, Miles PG. Edible mushrooms and their cultivation. CRC Press, inc Boca Raton (FL), 1989.
- Chang, R. Functional properties of Edible Mushrooms. *Nutr Rev* 1996, 54(11): S91-S93.
- Mattila P, Konko K, Eurola M, Pihlava J M., Astola J, Vahteristo L, et al. Contents of vitamins, mineral elements, and phenolic compounds in cultivated mushrooms. *J Agric Food Chem* 2001, 49(5): 2343-8.
- Faostat data, 2004. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Agricultural Production Crops Primary [cited 2004 October 10] Available from: URL: <http://faostat.fao.org/faostat/collections?version=ext&hasbulk=0&subset=agriculture>
- Vilela PS. Cogumelos: Mercado e Comercialização. [cited 2004 May 05] Available from: URL: <http://www.faemg.org.br/artigos01.asp?codart=33#7%20-%20Bibliografia%20Consultada>
- Coutinho LN. Cultivo de espécies de cogumelo comestíveis. [cited 2004 May 13] Available from: URL: <http://www.geocities.com/esabio.geo/cogumelo/agaricus.htm>
- Eira AF, Minihoni MTA. Manual teórico: prático do cultivo de cogumelos comestíveis. 2.ed. Botucatu: Fundação de Estudos e Pesquisas Agrícolas e Florestais PAF; FCA, UNESP, 1997. 115p.
- Pinheiro F, Faria RR, Camargo JLV, Spinardi-Barbisan ALT, Eira AF, Barbisan LF Chemoprevention of preneoplastic liver foci development by dietary mushroom *Agaricus blazei* Murrill in the rat. *Food Chem Toxicol* 2003, 41(11): 1543-50.
- Bononi VLR. O cultivo de *Agaricus bisporus* no Brasil. Anais do 1º. Simpósio Internacional sobre cogumelos, alimentação, saúde, tecnologia e meio ambiente no Brasil. Brasília: Ed. Urben, A. F.;Santos, J. K. P.;Oliveira, H. C. B.: Embrapa, agosto 2003. p. 24-31.
- Angelis DF, Luchesi AC, Simões AC. Sociedade dos Amigos do Instituto Biológico: *Lentinus edodes* (Beek.) Pegler, o cogumelo Shiitake. [cited 2002 October 25] Available from: URL: <http://www.geocities.com/~esabio/cogumelo/lentinusedodes.htm>
- Sugui MM, Alves de Lima PL, Delmanto RD, Eira AF, Salvadori DMF, Ribeiro LR. Antimutagenic effect of *Lentinula edodes* (BERK.) Pegler mushroom and possible variation among lineages, *Food Chem Toxicol* 2003, 41(4): 447-602.
- Ribeiro VL. Produção de *Agaricus blazei* Murrill no Brasil. Anais do 1º. Simpósio Internacional sobre cogumelos, alimentação, saúde, tecnologia e meio ambiente no Brasil. Brasília: Ed. Urben, A. F.;Santos, J. K. P.;Oliveira, H. C. B.: Embrapa, agosto 2003. p. 71-6.
- Breene WM. Nutritional and medicinal value of specialty mushrooms. *J Food Prot* 1990, 53(10): 883-94.
- Cheung PCK. Dietary fiber content and composition of some edible mushroom fruiting bodies and mycelia. *J Agric Food Chem* 1996, 44(2): 468-71.
- Cheung PCK. Dietary fiber content and composition of some edible fungi determined by two methods of analysis. *J Sci Food Agric* 1997, 73(2): 255-60.
- Manzi P, Aguzzi A, Pizzoferrato L. Nutritional value of mushrooms widely consumed in Italy. *Food Chem* 2001, 73(3): 321-5.
- Vetter J. Chemical composition of fresh and conserved *Agaricus bisporus* mushroom. *Eur Food Res Technol* 2003, 217(1):10-2.
- Longvah T, Deosthale YG. Compositional and nutritional studies on edible wild mushroom from northeast India. *Food Chem* 1998, 63(3): 331-4.
- Yang JH, Lin HC, Mau JL. Non-volatile taste components of several commercial mushrooms, *Food Chem* 2001, 72(4): 465-71.
- Sturion GL, Oetterer M. Composição química de cogumelos comestíveis (*Pleurotus* spp.) originados de cultivos em diferentes substratos. *Cienc Tecnol Aliment* 1995, 15(2): 189-93.
- Ranzani MRTC, Sturion GL. Avaliação da composição em aminoácidos de *Pleurotus* spp. cultivados em folha de bananeira. *Arch Latinoamer Nutr* 1998, 48(4): 339-48.
- Mattila P, Suonpaa K, Piironen V. Functional properties of edible mushrooms. *Nutr* 2000, 16(7/8): 694-6.
- Association of Official Analytical Chemists International AOAC. *Off Methods Anal*. 16ªed., 3ª rev., Gaithersburg, M.D., 1997.
- Wang D, Sakoda A, Suzuki M. Biological efficiency and nutritional value of *Pleurotus ostreatus* cultivated on spent beer grain. *Bioresour Technol* 2001, 78(3): 293-300.
- Hadar Y, Cohen-Arazi E. Chemical composition of the edible mushroom *Pleurotus ostreatus* produced by fermentation. *Appl Environ Microbiol* 1986, 51(6): 1352-4.
- Senatore F, Dini A, Marino A, Schettino O. Chemical constituents of some basidiomycetes. *J Sci Food Agric* 1988, 45(4): 337-45.
- Rios-Hurtado A, Torres-Torres G, Medina-Rivas MA. Caracterización bromatológica de la seta (*Pleurotus sajor-caju*) producida em cuatro substratos orgánicos. *Alimentaria* 2003, 349: 85-9.
- Ekanem EO, Ubengama VS. Chemical composition, anti-nutritional factors and shelf life of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*). *J Food Sci Technol* 2002, 39(6): 635-8.
- Llanos E, Barcos R, Autor MJ, Munilla C, Antolin R, Martin O. Composición química del champiñón, Alimentación - equipos y tecnología 1993; 12(4): 53-9.
- Martín-Belloso O, Llanos-Barriobero E. Proximate composition, minerals and vitamins in selected canned vegetable. *Eur Food Res Technol* 2001, 212(2): 182-7.
- Pardo A, Juan JA, Pardo JE. Chemical composition and nutritional value of cultivated mushroom, *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach. *Alimentacion Equipos y Tecnologia* 2001; 157: 115-7.
- Bautista-Justo M, Alanis-Guzman MG, Gonzalez-de-Mejia E, Garcia-Diaz CL. Composición química de tres cepas mexicanas de setas (*Pleurotus ostreatus*). *Arch Latinoamer Nutr* 1998, 48(4): 359-63.
- Esteve MJ, Farré R, Frígola A, Garcia-Cantabella JM. Simultaneous determination of thiamine and riboflavin in mushrooms by liquid chromatography. *J Agric Food Chem* 2001, 49(3): 1450-4.
- Ragunathan R, Gurusamy R, Palaniswamy M, Swaminathan K. Cultivation of *Pleurotus* spp. on various agro-residues. *Food Chem* 1996, 55(2): 139-44.
- Yildiz A, Karakaplan M, Aydin F. Studies on *Pleurotus ostreatus* (Jacq. ex Fr.) Kum. var. salignus (Pers. ex Fr.) Konr. et Maubl.: cultivation, proximate composition, organic and mineral composition of carpophores, *Food Chem* 1998, 61(1-2): 127-30.
- Ragunathan R, Swaminathan K. Nutritional status of *Pleurotus* spp. grown on various agro-wastes. *Food Chem* 2003, 80(3): 371-5.
- Banik S, Nandi R. Effect of supplementation of rice straw with biogas residual slurry manure on the yield, protein and mineral contents of oyster mushroom. *Ind Crops Prod* 2004, 20(3): 311-9.

Elektroforese em campo pulsante em bacteriologia – uma revisão técnica

Pulsed field gel electrophoresis use in bacteriology – a technical review

RIALA6/1033

Vanda D. MAGALHÃES³; Joseane C. FERREIRA¹; Cristiane BARELLI²; Ana Lúcia C. DARINI^{1*}

* Endereço para correspondência: ¹ Laboratório de Bacteriologia e Epidemiologia Molecular, Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (Ribeirão Preto – SP) Brasil

¹ Laboratório de Bacteriologia e Epidemiologia Molecular, Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (Ribeirão Preto – SP) Brasil

² Curso de Farmácia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Passo Fundo (Passo Fundo – RS) Brasil

³ Centro de Pesquisa Experimental do Instituto de Ensino e Pesquisa Albert Einstein (São Paulo – SP) Brasil

Recebido: 22/10/2004 – Aceito para publicação: 01/08/2005

RESUMO

PFGE (“pulsed field gel electrophoresis”) é a sigla usada para indicar qualquer técnica de eletroforese apropriada para separar grandes fragmentos de DNA, por meio da reorientação do DNA em gel pela ação de campos elétricos alternados. Esta técnica é reconhecida como padrão ouro para identificação de linhagens bacterianas, fúngicas e de protozoários. O principal objetivo deste estudo de revisão é o da elucidação dos fundamentos da técnica de PFGE ou eletroforese de campo pulsante aplicada em estudo com bactéria. Sua resolução depende de uma série de fatores como: voltagem, concentração de agarose, temperatura, solução tamponante, tempo de pulso e de corrida eletroforética. A compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos nesse tipo de eletroforese é fundamental para a otimização e obtenção dos resultados apropriados.

Palavras-Chaves. epidemiologia molecular, métodos moleculares, genotipagem bacteriana, PFGE.

ABSTRACT

PFGE (“pulsed field gel electrophoresis”) is an electrophoresis technique suitable for separating large fragments of DNA by means of DNA reorientation in agarose gel from the effects of alternated electric fields. This technique is considered as gold standard for performing bacteria, yeast and protozoa strains identification. The main objective of the present review is to update the PFGE technical basis for being suitable for bacteria studies. Its resolution depends on a series of factors such as agarose concentration, temperature, buffer solution, pulse time, and running time. Understanding the involved molecular mechanisms in this type of electrophoresis technique is fundamental for maximizing and attaining accurate analysis results.

Key Words. molecular epidemiology, molecular methods, bacterial genotyping, PFGE.

SUMÁRIO

| | |
|---|-----|
| Introdução | 156 |
| A teoria por detrás do método | 156 |
| Fatores que afetam o PFGE | 156 |
| Aplicações | 159 |
| A interpretação de PFGE para identificação de linhagens bacterianas | 159 |
| Abreviações | 160 |
| Referências | 160 |

INTRODUÇÃO

A eletroforese em gel de agarose é a técnica mais difundida para separação de moléculas de DNA com relação ao tamanho. A matriz formada pela agarose atua como filtro molecular, cuja porosidade é inversamente proporcional à concentração do gel de agarose. Durante a eletroforese, as moléculas de DNA se posicionam em paralelo ao campo elétrico; a dificuldade de transpor a matriz de agarose em direção ao pólo positivo é inversamente proporcional ao tamanho de cada molécula. As menores migram mais rapidamente possibilitando a separação por tamanho ou peso molecular. Assim, quanto maior a molécula, maior o tempo de migração, possibilitando a separação dos fragmentos, qualquer que seja o tamanho. Na prática, um gel de agarose a 0,8% é apropriado para separação de fragmentos de 0,5 até 20-30 kb, aproximadamente. Géis com maiores concentrações (2,5 até 3%) separam fragmentos menores (80 até 500 pb); uma alternativa, nestes casos, é o gel de poli(acrilamida). Géis de agarose a 0,5% separam fragmentos com até 50 kb, porém, são bastante frágeis e o tempo de corrida é excessivamente demorado¹. Moléculas de DNA maiores que 50 kb são de difícil separação, mesmo com a diminuição da concentração de agarose, pois sua mobilidade eletroforética se torna independente do tamanho do fragmento².

A solução do problema foi dada por Schwartz e Cantor³ com o desenvolvimento da técnica de eletroforese de campo pulsante (também traduzida por eletroforese de campos pulsados) que, originalmente, foi usada para separação de cromossomos da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Esses pesquisadores, com base nas experimentações realizadas no início dos anos 70, relataram que as moléculas de DNA que foram estiradas pela ação de um campo elétrico demandavam um maior ou menor tempo para o relaxamento, e que era proporcional ao tamanho da molécula, depois de cessada a ação do campo de força⁴.

Segundo Birren e Lai⁵ “*pulsed field*” se aplica a qualquer modalidade de eletroforese que utilize mais que um campo elétrico direcionado de forma alternada. Quando ocorre troca na direção do campo elétrico, as moléculas de DNA são compelidas à reorientação, para se posicionarem de forma paralela ao campo de força, antes de migrarem para a direção do pólo positivo. Os fragmentos menores se reorientam com maior facilidade que os maiores, que demoram mais para se adaptarem à nova direção. O tempo entre as mudanças de orientação pelo campo elétrico é chamado tempo de pulso (*switch time*). A partir de 1984 vários protocolos empíricos surgiram com o intuito de otimizar a separação de grandes moléculas de DNA, ou seja, de alto peso molecular. Os diferentes métodos resultantes podem ser agrupados em: aqueles que alternam campos elétricos transversais (CHEF, ROFE, PACE, PHOGE, OFAGE, TAFE), entre os quais o CHEF é o mais difundido, e os que utilizam alternância de campos elétricos invertidos (FIGE, ZIFE). Estas siglas e nomenclaturas complexas (ver final) mais refletem interesses econômicos do que informações de interesse científico. De modo

geral, qualquer uma destas técnicas possibilita a separação de grandes fragmentos de DNA (~600 kb) ou ainda de cromossomos inteiros.

A teoria por detrás do método

As teorias da separação de DNA por eletroforese são bastante elaboradas. Não existe um modelo exclusivo aplicável a todas as experimentações⁶. As limitações topográficas do gel produzem importante efeito sobre a molécula de DNA. A teoria introduzida por Gennes⁷ pressupõe que o polímero se movimenta como se estivesse dentro de um tubo. Outros autores^{8,9} desenvolveram a teoria que se tornou conhecida como o modelo de reptação. Este modelo explica razoavelmente a mobilidade do DNA em campos elétricos fixos, porém, não prevê que a molécula de DNA assumira a configuração dobrada no gel (em grampo) como freqüentemente ocorre na prática.

Com o intuito de obter dados a respeito da migração de moléculas de DNA através de gel de agarose, tanto em eletroforese convencional quanto em eletroforese de campo pulsante, utilizou-se a técnica de microscopia de fluorescência e corantes que intercalam a dupla hélice do DNA, como brometo de etídeo, alaranjado de acridina ou YOYO-1^{10,11}. Estes experimentos mostraram que, em eletroforese convencional, as moléculas de DNA migram com movimentos cíclicos que envolvem compactação e alongamento do polímero, sempre em paralelo ao campo elétrico aplicado, à semelhança dos movimentos da lagarta. As formas alongadas se devem ao fato da molécula ficar comprimida na porosidade do gel, enquanto que uma das extremidades (a “cabeça”) é atraída para o pólo positivo. Quando a molécula comprimida consegue se desprender, um novo ciclo é iniciado. A extremidade que irá guiar o movimento, ou seja, qual delas será a “cabeça” no próximo ciclo de migração, é aleatória e depende de qual extremidade encontrará primeiro a passagem através da matriz de agarose¹⁰. O processo é claramente dependente do tamanho da molécula, razão pela qual os polímeros maiores que 20-30 kb não são passíveis de separação por eletroforese convencional.

Na eletroforese de campo pulsante, ao se alterar a direção do campo elétrico com ângulo de 120°, a extremidade que lidera o movimento também é alterada. A cada mudança na direção do campo de força, os movimentos iniciais das moléculas ocorrem a partir da extremidade que era “cauda”, cujo posicionamento, obviamente, depende do tamanho da molécula. Quanto maior a molécula, mais distante estará a “cauda”, em comparação com uma molécula de menor tamanho, razão pela qual a velocidade de migração depende do tamanho do fragmento de DNA¹¹.

Fatores que afetam o PFGE

A resolução de PFGE depende de vários fatores (Tabela 1) como: composição e concentração de agarose, solução tamponante, tensão da corrente elétrica (voltagem), tempo de pulso e tempo de corrida eletroforética. Outros fatores como o grau de uniformidade, a força relativa dos campos elétricos, o ângulo entre os campos elétricos que se alternam (de acordo

com o aparelho empregado), a temperatura de corrida (Figura 1) e ainda, a integridade do DNA também podem afetar o limite de resolução da técnica^{2,12}.

Nos estudos iniciais, Schwartz e Cantor³ utilizaram gradientes de campo de força (não homogêneo), o que resultava em trajetórias curvas das moléculas de DNA. Em 1986, com o desenvolvimento, da técnica de campo elétrico homogêneo com eletrodos hexagonais, se tornou possível a separação de bandas das diferentes amostras de DNA o que facilitou sua comparação¹³.

Tabela 1. Parâmetros gerais de corrida eletroforética para separação de diferentes tamanhos de DNA

| DNA (kb) | 10 a 50 | <100 | 100 a 2000 | 2000 a 6000 |
|------------------|-----------|------------|------------|-------------|
| % agarose | 1,2 | 1,2 | 1,2 | 0,6 |
| TBE (X) | 0,15 | 0,15 a 0,5 | 0,5 | 0,5 |
| Voltagem | 450 | 300 | 165 a 200 | 40 a 100 |
| Tempo de pulso | 0,3 a 1 s | 1 a 10 s | 10 a 120 s | 3 a 75min. |
| Tempo de corrida | 1 a 4 h | 1 a 6 h | 17 a 24 h | 1 a 3 dias |

(adaptação do manual do “Gene Navigator” – Amersham Biosciences)
Kb: Kilobase; TBE: Tampão Tris – Ácido Bórico – EDTA; s: segundos; h: horas.

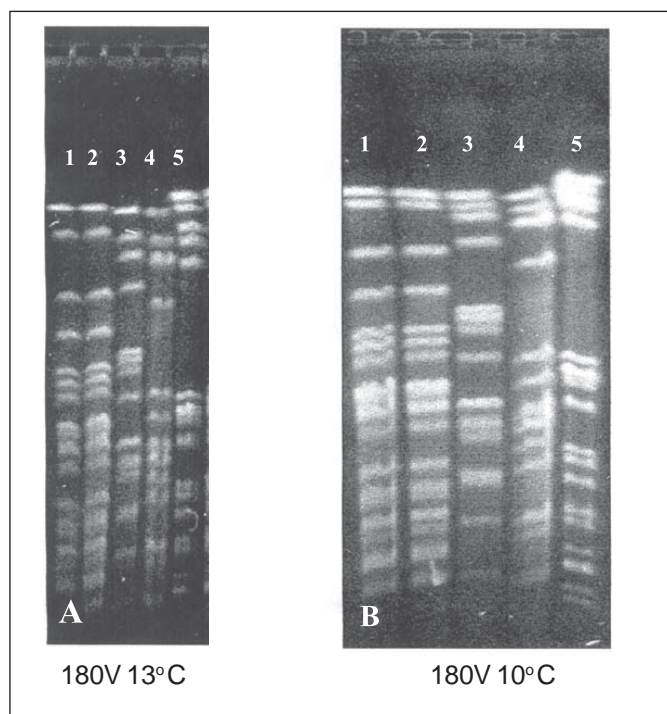


Figura 1. DNA cromossômico de amostras de *Staphylococcus aureus*, após macrorestrição com *Sma* I. PFGE realizada em aparelho Gene Navigator (Amersham Biosciences). A voltagem utilizada em ambos os géis foi de 180V, mas em duas condições de temperaturas diferentes, em A 13°C e em B 10°C. As condições de pulso foram idênticas sendo 25 segundos por 2 horas, 8 segundos por 4 horas e 0,5 segundo por 1 hora. As amostras são correspondentes em ambos os géis.

Pulsos elétricos de diferentes durações favorecem a reorientação de moléculas de DNA de diferentes tamanhos. A duração do tempo de pulso é o fator mais importante para determinação da faixa de tamanho de fragmentos a serem separados¹⁴. A duração do pulso deverá possibilitar a reorientação e a migração do polímero para uma nova direção. Pulsos mais longos possibilitam a reorientação de moléculas grandes; pulsos curtos reorientam tão somente as pequenas moléculas de DNA². Além disso, a ordem pela qual os diferentes pulsos são aplicados, também altera a resolução dos fragmentos identificados no gel (Figura 2).

A força do campo elétrico aplicado deve ser inversamente proporcional ao tamanho das moléculas de DNA que se deseja separar, ou seja, quanto maior o fragmento, menor deverá ser a tensão. Voltagem ou correntes altas podem diminuir a resolução. Alterações na tensão deverão ser compensadas com alterações no tempo de pulso para que os resultados sejam satisfatórios. Para separar moléculas de DNA bacteriano de até 1,5 Mb geralmente utiliza-se 6 V/cm (medida entre dois eletrodos opostos). Para separar cromossomos de *Neurospora crassa*, por exemplo, é utilizada um campo de 1,5 V/cm¹⁴.

O ângulo mais frequentemente utilizado em PFGE é o de 120°, que é o ângulo do aparelho CHEF-DRII (Bio-Rad) e do Gene Navigator (Amersham Biosciences), amplamente utilizados

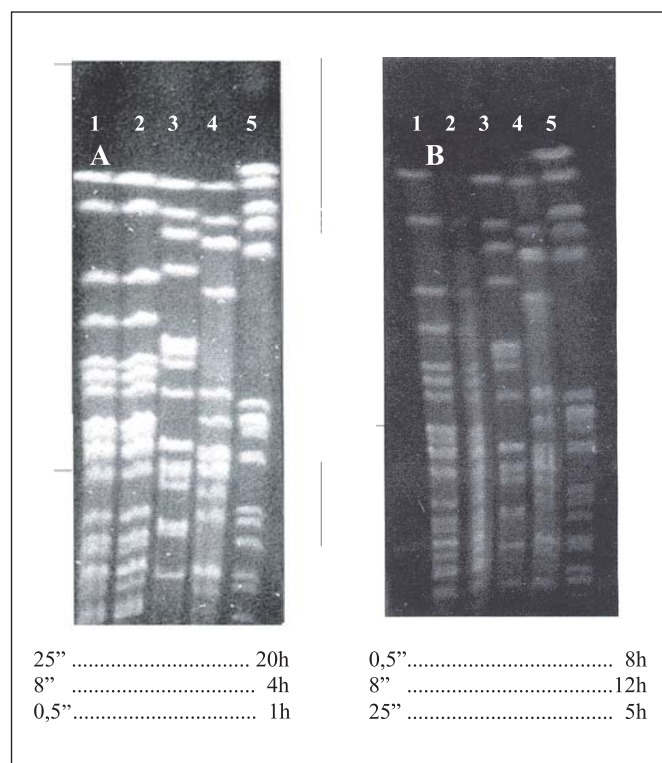


Figura 2. DNA cromossômico de amostras de *Staphylococcus aureus*, após macrorestrição com enzima *Sma* I em duas condições diferentes de pulsos especificadas em, A e B. A voltagem utilizada foi de 180V e a temperatura 13°C em ambos os géis. As amostras são correspondentes em ambos os géis.

pelos laboratórios de pesquisa. Nesses aparelhos as distâncias entre os eletrodos são distintas, e a tensão é adaptada de acordo com o equipamento empregado. Ângulos maiores reduzem a velocidade de migração, enquanto que ângulos menores possibilitam um substancial aumento na velocidade de migração de fragmentos maiores¹⁴. A forma de migração de fragmentos de DNA é dependente dos ângulos formados entre os campos elétricos que se alternam, como ficou evidenciado por experimentos de microscopia¹¹.

A condutividade da solução tamponante depende de sua concentração e volume. Assim, quanto maior a quantidade de solução tamponante usada, maior será a corrente elétrica, alterando a resolução da corrida eletroforética. Se a concentração da solução tamponante for aumentada, a resolução da corrida também será alterada, dificultando a separação dos fragmentos maiores, aumentando a corrente elétrica e a geração de calor. Neste caso, a temperatura de refrigeração deverá ser diminuída, para que este parâmetro não altere a eletroforese. Uma solução tamponante inadequada poderá resultar em baixa resolução na separação de fragmentos (Figura 3). Rotineiramente é usada solução tamponante TBE (Tris, Ácido Bórico, EDTA) com concentração de 0,5X. Entretanto, o Tris foi relatado como agente de degradação do DNA, e alguns autores obtiveram melhores resultados com o uso de outra solução tamponante, como o HEPES (N-[2-Hydroxyethyl] piperazine – N'-[2-ethanesulfonic acid])^{15,16,17}.

Melhor resolução na separação dos fragmentos eletroforéticos é obtida com o aumento da concentração de agarose, como na eletroforese horizontal, o que também interfere no tempo necessário para separação dos fragmentos. Com o uso de gel mais concentrado é necessário maior tempo de corrida,

porém com concentração mais baixa a separação dos fragmentos pode não ocorrer satisfatoriamente. Na prática, a concentração máxima de agarose usada varia de 1,2 a 2%.

Alterações na temperatura de corrida interferem na resolução, pois quanto maior a temperatura, mais rápida será a migração das moléculas¹⁴. Temperaturas de 8 até 15°C são as mais utilizadas.

A qualidade do DNA preparado para a corrida eletroforética é de fundamental importância. Como o objetivo é a separação de fragmentos de alto peso molecular, é imprescindível assegurar sua integridade. Moléculas grandes de DNA em solução, normalmente utilizadas nas preparações convencionais sofrem danos proporcionais ao quadrado de seu peso molecular². Assim, a extração de DNA cromossômico a ser usado em PFGE é feita com a incorporação das células bacterianas a serem lisadas em blocos de agarose, que proporciona proteção mecânica às moléculas de DNA. Durante o preparo dos blocos, a proporção entre as células bacterianas e a agarose, “low melting” ou ultra pura, deve ser 1:1, pois o excesso de agarose produz blocos rígidos, que dificultam a posterior digestão do DNA, bem como, nas etapas de lavagem, a remoção dos interferentes (proteínas, DNAses, etc.)⁵. Contrariamente, se a concentração de agarose for menor, o bloco terá consistência mole e pode ser destruído durante o processo de lavagem. A agarose “low melting” facilita o trabalho de confecção dos blocos, pois possibilita trabalhar com temperatura em torno de 37°C, entretanto, é possível confeccioná-los utilizando agarose ultra pura (Gibco), mas a temperatura na preparação dos blocos deve ser mantida em torno de 45°C. Este procedimento requer grande quantidade de enzimas líticas e/ou de restrição e maior tempo de digestão que os usados em metodologias convencionais, pois é preciso que as enzimas atravessem as barreiras impostas pela agarose. São também necessárias lavagens exaustivas para se eliminar traços das enzimas líticas que poderão afetar as etapas subsequentes. Outro aspecto importante no preparo das moléculas de DNA cromossômico de alto peso molecular é a proteção do material contra DNAses que são ativadas pela lise celular. Com este intuito é usada uma solução contendo um agente quelante em alta concentração (EDTA 0,5 M), que seqüestra os íons de magnésio que atuam como co-fatores das DNAses. Uma outra vantagem com a incorporação do DNA em gel de agarose é a estabilidade das amostras durante meses, quando mantidas em temperatura ambiente e durante um tempo indefinido quando conservadas em temperatura de 4°C. Este fato possibilita a reprodutibilidade de experimentos ou troca de amostras entre grupos de pesquisa².

A variação entre os pulsos pode ocorrer de forma contínua, numa abordagem dita “INTERPOLATED” ou de forma abrupta (“STEPPING”). A variação contínua entre os pulsos de 5 e 10 segundos por 2 horas, por exemplo significa que o tempo de pulso do campo elétrico em cada direção irá aumentar de 5 para 10 segundos, paulatinamente, ao longo de duas horas. No formato de “STEPPING”, pulsos de 5 segundos em direções

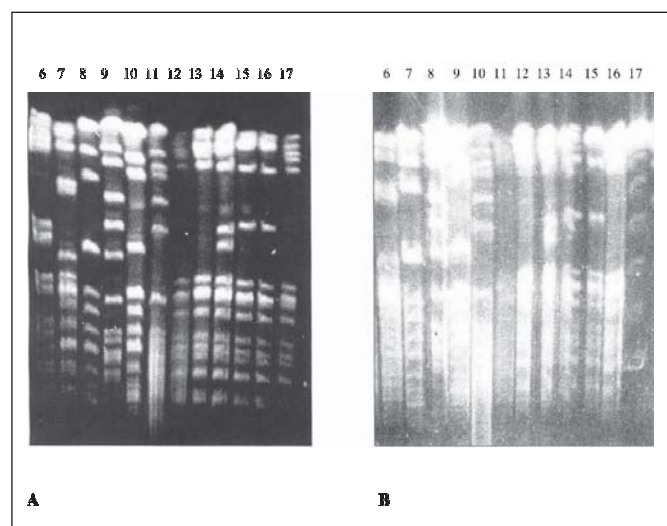


Figura 3. DNA cromossômico de amostras de *S. aureus* após macrorestrição com *Sma* I. Foram utilizadas as mesmas amostras bacterianas (*S. aureus* 6 – 17), a mesma temperatura de 13°C e a mesma voltagem de 180V na corrida eletroforética. A solução tamponante utilizada foi TBE 0,5 X nos dois géis, mas a utilizada na corrida eletroforética “B” apresentava-se precipitada. As mesmas amostras são correspondentes em ambos os géis.

alternadas ocorrem por duas horas seguidas e, numa segunda fase, os campos elétricos passam a trocar de direção a cada 10 segundos (Figura 4).

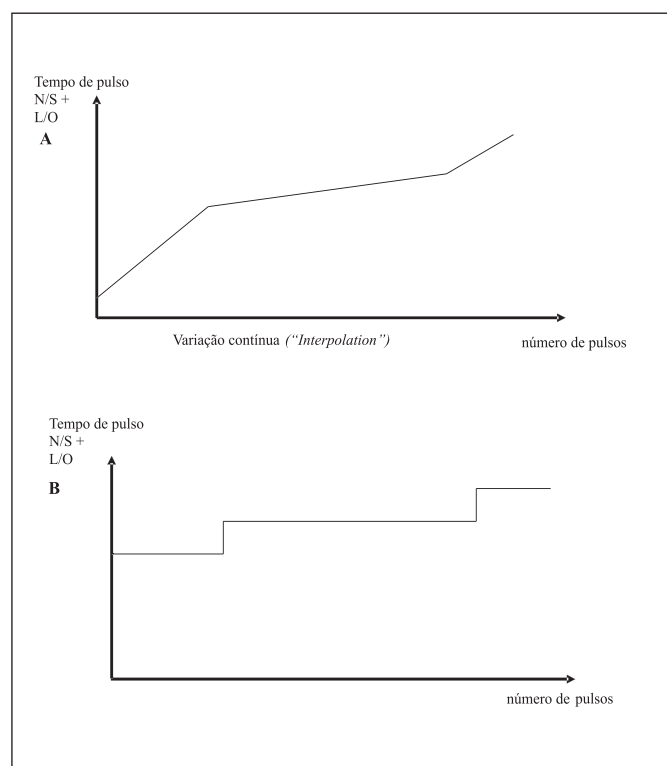


Figura 4. DNA cromossômico de amostras de *Staphylococcus aureus*, após macrorestrição com enzima *Sma* I em duas condições diferentes de pulsos especificadas em, A e B. A voltagem utilizada foi de 180V e a temperatura 13°C em ambos os géis. As amostras são correspondentes em ambos os géis.

Aplicações

Em seu trabalho de 1984, Schwartz e Cantor³ descreveram um novo método de separação de cromossomos da levedura *Saccharomyces cerevisiae* que facilitava a designação de genes específicos a determinados cromossomos por técnicas de hibridização. Após a separação dos cromossomos (cariotipagem) os mesmos foram transferidos para uma membrana e hibridados com uma sonda radioativa para indicar a localização do gene de interesse ("Southern blot").

A clonagem de fragmentos de alto peso molecular em vetores do tipo YAC ("yeast artificial chromosomes") com capacidade de receber insertos de até 2 Mb de forma estável foi possibilitada pela técnica de PFGE^{18,19}.

Algumas informações sobre a organização genômica de protozoários foram adquiridas através da técnica de PFGE. Estes organismos não apresentam condensação de cromossomos durante a metáfase e possuem um grande número de repetições *in tandem* de genes codificadores de proteínas. Informações básicas como a ploidia, número e tamanho dos cromossomos

(cariotipagem) eram desconhecidas, para a maioria das espécies. A técnica de PFGE permitiu a construção de bibliotecas genômicas destas regiões que, de outra forma, não poderiam ser analisadas²⁰.

A caracterização de linhagens patogênicas é fundamental para fins epidemiológicos. Nas últimas décadas, a identificação de linhagens bacterianas baseada em características fenotípicas cedeu espaço para as abordagens genotípicas por técnicas de biologia molecular e, entre elas o PFGE é uma das mais aceitas e utilizadas^{21,22}. Para estudos epidemiológicos de *Staphylococcus aureus*, por exemplo, embora a fagotipagem ainda seja utilizada, a eletroforese de campo pulsante é considerada o padrão-ouro. Foi utilizando esta técnica que Kreiswirth et al.²³ mostraram que a maioria de *S. aureus* resistentes à metilina (MRSA) isolados ao redor do mundo possuíam uma origem comum. Também foi estudada através de PFGE a epidemiologia de enterococos resistentes à vancomicina (VRE), que difere quanto à origem em hospitais americanos e europeus^{24,25}, a rota de transmissão de bactérias Gram-negativas como *Burkholderia cepacia* e *Pseudomonas aeruginosa* entre pacientes de fibrose cística envolvidas em infecções nosocomiais intra e inter-hospitalar^{26,27}. A cariotipagem de várias espécies da levedura *Candida*, por exemplo, revelou variabilidade intra-específica que também foi utilizada para estudos de transmissão entre pacientes imunodeprimidos^{28,29}.

PFGE é utilizada tanto para estudos de surtos hospitalares de pequenas proporções^{30,31}, quanto na comparação de populações bacterianas, envolvendo microrganismos de diferentes países, ampliando o escopo epidemiológico da técnica³².

A interpretação de PFGE para identificação de linhagens bacterianas

Com o intuito de se discriminar linhagens bacterianas de uma mesma espécie, o DNA bacteriano total, incorporado em bloco de agarose, é digerido com enzimas de restrição que clivam o cromossomo em grandes fragmentos. Em PFGE são necessárias de 30 a 40U de enzima para cada bloco de agarose e o tempo de incubação pode variar de 18 a 24 horas. Os fragmentos gerados são, então separados por eletroforese de campo pulsante. A abordagem, apesar de simples, suscita uma série de dúvidas: Qual enzima utilizar com determinada espécie bacteriana? O que acontece com o padrão de bandas se houver uma mutação no sítio de reconhecimento da enzima? Pequenas diferenças, uma ou duas bandas, entre os perfis obtidos de duas bactérias testadas são suficientes para identificá-las como linhagens diferentes? Em 1995, Tenover e colaboradores²² publicaram critérios de interpretação de resultados de PFGE em um esforço para difundir e tornar mais homogêneo o uso desta técnica para fins epidemiológicos. Assim, se existe uma relação epidemiológica entre bactérias idênticas, provavelmente trata-se de um surto. Por outro lado, bactérias de mesma espécie e mesmo genótipo, isoladas de pacientes que não possuem uma

ligação epidemiológica detectável, podem representar linhagens endêmicas. Assume-se também que, bactérias não relacionadas epidemiologicamente, devem possuir genótipos diferentes. Segundo Tenover et al.²², bactérias envolvidas em um surto e/ou epidemia devem apresentar padrões indistinguíveis, enquanto que, aquelas não envolvidas com a epidemia devem apresentar padrões distintos. É importante, portanto, a utilização de linhagens-controle, não relacionadas epidemiologicamente. Os autores chamam a atenção para o fato de que antes de se realizar a técnica para estudos epidemiológicos, a combinação enzima de restrição/espécie bacteriana deve ter sido testada e validada. Considera-se que um mínimo de 10 fragmentos de DNA, conseqüentemente 10 bandas no gel, devem ser obtidos por bactérias para que a técnica tenha poder discriminatório relevante. Uma linhagem é considerada semelhante à outra quando ocorre um único evento genético como uma mutação, uma inserção ou deleção, que altere o padrão de bandas (Figura 5). Uma mutação tanto pode criar quanto suprimir um sítio de reconhecimento de enzima de restrição. Se um novo sítio é criado, o padrão apresentará uma banda a menos em relação à linhagem epidêmica e duas bandas menores surgirão. Se um sítio desaparece, o padrão alterado terá uma banda nova de tamanho maior que duas que desaparecerão na linhagem responsável

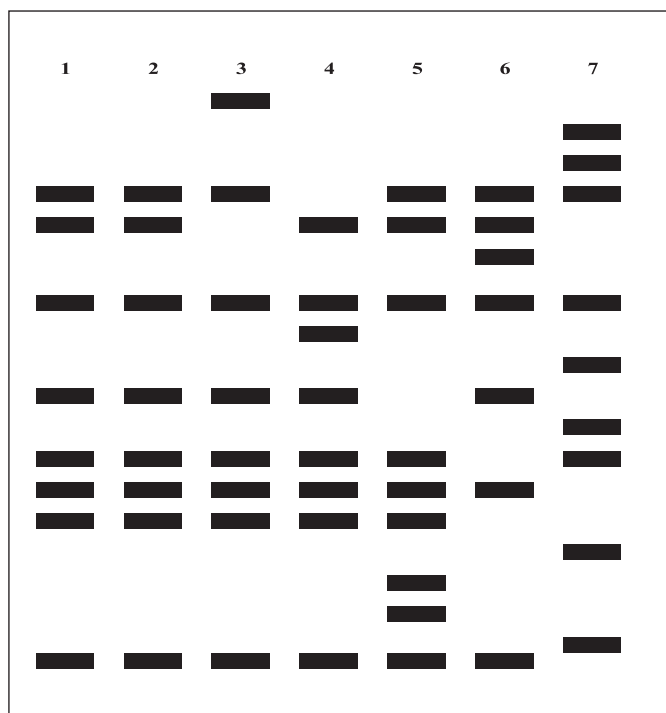


Figura 5. Esquema de padrões de PFGE. Caneletas 1 e 2 são DNA cromossômicos (crDNA) com padrões indistinguíveis e consideradas linhagens epidêmicas; canaleta 3, uma das bandas recebeu uma inserção e aumentou de tamanho; canaleta 4, uma das bandas sofreu uma deleção e diminuiu de tamanho; canaleta 5, uma mutação criou um sítio de restrição, aumentando o número de bandas; canaleta 6, uma mutação alterou um sítio de restrição e dois fragmentos foram perdidos, surgindo um de maior tamanho; canaleta 7, crDNA com padrão diferente, não relacionado ao surto.

pelo surto. Se ocorrer uma inserção de um transposon, por exemplo, e se o novo elemento não possuir um sítio reconhecível pela enzima usada, o resultado será um aumento de tamanho de uma das bandas. Se o fragmento de DNA introduzido possuir um sítio de restrição, uma banda poderá desaparecer em relação à linhagem epidêmica, e duas novas bandas surgirão. Uma deleção, por outro lado, pode fazer com que o fragmento diminua de tamanho. Qualquer um destes eventos altera o padrão da linhagem epidêmica em duas ou três bandas. Uma bactéria é considerada possivelmente relacionada quando as mudanças de padrão de restrição forem compatíveis com dois eventos genéticos, resultando em alterações envolvendo entre 4 e 6 bandas. Quando o padrão da linhagem epidêmica possuir mais da metade das bandas diferentes em relação ao padrão de outras bactérias, estas devem ser consideradas não relacionadas geneticamente. Tenover³¹ também sugere que o padrão da linhagem responsável pelo surto deve ser chamado A; aqueles semelhantes ou possivelmente relacionados de A1, A2, A3 e assim por diante. Os não relacionados devem ser designados tipo B, tipo C, etc.

PFGE é uma técnica bastante complexa com um poder discriminatório muito elevado. É considerado padrão ouro em epidemiologia molecular, mas é importante ressaltar que métodos de tipagem não substituem dados epidemiológicos, somente auxiliam e, se utilizados isoladamente, podem levar a conclusões equivocadas.

Abreviações

pb pares de bases; kb quilobases (= 1.000 bases); Mb megabases (= 1.000.000 bases); CHEF “contour-clamped homogeneous electric field”; FIGE “field-inversion gel electrophoresis”; OFAGE “orthogonal-field-alternation gel electrophoresis”; PACE “programmable autonomously controlled electrode”; PHOGE “pulsed homogeneous orthogonal-fields”; ROFE “rotating-field electrophoresis”; TAFE “transverse-alternating field electrophoresis”; ZIFE “zero-integrated field electrophoresis”.

REFERÊNCIAS

1. Fangman W. Separation of very large DNA molecules by gel electrophoresis. *Nucleic Acid Res* 1978; 5: 653-65.
2. Smith CL, Cantor CR. Purification, specific fragmentation, and separation of large DNA molecules. *Meth Enzimol* 1987; 155: 449-67.
3. Schwartz DC, Cantor RC. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell* 1984; 37: 67-75.
4. Klotz LC, Zimm BH. Retardation times of deoxyribonucleic acid solutions. II. Improvements in apparatus and theory. *Macromolecules* 1972; 5: 471-81.
5. Birren B, Lai E. Switch intervals and resolution in pulsed field gels. In: *Pulsed field gel electrophoresis. A practical guide*. San Diego: Academic Press; 1993. p.107-20.
6. Deutsch JM. The dynamics of DNA gel electrophoresis. In: *Burmeister, M., Ulanovsky, L. Pulsed-Field Gel Electrophoresis – Protocols, Methods and Theories*. New Jersey: Humana Press; 1992. p. 367-84.

7. Gennes PG. Reptation of a polymer chain in the presence of fixed obstacle. *J Chem Phys* 1971; 55: 572-9.
8. Lerman LS, Frisch HL. Why does the electrophoretic mobility of DNA in gels vary with the length of the molecule? *Biopolymers* 1982; 21: 995-7.
9. Lumpkin OJ, Dejardin P, Zimm BH. Theory of gel electrophoresis of DNA. *Biopolymers* 1985; 24: 1575-93.
10. Bustamante C, Gurrieri S, Smith SB. Towards a molecular description of pulsed field gel electrophoresis. *TIBTECH* 1993; 11: 23-30.
11. Gurrieri S, Smith SB, Wells KS, Johnson ID, Bustamante C. Real-time imaging of the reorientation mechanisms of YOYO-labelled DNA molecules during 90° and 120° pulsed field gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res* 1996 24: 4759-67.
12. Pfaller MA, Messer SA, Hollis RJ. Strain delineation and antifungal susceptibilities of epidemiologically related and unrelated isolates of *Candida lusitanae*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1994; 20: 127-33.
13. Chu G, Vollrath D, Davis RW. Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogeneous electric fields. *Science* 1986; 232: 1582-5.
14. Maule J. Pulsed-field gel electrophoresis. *Mol Biotechnol* 1998; 9: 107-26.
15. Koort JM, Lukinmaa S, Rantala M, Unkila E, Siitonen A. Technical improvement to prevent DNA degradation of enteric pathogens in pulsed field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 3497-8.
16. Ray T, Weaden J, Dyson P. Tris-dependent site-related cleavage of *Streptomyces lividans* DNA. *FEMS Microbiol Lett* 1992; 96: 247-52.
17. Römmling V, Tümmler B. Achieving 100% typeability of *Pseudomonas aeruginosa* by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 200; 38: 464-5.
18. Burke DT, Carle GF, Olson MV. Cloning of large DNA fragments of exogenous DNA into yeast by means of artificial chromosome vectors. *Science* 1987; 236: 806-12.
19. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2.ed. United States of America: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989. vol.1, p.1.21-1.31.
20. Van der Ploeg LHT, Gottesdiener M, Kormun H, Weiden M, Le Blancq S. Protozoan Genomes: Karyotype analysis, chromosome structure, and specific libraries. In: Burmeister M, Ulanovsky L, eds. *Pulsed-Field Gel Electrophoresis – Protocols, Methods and Theories*. The Human Press Inc. 1991, p 203-24.
21. Miragaia M, Couto I, Perreria SF, Kristinsson KG, Westh H, Jarlov JO, et al. Molecular characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* clones: evidence geographic dissemination. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 430-8.
22. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2233-9.
23. Kreiswirth B, Kornblum J, Arbeit RD, Eisnes W, Maslow JN, Mageer M, et al. Evidence for a clonal origin of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Science* 1993; 259: 227-30.
24. Boyle JF, Soumakis SA, Rendo A, Herrington JA, Gianarkis DG, Thurberg BE, Painter BG, et al. Epidemiological analysis and genotypic characterization of a nosocomial outbreak of vancomycin-resistant enterococci. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 1280-5.
25. Endtz HP, Van den Braak N, Kluytmans JA, Koeleman JG, Spanjaard L, Voss A, et al. Fecal carriage of vancomycin-resistant enterococci in hospitalized patients and those living in the community in the Netherlands. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 3026-31.
26. Pellegrino FL, Teixeira LM, Carvalho M dM da G, Aranha Nouer S, Pinto de Oliveira M, Mello Sampaio JL, et al. Occurrence of a multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clone in different hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 2420-4.
27. Speert DP, Henry D, Vandamme P, Corey M, Mahenthalingam E. Epidemiology of *Burkholderia cepacia* Complex in patients with cystic fibrosis, Canada. *Emerg Infect Dis* 2002; 8: 181-7.
28. Dib J C, Dube M, Kelly C, Rinaldi ME, Patterson JE. Evaluation of pulsed field gel electrophoresis as typing system for *Candida rugosa*: comparison of karyotype and restriction fragment length polymorphisms. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 1494-6.
29. Pfaller MA. Typing methods for epidemiologic investigation. In : Ballows, A. *Manual of clinical microbiology*. 5ed. Washington: American Society for Microbiology; 1991. p.171-82.
30. Darini AL, Magalhães VD, Levy CL, Barth AL, Coscina AL. Phenotyping and genotyping methods applied to investigate the relatedness of Brazilian isolates of *Enterobacter cloacae*. *Braz J Med Biol Res* 1999; 32: 1077-81.
31. Magalhães VD, et al. Third generation cephalosporins selecting a particular strain of multiresistant *Staphylococcus aureus*. Abstract presented at the 97th General Meeting of the American Society for Microbiology, Miami Beach, Florida 1997; 195L: 375.
32. Liu SL, Schryvers AB, Sanderson KE, Johnston RN. Bacterial phylogenetic clusters revealed by genome structure. *J Bacteriol* 1999; 181: 6747-55.

Medidas da estabilidade oxidativa e compostos polares totais do óleo de soja refinado e da gordura vegetal hidrogenada em frituras

Measurement of oxidative stability and total polar compounds in refined soybean oil and hydrogenated vegetable fat during frying procedure

RIALA6/1034

Neuza JORGE^{1*}; Patrícia de Carvalho DAMY²; Mara da Silva CORSINI³; Patrícia Vieira DEL RÉ²

* Endereço para correspondência: ¹ Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista. Rua Cristóvão Colombo, 2265 – Jardim Nazareth. CEP 15054-000 – São José do Rio Preto – SP. e-mail: njorge@eta.ibilce.unesp.br

² Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos – IBILCE – UNESP

³ Aluna de Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos – IBILCE – UNESP

Recebido: 14/11/2003 – Aceito para publicação: 11/07/2005

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi determinar a medida da estabilidade oxidativa e a alteração total do óleo de soja refinado e da gordura vegetal hidrogenada durante a fritura de batatas *chips*, às temperaturas de 170 e 180°C. As frituras foram feitas em fritadeira doméstica, em que o óleo foi aquecido por 7,5 horas, com reposição de óleo fresco. Nas amostras obtidas durante o processo de fritura foram analisados: medida da estabilidade oxidativa (horas) e compostos polares totais (%). Os resultados obtidos das determinações analíticas foram submetidos às análises de variância, empregando um esquema fatorial, no delineamento inteiramente casualizado. Constatou-se uma redução do período de indução, conforme o aumento do tempo de aquecimento, independentemente dos tipos de óleo e das temperaturas. Destaca-se, ainda, que os valores do período de indução foram maiores nas frituras com gordura vegetal hidrogenada do que os valores obtidos nas frituras com óleo de soja refinado, o que pode ser atribuído ao baixo grau de insaturação da gordura vegetal hidrogenada. Verificou-se que as amostras apresentaram valores de compostos polares totais abaixo do limite, exigido pela legislação (24-27%), para descarte para óleos de fritura e que pode ter ocorrido em função da baixa relação superfície/volume e também pela constante reposição de óleo fresco. **Palavras-Chave.** estabilidade oxidativa, compostos polares totais, óleo de soja, gordura vegetal hidrogenada.

ABSTRACT

The purpose of this study was to determine the oxidative stability and the total changes in both refined soybean oil and hydrogenated vegetable fat during frying process of chipped potatoes, at temperatures of 170 and 180°C. The frying procedures were carried out in a household frying-pan, where the oil was heated for up to 7.5 hours with periodical addition of fresh oil. In oil samples collected during the frying process, the oxidative stability measurement (hours), and the total polar compounds (%) were determined. Results from these analytical determinations were submitted to variance analysis, using a factorial system, in a thoroughly randomized design. A shortening of induction period was noticed according to the increase in heating period of time whatever the oil types and temperatures were used. It is noteworthy to mention that the induction period values were higher in frying processes with hydrogenated vegetable fat than those observed in refined soybean oil, which can be attributed to the lower grade of unsaturation in hydrogenated vegetable fat. It was observed that the samples presented total polar compounds values below than the discarding limit for frying oils according to the legislation (24-27%), which may be due to the low surface/volume ratio, and also for frequent replacing with fresh oil.

Key Words. oxidative stability, total polar compounds, soybean oil, hydrogenated vegetable fat.

INTRODUÇÃO

Durante o processo de fritura, os óleos e gorduras estão expostos à ação de agentes que contribuem para diminuir sua qualidade e modificar sua estrutura. O nível de alteração depende, sobretudo, das características do alimento, da absorção de ar e da temperatura utilizada e, como conseqüência, a degradação logicamente será tanto maior quanto mais prolongado é o período de utilização do óleo e/ou gordura e quanto maior sua insaturação¹.

O aumento do tempo de aquecimento se traduz, logicamente em um incremento do nível de alteração², porém sua principal conseqüência é a diferente composição quantitativa dos compostos de alteração. O tempo de permanência do produto na fritadeira para atingir o desenvolvimento da cor e textura adequada, coagulação de proteínas, desidratação parcial, gelificação de amidos, etc., depende da temperatura utilizada, porque a temperatura e o tempo de aquecimento são variáveis dependentes entre si.

A influência da temperatura sobre a alteração foi demonstrada por muitos autores^{3,4}, os quais constataram que a partir de aproximadamente 200°C o efeito é muito mais drástico⁵.

Já, a insaturação da gordura tem sido considerada há muito tempo, como uma das variáveis mais importantes, devido à distinta reatividade dos ácidos graxos insaturados. A maioria dos autores recomenda a utilização de gorduras de insaturação média ou baixa, de elevada qualidade inicial⁶. Quando se dispõe de várias gorduras com baixo grau de insaturação ou semelhante, deve-se esperar alta estabilidade para as mesmas, entretanto, podem-se observar diferentes resultados dependendo de sua qualidade inicial⁷.

A complexidade do processo de fritura implica em inúmeras reações produzindo numerosos produtos de decomposição. A questão é como definir o ponto correto para descartar um óleo e/ou gordura utilizada na fritura, ou seja, até quando pode-se utilizar um óleo e/ou gordura sem que este comprometa negativamente o desempenho do produto final e não traga prejuízos à saúde. Não há um único caminho para se obter essa resposta, pode ser adequado para uma condição, mas totalmente insatisfatório para outras, pois muitas são as variáveis, o que vem refletido em um aumento nos estudos dirigidos para conhecer um pouco mais sobre os compostos alterados formados durante o processo, e desta forma definir os óleos e/ou gorduras mais idôneos para a fritura^{8,9}.

O objetivo deste trabalho foi determinar a medida da estabilidade oxidativa e a formação de compostos polares totais do óleo de soja refinado e da gordura vegetal hidrogenada durante fritura de batatas *chips*, às temperaturas de 170 e 180°C.

MATERIAL E MÉTODOS

Processo de fritura

Os ensaios de fritura descontínua de batatas, com óleo de soja refinado (OSR) e gordura vegetal hidrogenada (GVH), Frygill PF32 - Cargill Agrícola S.A, foram conduzidos em fritadeira

doméstica comercial, com capacidade de 3 litros, relação superfície/volume de 0,3 cm⁻¹. As temperaturas utilizadas foram 170 e 180°C. Quinze lotes, cada um com aproximadamente 500 gramas de batatas da variedade “binje”, cortadas em fatias foram fritos por um período de 8 minutos. Foram empregados intervalos de 25 minutos entre cada operação de fritura, sendo que 5 minutos foram utilizados para o reaquecimento do óleo antes de reiniciar cada fritura. O óleo foi aquecido por um período aproximado de 7,5 horas empregando reposição de óleo fresco após cada operação de fritura para manter a relação superfície/volume constante.

Após a fritura de cada lote de batatas, amostras de óleo ou gordura foram retiradas em diferentes intervalos de tempo (0,5; 3,5; 5,5 e 7,5 horas), e armazenadas à temperatura de -20°C para evitar posteriores alterações oxidativas incontrolláveis. As amostras foram descongeladas apenas no momento das análises, as quais foram realizadas em duplicatas.

Determinações analíticas

- **Medida da estabilidade oxidativa** – A medida da estabilidade de óleos é definida como o ponto de máxima mudança da oxidação, e foi obtida pelo método AOCS Cd 12b-92 (1993)¹⁰. A curva de condutividade elétrica x tempo foi automaticamente registrada com o decorrer da reação e do teste, sendo o período de indução determinado em horas, utilizado-se o Rancimat, marca METROHM, modelo 743. Ajustou-se a temperatura da análise em 100°C e fluxo de ar em 20 L/h.
- **Compostos polares totais** – A determinação de compostos polares totais foi realizada através de cromatografia em coluna, conforme o método cromatográfico proposto por Waltham e Wessels¹¹ com uma pequena modificação: o uso de hexano:éter etílico 90:10, ao invés de 87:13, para produzir uma melhor separação da fração não polar¹².

Análise estatística

O experimento foi realizado em um esquema fatorial 2x2x5 com dois tipos de óleo (OSR e GVH), duas temperaturas (170 e 180°C) e cinco tempos de fritura (0; 0,5; 3,5; 5,5 e 7,5 horas), no delineamento inteiramente casualizado. Os resultados obtidos das determinações analíticas, em duplicata, foram submetidos à análise de variância e as diferenças entre as médias foram testadas a 1 e 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey, através do programa ESTAT – Sistema para Análises Estatísticas, versão 2.0, 1999, Brasil.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta a composição em ácidos graxos iniciais do óleo de soja refinado e da gordura vegetal hidrogenada utilizados nas frituras de batatas *chips*. A linha correspondente a “outros” refere-se aos ácidos graxos cuja concentração não supera 1% na amostra.

A composição em ácidos graxos do óleo de soja refinado e da gordura vegetal hidrogenada indica diferenças entre eles. Enquanto o óleo de soja refinado apresenta elevados valores de ácidos poliinsaturados (63,1%), a gordura vegetal hidrogenada apresenta valores bem inferiores destes ácidos, cerca de 15%. Por outro lado, a gordura vegetal hidrogenada apresentou valores superiores de ácidos graxos saturados (18,39%) quando comparada com o óleo de soja refinado (14,68%) e, também, de ácidos graxos monoinsaturados, ou seja, 65,71 e 22,18% para a gordura vegetal hidrogenada e óleo de soja refinado, respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1. Composição em ácidos graxos iniciais do OSR e da GVH em frituras de batatas *chips*.

| Composição em Ácidos Graxos(% de área)* | OSR | GVH |
|---|-------|-------|
| C16:0 | 11,42 | 11,48 |
| C18:0 | 3,26 | 6,91 |
| C18:1 <i>trans</i> | - | 26,36 |
| C18:1 <i>cis</i> | 22,18 | 39,35 |
| C18:2 <i>trans</i> | - | 7,63 |
| C18:2 <i>cis</i> | 56,24 | 7,57 |
| C18:3 <i>cis</i> | 6,90 | - |
| Outros | - | 1,36 |

OSR - Óleo de soja refinado; GVH - Gordura vegetal hidrogenada.

* Dados fornecidos pela Cargill Agrícola S.A.

Tabela 2. Resultados da análise de variância para as determinações: medida da estabilidade oxidativa (MEO) e compostos polares totais (CPT).

| Causas de Variação | G.L. | Quadrados Médios MEO | CPT |
|--|------|----------------------|----------------------|
| Tipos de óleo | 1 | 44708,6136** | 187,0562** |
| Temperaturas | 1 | 46,3756** | 0,0062 ^{ns} |
| Tempos de fritura | 4 | 3212,0256** | 31,4365** |
| Tipos de óleo x temperaturas | 1 | 52,2808** | 0,0063 ^{ns} |
| Tipos de óleo x tempos de fritura | 4 | 2055,6257** | 25,6663** |
| Temperaturas x tempos de frituras | 4 | 8,1251** | 0,1100 ^{ns} |
| Tipos de óleo x temperaturas x tempos de fritura | 4 | 4,0411** | 0,0863 ^{ns} |
| Resíduo | 20 | 0,4932 | 0,7828 |
| Desvio-padrão | | 0,7023 | 0,8847 |
| Coefficiente de variação (%) | | 1,79 | 10,44 |

^{ns} Não significativo (P > 0,05)

* Significativo (P < 0,05)

** Significativo (P < 0,01)

A Tabela 2 apresenta a análise de variância para a medida da estabilidade oxidativa e determinação dos compostos polares totais, utilizando-se os valores obtidos ao longo do período de aquecimento de 7,5 horas.

Quanto à medida da estabilidade oxidativa, pode-se observar (Tabela 2) que todos os efeitos principais e as interações foram significativos (P < 0,01). Então, foi necessário proceder ao desdobramento da interação tipos de óleo x temperaturas x tempos de fritura. Os resultados das médias do período de indução para cada combinação encontram-se na Tabela 3.

Em relação aos tempos de fritura, observa-se uma redução do período de indução, conforme o aumento do tempo de aquecimento nos processos de fritura das batatas, independentemente dos tipos de óleo e das temperaturas. Para o óleo de soja refinado, os valores de período de indução diferiram entre si apenas nos tempos de fritura 0,5 e 3,5 horas. Já, a gordura vegetal hidrogenada apresentou menores períodos de indução à 180°C a partir do tempo de fritura 0,5 hora em relação à 170°C.

Verifica-se que tanto nas frituras à 170°C como nas frituras à 180°C, os valores do período de indução diferiram entre si em todos os tempos de fritura. Observa-se, ainda, que os valores do período de indução são maiores nas frituras realizadas com gordura vegetal hidrogenada do que os valores obtidos nas frituras com óleo de soja refinado, independentemente das temperaturas e tempos de fritura, o que pode ser atribuído ao grau de insaturação.

Del Ré¹³, estudando o comportamento de diferentes óleos vegetais em frituras descontínuas de produtos pré-fritos congelados (batata palito e *snacks* - produto cárneo empanado), destaca que o período de indução foi maior nas frituras dos *snacks* do que nas batatas, atribuindo o fato à quantidade de ácidos graxos saturados liberados no óleo durante o processo de fritura, reforçando que a estabilidade oxidativa está igualmente relacionada com o grau de insaturação do óleo ou gordura.

Quanto à medida de compostos polares totais do óleo/gordura, pode-se observar na Tabela 2 que o teste F foi não significativo (P > 0,05) para o efeito das temperaturas sobre os compostos polares totais. Entretanto, ocorreu interação significativa (P < 0,01) entre os fatores: tipos de óleo e tempos de fritura, procedendo-se, desta forma, o desdobramento da interação, cujos resultados encontram-se na Tabela 4. Observa-se primeiramente que os resultados das amostras iniciais para o óleo de soja refinado, encontram-se dentro dos limites estabelecidos para óleos refinados. Segundo Lumley¹⁴, o conteúdo de compostos polares totais em um óleo novo deve oscilar entre 0,4 a 6,4%.

Destaca-se para o óleo de soja refinado, que os valores de compostos polares totais aumentaram ao longo do tempo de fritura. É importante salientar que no tempo de fritura 3,5 horas o aumento foi bem mais elevado, devido ao maior intervalo de

Tabela 3. Médias da medida da estabilidade oxidativa, para cada combinação de tipos de óleo x temperaturas x tempos de fritura.

| Tempos de Fritura (horas) | OSR | | GVH | |
|------------------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | 170°C | 180°C | 170°C | 180°C |
| Inicial | 12,47 ^{aAβ} | 12,47 ^{Aaβ} | 133,65 ^{aAα} | 133,65 ^{aAα} |
| 0,5 | 5,37 ^{bBβ} | 7,22 ^{bAβ} | 77,64 ^{bAα} | 74,11 ^{bBα} |
| 3,5 | 4,62 ^{bcAβ} | 3,15 ^{cBβ} | 62,67 ^{cAα} | 54,40 ^{cBα} |
| 5,5 | 3,21 ^{cAβ} | 3,07 ^{cAβ} | 51,35 ^{dAα} | 44,34 ^{dBα} |
| 7,5 | 2,60 ^{cAβ} | 3,03 ^{cAβ} | 48,71 ^{eAα} | 45,32 ^{dBα} |

A, b... - Em cada coluna, médias dos tempos de fritura seguidas de mesma letra minúscula, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P > 0,05);
 A, B - Em cada linha, médias de temperaturas em cada tipo de óleo seguidas de mesma letra maiúscula, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P > 0,05);
 α, β - Em cada linha, médias de tipos de óleo em cada temperatura seguidas de mesma letra grega, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P > 0,05).

Tabela 4. Desdobramento da interação tipos de óleo x tempos de fritura para os dados de compostos polares totais.

| Tipos de Óleo | Tempos de Fritura (horas) | | | | |
|---------------|---------------------------|--------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| | Inicial | 0,5 | 3,5 | 5,5 | 7,5 |
| OSR | 6,30 ^{dA} | 7,65 ^{dA} | 10,80 ^{cA} | 12,93 ^{bA} | 15,50 ^{aA} |
| GVH | 5,85 ^{aA} | 6,40 ^{aA} | 6,58 ^{aB} | 6,08 ^{aB} | 6,65 ^{aB} |

a, b... (linha) - em cada tipo de óleo, médias dos tempos de fritura seguidas de mesma letra minúscula, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P > 0,05);
 A, B (coluna) - em cada tempo de fritura, médias dos tipos de óleo seguidas de mesma letra maiúscula, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P > 0,05).

tempo, ou seja, do tempo de fritura 0,5 hora para 3,5 horas, o intervalo foi de três horas de aquecimento; enquanto nas frituras seguintes, o intervalo entre frituras foi de apenas duas horas. Já, para a gordura vegetal hidrogenada, durante o processo de fritura, os valores para os compostos polares totais não diferiram entre si.

Verifica-se, portanto, que ao longo do processo de fritura, o óleo de soja refinado apresenta maiores alterações em relação à gordura vegetal hidrogenada, sendo que somente nos tempos de fritura referentes ao óleo inicial e 0,5 hora os óleos não diferiram significativamente entre si, e no tempo de fritura 7,5 horas o óleo de soja refinado apresentou uma alteração 2,3 vezes maior em relação à gordura vegetal hidrogenada. Este fato pode estar atribuído ao grau de insaturação, que é um fator que acelera reações termoxidativas no óleo de fritura e, conseqüentemente, aumenta a sua alteração.

Considerando que o limite de descarte para óleos de fritura exigido pela legislação de alguns países é de 24 - 27% para compostos polares totais¹⁵, o óleo de soja refinado e gordura vegetal hidrogenada, apresentaram valores bem abaixo deste limite, o que pode ser devido à baixa relação superfície/volume (0,2 cm⁻¹) e também à reposição constante de óleo novo empregado neste processo.

Masson et al.¹⁶, estudando sobre o comportamento dos óleos poliinsaturados obtidos de estabelecimentos comerciais, também obtiveram baixos resultados para os compostos polares totais. Segundo estes autores, é possível que a quantidade de óleo que incorpora na batata durante a fritura seja superior a de outros produtos fritos e isso origine uma maior velocidade de reposição de óleo fresco que, por sua vez, contribui para diminuir a degradação do óleo. Já, por outro lado, experiências de frituras realizadas em laboratórios, com e sem adição de óleo novo, dão como resultados uma alteração maior quando existe reposição, o que se atribui ao efeito catalítico dos produtos de alteração presentes nos óleos usados¹⁷.

Warner et al.¹⁸, analisando o efeito da composição dos ácidos graxos dos óleos de algodão e girassol com alto oléico em frituras de batatas *chips* e palito, observaram que a deterioração dos óleos usados para a fritura de batatas *chips* foi bem menor do que a dos óleos usados na fritura de batatas tipo palito o que pode estar relacionado com a grande reposição de óleo na fritura de batata *chips*.

A Tabela 5 apresenta os coeficientes de correlação entre as determinações analíticas, considerando os dados referentes ao tempo de fritura F₁₅. Destaca-se a correlação inversa entre a medida da estabilidade oxidativa e a análise de compostos polares totais, apresentando um alto índice de correlação de -

Tabela 5. Coeficiente de correlação entre os testes analíticos.

| | MEO | CPT |
|-----|--------|--------|
| MEO | 1,00 | -0,98* |
| CPT | -0,98* | 1,00 |

CPT – compostos polares totais; MEO – medida da estabilidade oxidativa;
* – teste significativo ($P < 0,05$).

0,98. Valores semelhantes foram encontrados por outros autores¹³ para esta correlação (-0,93), reforçando que à medida que se formam compostos de degradação diminui a estabilidade oxidativa dos óleos.

CONCLUSÕES

O óleo de soja refinado e a gordura vegetal hidrogenada apresentaram baixos valores de compostos polares totais, não ultrapassando os limites recomendados por alguns países para descarte de óleos e/ou gorduras de frituras. O óleo de soja refinado apresentou maior alteração em relação à gordura vegetal hidrogenada após 3,5 horas de aquecimento. Apesar disso, pode ser considerado ainda apto para o processo de frituras nas condições estudadas.

Em relação às temperaturas, não houve diferença significativa para o efeito das mesmas sobre os compostos polares totais. Quanto ao tempo de fritura, observou-se que a alteração do óleo de soja refinado aumentou ao longo do processo de fritura.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP pelo suporte financeiro deste projeto (Auxílio Pesquisa 01/05598-4 e Bolsas de Mestrado e Treinamento Técnico - Modalidade I - Nível III).

REFERÊNCIAS

1. Dobarganes MC, Pérez-Camino MC, Márquez-Ruiz G. Determinación de compuestos polares en aceites y grasas de fritura. *Grasas y Aceites* 1989; 40: 35-8.
2. Bracco U, Dieffenbacher A, Kolarovic L. Frying performance of palm oil and palm liquid fractions. *J Am Oil Chem Soc* 1981; 58: 6-12.
3. Fedeli E. The behaviour of olive oil during cooking and frying. In: Varela G, Bender AE, Morton IA, editors. *Frying of food: principles, changes, new approaches*. Chichester: Ellis Horwood; 1988. p. 52-81.
4. Lomanno SS, Nawar WW. Effect of heating temperature and time on the volatile oxidative decomposition of linolenate. *J Food Sci* 1982; 47:744-52.
5. Gere A. Study of some factors affecting frying fat deterioration. *Fette Seifen Anstrichm* 1983; 85: 18-22.
6. Stevenson SG, Vaisey-Genser M, Eskin NAM. Quality control in the use of deep frying oils. *J Am Oil Chem Soc* 1984; 61:1102-8.
7. Dobarganes MC, Pérez-Camino MC. Frying process: selection of fats and quality control. In: *International Meeting on Fats & Oils Technology Symposium and Exhibition*, 1991: 58-66.
8. Jorge N, Soares BBP. Comportamento do óleo de milho em frituras. *Rev Inst Adolfo Lutz* 2004; 63(1): 63-9.
9. Sanibal AAE, Mancini-Filho J. Alterações físicas, químicas e nutricionais de óleos submetidos ao processo de fritura. *Food Ingrid South Am* 2002; 18:64-71.
10. American Oil Chemists' Society. *Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society*; 1993.
11. Waltking AE, Wessels H. Chromatographic separation of polar and non-polar components of frying fats. *J Assoc Off Anal Chem* 1981; 64:1329-30.
12. Dobarganes MC, Pérez-Camino MC, González-Quijano RG. Métodos analíticos de aplicación en grasas calentadas. I. Determinación de ésteres metílicos no alterados. *Grasas y Aceites* 1984; 35:172-7.
13. Del Ré PV. Comportamento de óleos vegetais em frituras descontínuas de produtos pré-fritos congelados. São José do Rio Preto, 2003. [Dissertação de Mestrado Engenharia e Ciência de Alimentos – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista].
14. Lumley ID. Polar compounds in heated oils. In: Varela G, Bender AE, Morton ID, editores. *Frying of foods: principles, changes, new approaches*. Chichester: Ellis Horwood; 1988.166-73.
15. Firestone D, Stier RF, Blumenthal MM. Regulation of frying fats and oils. *Food Technology* 1991; 45: 90-4.
16. Masson L, Robert P, Romero N, Izaurieta M, Valenzuela S, Ortiz J et al. Comportamiento de aceite poliinsaturados en la preparación de patatas fritas para consumo inmediato: Formación de nuevos compuestos y comparación de métodos analíticos. *Grasas y Aceites* 1997; 48: 273-81.
17. Jorge N. Alterações em óleos de fritura. *Hig Alimen* 1997; 11:15-22.
18. Warner K, Orr P, Parrot L, Glynn M. Effects of frying oils composition on potato chip stability. *J Am Oil Chem Soc* 1994; 71:1117-21.

Ácidos graxos saturados em produtos alimentícios: comparação de procedimentos na análise por cromatografia gasosa

Saturated fatty acids in foodstuffs: comparison of procedures in gas chromatographic analysis

RIALA6/1035

Sabria AUED-PIMENTEL^{1*}, Miriam Solange Fernandes CARUSO¹, Edna Emy KUMAGAI¹, Valter RUVIERI², Odair ZENEBO³

* Endereço para correspondência: Laboratório de Cromatografia, Divisão de Bromatologia e Química. Av Dr Arnaldo, 355. 2º andar, sala 27. e-mail: spimente@ial.sp.gov.br

¹ Instituto Adolfo Lutz, Laboratório de Cromatografia

² Instituto Adolfo Lutz, Seção de Química Biológica

³ Instituto Adolfo Lutz, Diretoria da Divisão de Bromatologia e Química

Recebido: 17/02/2005 – Aceito para publicação: 29/09/2005

RESUMO

No presente trabalho são apresentados os resultados obtidos da comparação de metodologias adotadas nas análises de ácidos graxos saturados em laboratórios brasileiros. Foram comparados dois procedimentos de preparação de ésteres metílicos de ácidos graxos a partir dos lipídios extraídos (IUPAC 2301 e Hartman e Lago) e dois métodos de cálculo para expressar a concentração de ácidos graxos saturados em g/100g de amostra (cálculo com padrão interno ou com normalização de área multiplicada por fator de conversão teórico). As análises foram feitas por cromatografia gasosa. Foram analisadas seis amostras, sendo: ovo, biscoito recheado, biscoito amanteigado, extrato de soja, mistura para cappuccino e café. Para avaliar as diferenças entre os procedimentos foi aplicada a ANOVA, e no caso de valores com $p < 0,05$ foi utilizado o teste de Tukey (nível de confiança de 95%). Comparando os processos de preparação de ésteres metílicos não foi observada diferença significativa entre eles para todas as matrizes (considerando mesmo método de cálculo); com relação ao método de cálculo observou-se diferenças estatisticamente significativas para as amostras de café e cappuccino. Os resultados mostram que é necessária a utilização de um padrão interno para determinação quantitativa dos ácidos graxos nos alimentos e que estudos mais abrangentes devem feitos para verificar a aplicação dos fatores teóricos nos cálculos de ácidos graxos, principalmente, em produtos com ingredientes diversos.

Palavras-Chave. ácidos graxos saturados, rotulagem nutricional, análise por cromatografia em fase gasosa, ésteres metílicos de ácidos graxos.

ABSTRACT

The present paper describes the data observed in comparing procedures for determining saturated fatty acids for nutritional labeling by GC/FID. Two procedures to prepare the fatty acids methyl esters [a cold base-catalyzed with KOH 0,2 molL⁻¹ methanolic, and a base and acid - combined procedure (Hartman and Lago)] were compared. Also, two methods were evaluated for calculating the fatty acid concentration, expressed in grams per 100 grams of food (by means of internal standard, and by normalization of area multiplied by theoretical conversion factors). Six samples were analyzed: egg, two types of cookies, soya extract, cappuccino powder, and coffee powder. Variance analysis and Tukey test ($p < 0,05\%$) were applied. No significant difference was observed between the methylation procedures. On the other hand, significant difference was observed in calculating both method for determining the saturated fatty acids in cappuccino and coffee samples. The results point out that it is necessary to use internal standard to quantify the fatty acids in foodstuffs, and further studies should be done to evaluate the use of theoretical factors to calculate fatty acids composition in foodstuffs containing several ingredients.

Key Words. saturated fatty acids, nutritional labeling, GC analysis, fatty acids methyl esters.

INTRODUÇÃO

A adoção de hábitos alimentares saudáveis é um dos grandes desafios da humanidade, especialmente no que se refere à ingestão de alimentos ricos em gorduras. Nos países do ocidente são consumidos diariamente de 100 a 200g de gordura, o que corresponde à cerca de 35 a 45% da energia total da dieta¹. As gorduras, tanto de origem animal como vegetal, são constituídas por ácidos graxos saturados e insaturados, os quais desempenham importantes funções metabólicas no organismo, como transporte de vitaminas, síntese de hormônios, entre outras². Entretanto, de acordo com diversos estudos realizados em animais e em seres humanos, a ingestão de alimentos ricos em ácidos graxos saturados aumenta o risco de desenvolvimento de doenças coronarianas, devido à elevação dos níveis de colesterol plasmático¹. Com a finalidade de orientar o consumidor na escolha de alimentos saudáveis, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabeleceu, através da Resolução RDC nº 40/01, normas para a informação nutricional na rotulagem de alimentos e bebidas embalados. Uma das informações obrigatórias era a declaração do teor de ácidos graxos saturados³. Esta legislação esteve em vigor até dezembro de 2003, quando foi substituída pela Resolução RDC nº 360/03, a qual determina que também se declare a concentração de ácidos graxos *trans* no rótulo dos produtos alimentícios. As empresas têm o prazo até 31/07/06 para se adequarem a este novo regulamento⁴. Cabe aos laboratórios credenciados pela ANVISA, a função de verificar as informações declaradas através da análise destes alimentos.

A técnica de cromatografia em fase gasosa (CG) tem sido utilizada com eficácia na determinação da composição de ácidos graxos de óleos e gorduras comestíveis⁵. Entretanto, na análise de outros produtos alimentícios mais complexos, ainda não estão padronizados os procedimentos de extração da gordura, preparação dos ésteres metílicos e cálculo dos ácidos graxos para expressá-los em g/100g do alimento, os quais têm sido empregados nos laboratórios brasileiros para a determinação da composição de ácidos graxos por CG.

Organizações internacionais de excelência em química analítica como AOAC⁶ (Association of Official Analytical Chemistry), A.O.C.S.⁷ (American Oil Chemists' Society)⁷, I.S.O.⁸ (International Organization for Standardization) preconizam a determinação quantitativa dos ácidos graxos por CG empregando metodologia com adição de padrão interno. O padrão interno é um composto de natureza química semelhante ao composto que será determinado e é adicionado à amostra, sendo que o cálculo da composição dos analitos de interesse é feito em relação à área e massa deste componente. Na análise de ácidos graxos são utilizados padrões de ésteres metílicos de ácidos graxos com número ímpar de carbono, uma vez que muitos destes não são encontrados na gordura dos alimentos.

A A.O.A.C. recomenda um método em que a gordura e os ácidos graxos são extraídos das amostras de alimentos por hidrólise (hidrólise ácida para a maioria das amostras, hidrólise

básica para produtos lácteos e combinada para amostras de queijos). Antes da extração dos lipídios é adicionado um padrão interno de triacilglicerídeo (C_{11:0} ou C_{13:0}). A gordura é extraída com éter (petróleo e etílico), então transformada em ésteres metílicos de ácidos graxos, usando trifluoreto de boro (BF₃) em metanol. A gordura total é calculada como soma dos ácidos graxos individuais, expressos como triacilgliceróis equivalentes⁶.

Na elaboração das tabelas de composição de alimentos de vários países são empregados fatores de conversão teóricos para expressar a concentração dos ácidos graxos em gramas por cem gramas do alimento. O cálculo da concentração dos ácidos graxos saturados e insaturados é feito por normalização de área. A porcentagem em massa obtida para cada éster metílico de ácido graxo, no total dos ácidos graxos, é multiplicada pelo teor de lipídios da amostra e por fatores de conversão teóricos de gordura para ácidos graxos. Estes fatores ponderam a contribuição das diferentes frações da gordura dos alimentos (triacilgliceróis, fosfolipídios, entre outros) no fornecimento dos ácidos graxos, variando conforme o tipo de alimento^{9,10,11}. Os valores destes fatores foram determinados, com base em dados da literatura, para algumas classes de alimentos^{9,10}.

Visando trazer subsídios técnicos para o aprimoramento das análises de ácidos graxos, este trabalho apresenta resultados da comparação de metodologias que estão sendo adotadas nas determinações de ácidos graxos saturados, utilizando a cromatografia em fase gasosa^{5,12,13,14,15}. Foram comparados dois procedimentos de preparação de ésteres metílicos de ácidos graxos a partir dos lipídios extraídos (IUPAC 2301 e Hartman e Lago) e dois métodos de cálculo para expressar a concentração de ácidos graxos saturados em g/100g de amostra (cálculo com padrão interno ou com normalização de área multiplicada por fator de conversão teórico).

MATERIAL E MÉTODOS

Material

Foram analisadas seis amostras de alimentos de diferentes tipos, colhidas no comércio da cidade de São Paulo, sendo: ovo, biscoito recheado, biscoito amanteigado, extrato de soja em pó, mistura para cappuccino e café torrado e moído.

Métodos

Extração de lipídios

Com o objetivo de não alterar a composição original dos ácidos graxos foram utilizados diferentes métodos de extração de lipídios de acordo com o tipo de alimento. Para as amostras de biscoito recheado, biscoito amanteigado, extrato de soja e café, os lipídios foram obtidos pelo método de Soxhlet¹⁶ para a determinação do teor de gordura e da composição de ácidos graxos. Nas amostras de ovo foi utilizado o método de Folch¹² para a extração de lipídios e para a análise dos ácidos graxos. Para o cappuccino foi utilizada a hidrólise ácida (AOAC) para

obtenção do teor de lipídios, e extração a frio com éter etílico para análise de ácidos graxos^{6,14}.

Preparação de ésteres metílicos de ácidos graxos

Dois procedimentos de preparação de ésteres metílicos de ácidos graxos a partir dos lipídios extraídos foram comparados, sendo um de acordo com IUPAC 2301¹⁴ e outro segundo Hartman e Lago^{13,15} (Figura 1).

Análise cromatográfica

Os ésteres metílicos foram analisados em cromatógrafo a gás, marca Shimadzu, modelo GC-17A, com detector de ionização de chama. Os componentes foram separados em coluna capilar de sílica fundida DB 23 de 60 m com diâmetro interno de 0,25 mm e espessura do filme de 0,20 µm. As condições de operação foram: temperatura programada da coluna: 60 °C (2 min), taxa de aquecimento 15 °C/min até 135 °C (1 min), taxa de aquecimento 3 °C/min até 215 °C (10 min.); temperatura do injetor: 230 °C; temperatura do detector: 240 °C; gás de arraste: hidrogênio; velocidade linear do gás de arraste de 20 cm/s; razão de divisão da amostra 1:50. Foi empregado um padrão certificado de uma mistura de ésteres metílicos de ácidos graxos, variando de 4 a 24 átomos de carbono, tanto para identificação dos ácidos graxos por comparação com os tempos de retenção, quanto para a determinação dos fatores de resposta do detector de ionização de chama. Os fatores de correção de resposta do detector de ionização de chama foram calculados a partir de um cromatograma da amostra de padrões certificados nas mesmas

condições de análise da amostra e calculados com relação ao C_{13:0}. Para expressar a porcentagem de ácidos graxos saturados em g/100g de amostra foram utilizados dois métodos de cálculo. Em um dos métodos foi adicionado um padrão interno de éster metílico tridecanóico (C13:0, marca Sigma, 98% de pureza), após a extração dos lipídios^{3,14}. A quantificação foi feita com base nas relações de área de cada ácido graxo com a área do padrão interno, utilizando os fatores de correção de resposta do detector de ionização de chama (DIC) e de conversão de metil ésteres de ácidos graxos para ácidos graxos. Os valores das somas dos ácidos graxos saturados, foi multiplicado pelo teor de lipídios da amostra para expressar o resultado em gramas de ácidos graxos por cem gramas do alimento^{5,7,8,16,17}. No outro método, o cálculo da concentração dos ácidos graxos saturados foi feito por normalização de área, determinando os fatores de correção de resposta para cada ácido graxo no detector de ionização de chama. A porcentagem em massa obtida para cada éster metílico de ácido graxo foi multiplicada pelo teor de lipídios da amostra e por fatores de conversão teóricos (FCT) de gordura para ácidos graxos, variáveis conforme o tipo de alimento^{9,16}. Foram feitas cinco repetições para cada amostra a partir da etapa da extração dos lipídios.

Análise estatística

Para avaliar se havia diferença significativa entre os procedimentos foi aplicada análise de variância (ANOVA), e no caso de valores com $p < 0,05$ foi utilizado o teste de Tukey (nível de confiança de 95%)¹⁸.

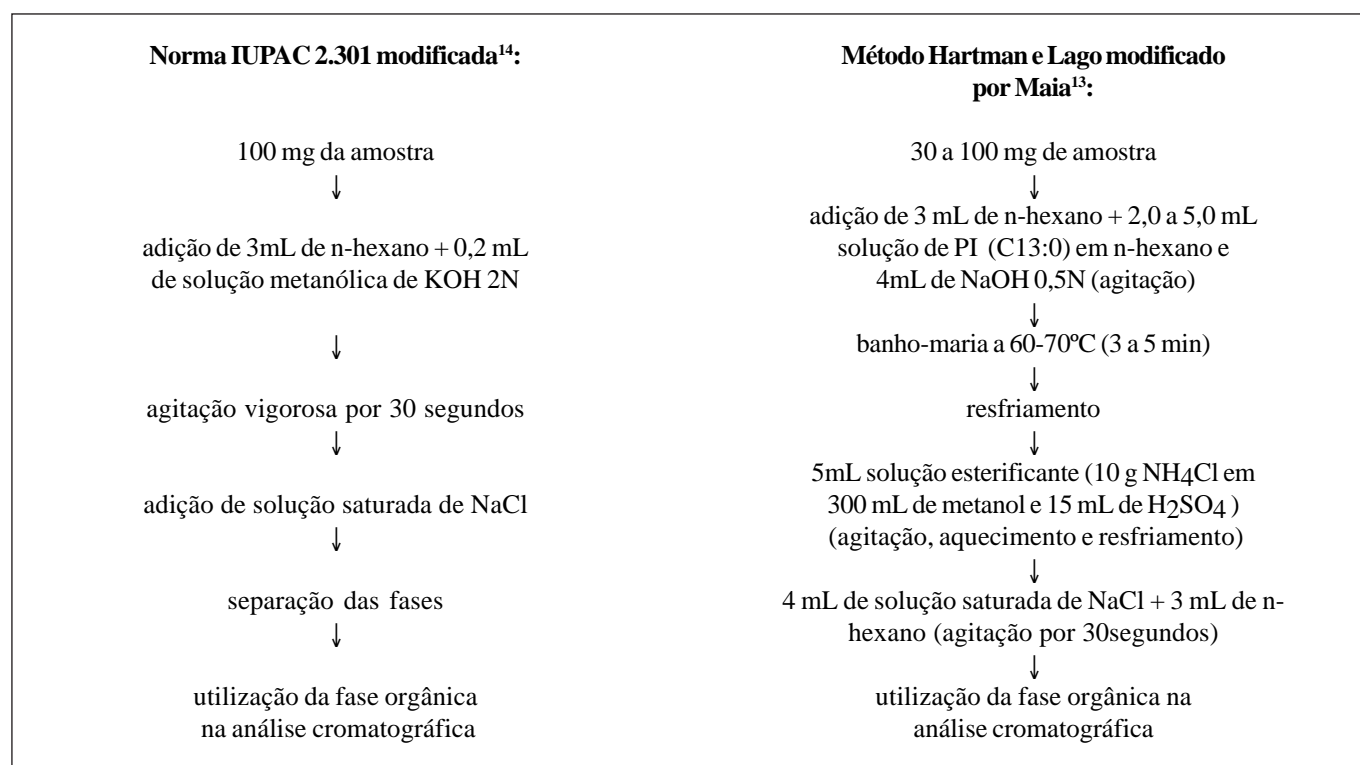


Figura 1. Fluxograma dos procedimentos de preparação de ésteres metílicos de ácidos graxos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta os dados obtidos pelos diferentes procedimentos para a composição de ácidos graxos saturados nas amostras.

Na Figura 2 estão descritos os resultados do estudo estatístico para a comparação daqueles procedimentos.

Comparando os procedimentos de preparação de ésteres metílicos, para todas as matrizes, não foi observada diferença significativa entre os métodos IUPAC 2301 e Hartman e Lago,

Tabela 1. Composição de ácidos graxos saturados em diferentes produtos alimentícios, g/100g.

| Produto | Método Hartman e Lago | | | | Método IUPAC | | | |
|--|------------------------|------|---|------|------------------------|------|---|------|
| | Padrão Interno (C13:0) | | Normalização Fator de Conversão Teórico | | Padrão Interno (C13:0) | | Normalização Fator de Conversão Teórico | |
| | média | dp | média | dp | média | dp | média | dp |
| Ovo (FCT = 0,830) | 2,95 | 0,16 | 2,94 | 0,07 | 2,84 | 0,13 | 2,86 | 0,14 |
| Biscoito recheado doce leite (FCT = 0,956) | 4,32 | 0,32 | 4,62 | 0,14 | 4,44 | 0,31 | 4,59 | 0,04 |
| Biscoito amanteigado (FCT = 0,956) | 5,27 | 0,27 | 5,10 | 0,17 | 5,24 | 0,22 | 5,03 | 0,04 |
| Cappuccino (FCT = 0,945) | 4,31 | 0,38 | 5,16 | 0,11 | 4,41 | 0,16 | 5,05 | 0,04 |
| Extrato de soja (FCT = 0,956) | 3,35 | 0,27 | 3,46 | 0,04 | 3,22 | 0,12 | 3,39 | 0,03 |
| Café (FCT = 0,956) | 3,83 | 0,18 | 4,97 | 0,04 | 3,16 | 0,26 | 4,78 | 0,02 |

FCT = Fator de Conversão Teórico⁹.

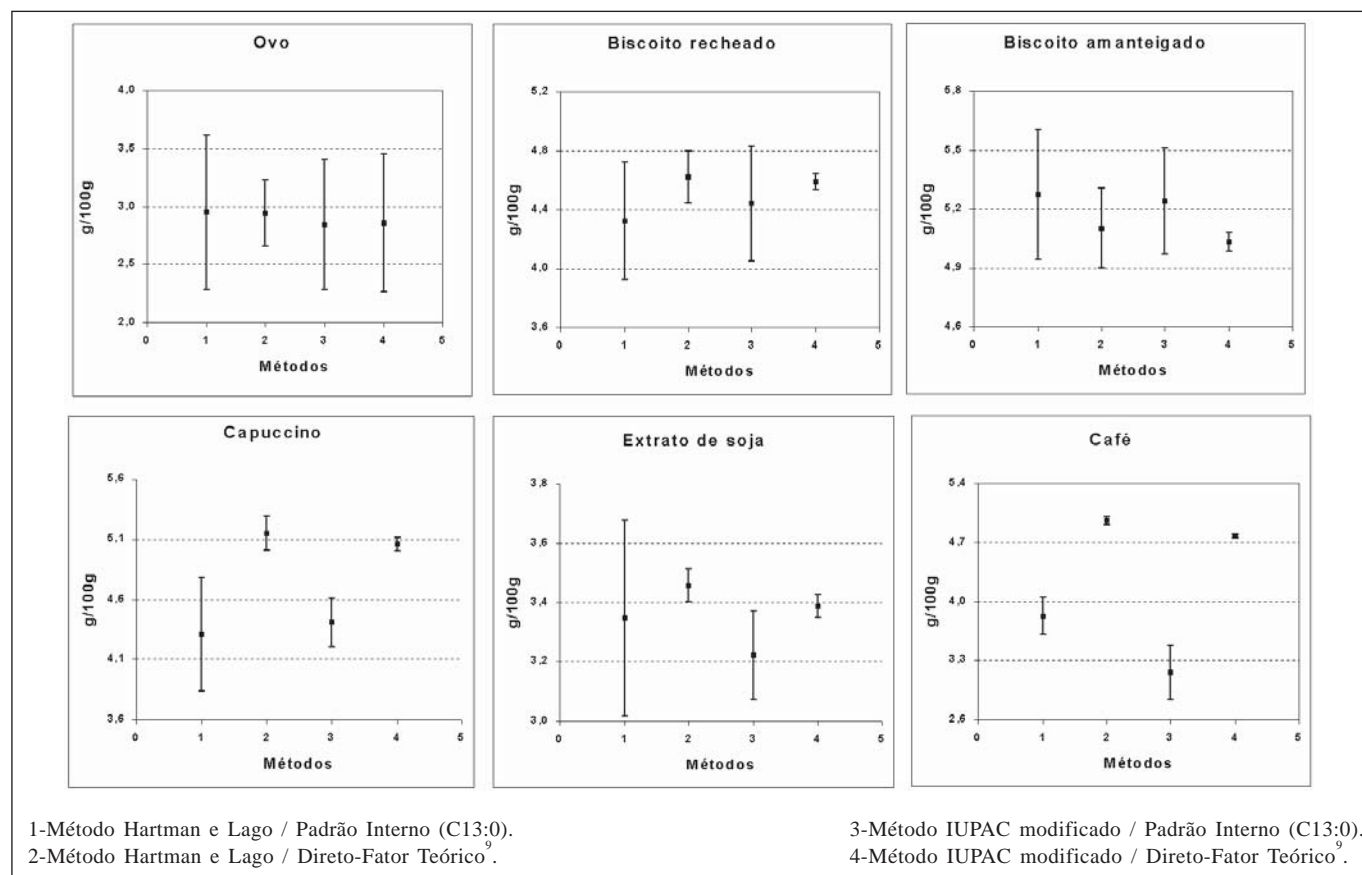


Figura 2. Intervalo de confiança de 95% para média das seguintes amostras: ovo, biscoito recheado, biscoito amanteigado, extrato de soja, mistura para o preparo de capuccino e café.

onde foi considerado o mesmo método de cálculo. Com relação a este foram observadas diferenças estatisticamente significativas para as amostras de café e cappuccino. No método de cálculo que emprega os fatores de conversão teóricos, utilizou-se para as amostras de café o fator 0,956, cujo valor é aplicado a alimentos que contêm principalmente gordura de origem vegetal, uma vez que não está estabelecido um fator de conversão para este produto (Tabela 1). Na primeira versão da Tabela Brasileira de Composição de Alimentos, um procedimento similar ao descrito acima, foi utilizado para o cálculo da composição de ácidos graxos em amostra de café¹¹. O café é um dos produtos que possui em sua rotulagem a declaração de gordura saturada igual a zero, pois os teores de gordura saturada na porção final a ser consumida são insignificantes. Entretanto, o teor de lipídios (extrato etéreo) das amostras de pó de café é considerável e diversos produtos podem ter o café como ingrediente, como é o caso do cappuccino. Para as amostras de cappuccino, no cálculo dos ácidos graxos saturados foi empregado o fator calculado para leite (0,945), já que este ingrediente é o que contribuiu com a maior quantidade de gordura na amostra. A amostra de cappuccino analisada continha como ingredientes majoritários: açúcar (cerca de 50%), leite em pó integral (30%), leite em pó desnatado (10%), café solúvel (8%), cacau (1,5%) e outros diversos componentes minoritários. O procedimento que utiliza fatores teóricos, para o cálculo quantitativo de ácidos graxos em alimentos como capuccino ou café pode induzir a erro. Entretanto, neste trabalho utilizamos tais fatores, para estes produtos como um alerta, uma vez que este tem sido o procedimento adotado em diferentes laboratórios brasileiros que realizam a determinação da composição de ácidos graxos em alimentos. O resultado obtido por aquele método,

apesar de simples, não é aplicável a qualquer tipo de alimento, especialmente em alimentos de composição complexa, ou seja, com diversos ingredientes. Nos alimentos para os quais os fatores de conversão não estão estabelecidos é necessária a utilização do cálculo com padrão interno.

Apesar de existirem diferenças estatisticamente significativas para as amostras de cappuccino, isto é, os métodos não são equivalentes do ponto de vista analítico, os resultados obtidos pelos dois métodos estariam dentro da faixa de tolerância de $\pm 20\%$, aceita pela Resolução RDC 360/03, se considerarmos o método 2 como referência. A Figura 3 apresenta os resultados obtidos pelos diferentes procedimentos em comparação ao método 2, referente à metilação por Hartman e Lago com cálculo utilizando fatores teóricos, considerando a tolerância da legislação em vigor. Este procedimento foi o empregado na primeira versão da Tabela Brasileira de Composição de Alimentos¹¹ e, portanto, foi considerado como referência.

CONCLUSÃO

O método da IUPAC para a preparação dos ésteres metílicos de ácidos graxos é mais rápido, barato e emprega menor volume de solvente, sendo, portanto, uma boa alternativa para os laboratórios que realizam análises de ácidos graxos em sua rotina.

O procedimento que emprega os fatores de conversão teóricos no cálculo dos ácidos graxos é o mais simples, entretanto sua aplicação para determinar os ácidos graxos se restringe aos alimentos que possuem fatores de conversão teóricos já definidos.

O método que utiliza padrões internos para a determinação de ácidos graxos em alimentos é o preconizado pelas organizações internacionais de excelência em química analítica e, portanto, é o que deve ser adotado nos laboratórios.

Há a necessidade de um estudo mais abrangente, com amostras de referência ou certificada, para avaliar os procedimentos de extração de lipídios, preparação de ésteres metílicos de ácidos graxos e métodos de cálculo, visando a determinação de ácidos graxos nos alimentos.

REFERÊNCIAS

1. Organización Mundial de la Salud. Estrategia Mundial sobre régimen alimentario, actividad física e salud (57° Asamblea Mundial de la Salud - 22 de mayo de 2004). Ginebra, Organización Mundial de la Salud 2004 (WHA 57.17).
2. Curi R, Pompéia C, Miyasaka CK, Procópio J. Entendendo as gorduras - os ácidos graxos. 1ª ed., São Paulo: Ed. Manole; 2002.
3. Brasil. Resolução-RDC nº 40, de 21 mar. 2001 da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Dispõe sobre Regulamento Técnico Obrigatório sobre rotulagem nutricional de alimentos e bebidas embalados. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 22 mar. 2001, Seção I, nº 57-E, p. 22-5.

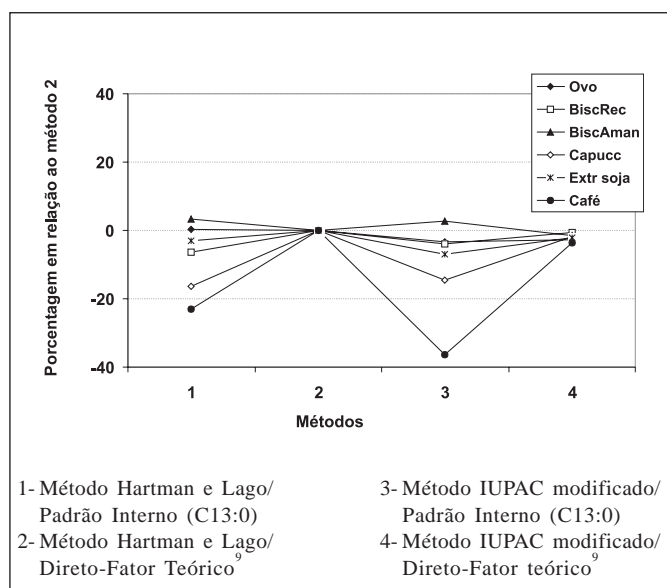


Figura 3. Resultados obtidos pelos diferentes procedimentos em relação ao método 2 de acordo com a variação de $\pm 20\%$, tolerada pela RDC 360/03 (ANVISA/MS).

4. Brasil. Resolução-RDC nº 360, de 23 dez. 2003 da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Dispõe sobre o Regulamento Técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 26 dez. 2003. Seção I, nº 251, p 33-4.
5. American Oil Chemists' Society. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society. 4th ed. (A.O.C.S. Official, Method Ce 1f-96: Determination of *cis*-and *trans*-fatty acids in hydrogenated and refined oils and fats by capillary GLC); Champaign, USA; 1997
6. Official Methods of Analysis of AOAC International. 17 ed., Githersburg, Maryland, 2000.
7. American Oil Chemists' Society. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society. 4th ed. (A.O.C.S. Official Method Ce 1-62: Fatty acid composition by gas chromatography); Champaign, USA; 1995
8. International Organization for Standardization (ISO). Animal and vegetable fats and oils – Analysis by gas chromatography of methyl esters of fatty acids. ISO 5508-1990.
9. Mc Cance and Widdowson's, editors. The composition of food. 6th ed., Royal Society of Chemistry; 2002.
10. Weihrauch JL, Posati LP, Anderson BA, Exler, J. Lipid conversion factors for calculating fatty acids contents of foods. *J Am Oil Chem Soc* 1977; 54: 36-40.
11. Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação (NEPA), UNICAMP (BR). Tabela Brasileira de Composição de Alimentos. Campinas; 2004.
12. Folch J, Lees M, Stanley GHS. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 1957; 226: 497-509.
13. Hartman L, Lago RCA. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Lab Prac* 1973; 22: 475-6.
14. International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC). Standard Methods for Analysis of Oils, Fats and Derivatives. Blackwell Scientific Publications, 7th Edition; Method 2.301; Report of IUPAC Working Group WG 2/87; 1987.
15. Maia EL, Rodrigues-Amaya DBR. Avaliação de um método simples e econômico para metilação de ácidos graxos com lipídios de diversas espécies de peixes. *Rev Inst Adolfo Lutz* 1993; 53(1/2): 27-35.
16. Instituto Adolfo Lutz. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz, Métodos físico-químicos para análise de alimentos, 4^a ed., Brasília, ANVISA, 2005.
17. American Oil Chemists' Society. Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society. 4th ed. (A.O.C.S. Official Method Ce 2-66, Preparation of methyl esters of long-chain fatty acids); Champaign, USA; 1995
18. Ayres M, Ayres MJr, Ayres DL, Santos AS. BioEstat. 3.0. Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Belém, Sociedade Civil Mamirauá, Brasília, CNPq, 2003.

Água de diálise: parâmetros físico-químicos na avaliação do desempenho das membranas de osmose reversa.

Dialysis water: use of physical - chemicals parameters for evaluating the reverse osmosis membranes efficacy

RIALA6/1036

*Marise SIMÕES¹, Berenice M. BRÍGIDO¹, Elaine M.A. MAZON¹, Maria de Fátima C. PIRES²

* Endereço para correspondência: ¹Instituto Adolfo Lutz, Laboratório I de Campinas, R. São Carlos, 720, Campinas CEP 13035-420, Campinas/SP, email: msimoes@ial.sp.gov.br

² Instituto Adolfo Lutz, Laboratório Central de São Paulo

Recebido: 02/05/2005 – Aceito para publicação: 25/08/2005

RESUMO

As análises físico-químicas são instrumentos importantes para o monitoramento da qualidade da água utilizada para diálise e essas devem ser realizadas periodicamente. Com o objetivo de avaliar o desempenho das membranas de osmose reversa responsáveis pelo tratamento da água de diálise foram realizadas análises de alguns parâmetros físico-químicos. Durante o verão e inverno de 2003, foram analisadas 36 amostras de água, 18 coletadas no cavalete de entrada (P1) e 18 após osmose reversa (P2), provenientes de duas unidades hospitalares denominadas A e B. As determinações realizadas foram nitrato, sulfato, fluoreto e condutividade segundo a metodologia recomendada pelo Standard Methods for Examination of Water and Wastewater, 1995 e Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz, 1985. A pesquisa de endotoxinas bacterianas foi realizada nas 18 amostras de P2, seguindo a metodologia recomendada pela “United States Pharmacopeia” (método de formação de gel). Os resultados revelaram que a concentração dos íons fluoreto, nitrato, sulfato e condutividade nas duas unidades, após a osmose reversa foi reduzida significativamente ($p < 0,001$), de acordo com a RDC N^o154/2004. No inverno a condutividade apresentou um aumento nos dois pontos analisados de 2,85% e 24,23%, em A e B, respectivamente. As endotoxinas bacterianas foram detectadas em duas amostras na unidade A no verão. Pelos resultados obtidos, as membranas de osmose reversa foram eficientes na remoção dos íons analisados. Manter a qualidade da água utilizada no serviço de hemodiálise é uma maneira de prevenir riscos aos pacientes.

Palavras-Chave. água, hemodiálise, endotoxina, condutividade, nitrato, flúor, sulfato.

ABSTRACT

Physical-chemical analyses of water used in hemodialysis systems are very relevant tools for evaluating such systems. These analyses must be periodically done. For this study 36 water samples collected from hospitals A and B during the summer and winter of 2003 were analyzed. The samples were collected from P1 incoming public treated water from city water mains (18 samples), and from P2 after reverse osmosis treatment (18 samples). Fluoride, sulfate, nitrate and conductivity analyses were performed according to the methodology recommended by Standard Methods for the Examination Of Water And Wastewater, 1995, and by the local standards “Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz”, 1985. Bacteria endotoxins were determined in 18 samples from P2 according to the “United States Pharmacopeia”. In both services, after reverse membrane osmosis processing during winter and summer significantly decreased the amount of ions fluoride, sulfate, nitrate, and conductivity in the water sample from P3 ($p < 0,001$), according to RDC N^o154/2004. During the winter the water conductivity increased in both services, 2.85% in A and 24.23% in B. Bacteria endotoxins were only detected in A service during summer in two samples. These results showed that physical-chemicals parameters were important to evaluate the efficacy of reverse membranes osmosis in both services, as it significantly reduced the studied ions concentration. Providing high quality water to hemodialysis system is an accurate procedure for preventing risks to the patients.

Key Words. water, hemodialysis, endotoxins, conductivity, nitrite, fluoride, sulfate.

INTRODUÇÃO

Pacientes submetidos ao tratamento regular de hemodiálise, estão expostos semanalmente a uma grande quantidade de água de diálise por meio da circulação extracorpórea, de aproximadamente 150 litros/turno^{1,2,3}. O tratamento dialítico, que modificou o prognóstico dos pacientes com insuficiência renal crônica é também responsável por complicações cuja frequência e importância são cada vez mais descritas. Até a década de 70, acreditava-se que a água potável servisse para a hemodiálise⁴. Com o aumento do número de pacientes em tratamento dialítico e de sua sobrevivência, acumularam-se evidências que permitiram correlacionar os contaminantes da água com os efeitos adversos do procedimento. Entre eles podemos citar muitos relatos de morte e prejuízos à saúde de pacientes associados ao tratamento inadequado da água para diálise com a presença de substâncias químicas tóxicas^{2,4,5,6}.

Em 1980, na cidade de Maryland, ocorreu um acidente por excesso de flúor na água, que provocou complicações graves em oito pacientes, e óbito em um deles. Oito anos depois, na Filadélfia foram descritos 44 casos de hemólise devido a remoção inadequada de cloro da água destinada à diálise⁴.

O "Food Drug Administration (FDA)" em 1989, revisou e publicou um manual de tratamento em água e neste relacionou os sintomas com as possíveis causas de contaminação da água (Tabela 1)⁵.

Nos EUA em 1995, o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), investigando surtos ocorridos no período de 1982 a 1995 em centros de diálise destacou 36 casos, sendo oito por complicações químicas tóxicas⁷.

No Brasil em 1996, na cidade de Caruaru em Recife, ocorreu um surto numa clínica que atendia 131 pacientes. Cem desses pacientes desenvolveram falência aguda do fígado, sendo que 52 foram a óbito em consequência da contaminação da água de hemodiálise por toxinas de cianobactérias⁶.

O reconhecimento do risco potencial que representava a ausência de um tratamento específico para a água utilizada em

diálise levou à criação, em todo mundo, de vários órgãos e comissões, que estabeleceram normas para a composição adequada, como as seguidas pela comunidade Européia e as sugeridas pela "Association for the Advancement of Medical Instrumentation (AAMI)" nos Estados Unidos da América⁴, ambas em 1982.

No Brasil, somente em outubro de 1996 entrou em vigor a Portaria 2042 do Ministério da Saúde, para tratar, especificamente, da qualidade da água para hemodiálise, substituída pela Portaria nº 82 de janeiro de 2000 e atualmente pela Resolução⁸ – RDC nº 154 de 15 de junho de 2004, que estabelece o regulamento técnico para o funcionamento dos serviços e as normas para cadastramento destes serviços pelo SUS.

Atualmente o tratamento mais efetivo para a água de diálise é o sistema da osmose reversa, que remove endotoxinas, bactérias e íons de até 0,0001 micron. Existem hoje no Brasil 577 centros de hemodiálise cadastrados, sendo que 522 (90,50%) utilizam este tratamento⁹.

Ressaltando que a água para a diálise, quando não adequadamente tratada coloca em risco a vida e a segurança dos pacientes com insuficiência renal e sob hemodiálise, bem como atualmente observa-se que o sistema de osmose reversa tem se mostrado mais efetivo. Este trabalho teve como objetivo analisar os parâmetros físico-químicos, da água, como subsídio importante de avaliação do desempenho das membranas de osmose reversa responsáveis pelo tratamento da água de diálise, em duas unidades hospitalares, durante o verão e o inverno de 2003, pela quantificação e comparação da condutividade, íons sulfato, nitrato e fluoreto nas amostras de água que chegam às unidades pelo sistema de abastecimento público com a água tratada por osmose reversa e pela determinação de endotoxinas bacterianas após osmose reversa.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas 36 amostras de água, 18 provenientes do cavalete de entrada (P1), e 18 após o tratamento por osmose reversa (P2), em duas unidades de hemodiálise, denominadas A e B, durante quatro semanas consecutivas do verão e quatro semanas consecutivas do inverno no ano de 2003. As duas unidades realizavam um pré-tratamento, composto das seguintes etapas: filtro de areia, abrandador e filtro de carvão. Para uma melhor conservação e durabilidade das membranas da osmose reversa, as duas unidades realizavam um pré-tratamento.

O pré-tratamento e o tratamento por osmose reversa em ambas as unidades estavam localizados em áreas exclusivas, fechadas, fora da área de atendimento aos pacientes com acesso adequado para: limpeza, manutenção, coletas de amostras e supervisão da vigilância sanitária. Mantinham no local relatório de todas as aferições realizadas.

A coleta foi realizada segundo a metodologia recomendada pelo "Standard Methods for The Examination of

Tabela 1. Sinais e sintomas relacionados com os possíveis contaminantes da água de diálise.

| Sintomas | Possíveis contaminantes da água |
|-------------------------|--|
| Anemia | Al, cloramina, Cu, Zn |
| Doença óssea | Al, F |
| Hemólise | Cu, nitrato, cloramina |
| Hipertensão | Ca, Na |
| Hipotensão | Bactéria, endotoxina, nitrato |
| Acidose metabólica | pH baixo, sulfato |
| Degeneração neurológica | Al |
| Náusea e vômito | Bactéria, Ca, Cu, endotoxina, pH baixo, Mg, nitrato, sulfato, Zn |
| Morte | Al, F, endotoxina, bactéria, cloramina |

Water and Wastewater and American Public Health Association (APHA)¹⁰.

Foram realizadas análises de fluoreto, nitrato, sulfato e condutividade segundo a metodologia recomendada pela American Public Health Association (APHA) e Standard Methods for Examination of Water and Wastewater¹⁰. A análise de sulfato e nitrato foi realizada segundo a metodologia recomendada pelas Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz e American Public Health Association (APHA) e Standard Methods for Examination of Water and Wastewater^{10,11}.

A pesquisa de endotoxinas bacterianas foi realizada em 18 amostras após a osmose reversa, seguindo a metodologia recomendada pela "United States Pharmacopeia", pelo método de formação de gel para água utilizada para hemodiálise¹². As legislações utilizadas foram: a Portaria n° 518 de 25/03/2004 que estabelece os parâmetros da água tratada da rede pública¹³ e a Resolução RDC n° 154/2004 que estabelece os parâmetros da água utilizada para diálise⁸.

Os dados foram analisados estatisticamente com critério de probabilidade significativa de $p < 0,05$, utilizando-se do programa Epi Info 6, do Center for Disease Control & Prevention and World Health Organization¹⁴.

RESULTADOS

Das 36 amostras de água para análise dos parâmetros físico-químicos: fluoreto, nitrato, sulfato e condutividade, 18 amostras foram da unidade A, sendo nove do cavalete de entrada

(P1) e nove após a osmose reversa (P2) e 18 amostras da unidade B, sendo nove do cavalete de entrada (P1) e nove após a osmose reversa (P2).

A Portaria n° 518 de 23/03/2004 trata dos parâmetros físico-químicos para fluoretos, nitrato, sulfato em água tratada destinada ao consumo humano¹³. E a Resolução RDC n° 154/2004 trata destes parâmetros para a água utilizada em diálise⁸. A Tabela 2 mostra os níveis máximos permitidos de contaminantes na água pela Agência de Proteção Ambiental (APA)⁵ dos EUA e Portaria n° 518/2004 para água destinada ao consumo humano¹³. Mostra também os níveis máximos permitidos^{15,8} para água de diálise pela AAMI e RDC n° 154/2004, assim como a menor concentração capaz de causar reação tóxica no tratamento dialítico.

Teores de Fluoreto

Todas as 18 amostras do cavalete de entrada (P1), coletadas nas unidades A e B apresentaram teores de fluoreto dentro dos limites da Portaria n° 518/2004 (abaixo de 1,5 mg/L). Assim como as 18 amostras após a osmose reversa (P2), coletadas em A e B, apresentaram teores de fluoreto dentro da RDC n° 154/2004 (abaixo de 0,2 mg/L) (Tabela 3).

Teores de Nitrato

Todas as 18 amostras do cavalete de entrada (P1), coletadas em A e B, apresentaram teores de nitrato dentro dos limites da Portaria n° 518/2004 (abaixo de 10 mg/L em N). Assim como as 18 amostras após a osmose reversa (P2), coletadas em A e B, apresentaram teores de nitrato dentro da RDC 154/2004 (abaixo de 2 mg/L em NO₃) (Tabela 4).

Tabela 2. Níveis de contaminantes permitidos na água segundo a APA, Portaria n° 518/2004, AAMI e RDC N° 154/2004.

| Contaminantes | Máximo permitido pela APA e Portaria n° 518 para água potável (mg/L) | | Máximo permitido pela AAMI e RDC N° 154 para água de diálise (mg/L) | Menor concentração associada com toxicidade em diálise (mg/L) |
|---------------|--|-------|---|---|
| | 4* | 1,5** | | |
| Fluoreto | 4* | 1,5** | 0,2 | 1 |
| Nitrato | 10 | | 2 | 21 |
| Sulfato | 250 | | 100 | 200 |
| Endotoxina | não regulamentado | | 2 EU/mL (Nível de ação 1 EU/mL) | 5 EU/kg/peso do indivíduo |

* APA

**Portaria N° 518 de 25/03/2004

Tabela 3. Média dos teores de fluoreto obtidos no cavalete de entrada (P1) e após a osmose reversa (P2) nas unidades A e B.

| N° de Amostras | Pontos | Teores (mg/L) |
|----------------|--------|---------------|
| 18 | P1 | 0,66 |
| 18 | P2 | 0,04 |
| $p < 0,001$ | | |

Tabela 4. Média dos teores de nitrato obtidos no cavalete de entrada (P1) e após a osmose reversa (P2) nas unidades A e B.

| N° de Amostras | Pontos | Teores |
|----------------|--------|------------------------------|
| 18 | P1 | 2,2 mg/L em N |
| 18 | P2 | 0,33 mg/L em NO ₃ |
| $p < 0,001$ | | |

Tabela 5. Média dos valores de condutividade elétrica a 25°C no cavalete de entrada (P1) e após a osmose reversa (P2) nas unidades A e B.

| Nº de Amostras | Pontos | Medidas |
|----------------|--------|---------------|
| 18 | P1 | 162,538 µS/cm |
| 18 | P2 | 8,68 µS/cm |
| p < 0,005 | | |

Tabela 6. Valores de condutividade elétrica a 25°C obtidos acima dos limites estabelecidos, em seis amostras coletadas após a osmose reversa (P2) nas unidades A e B durante o verão e inverno.

| Condutividade acima de 10 µS/cm | | |
|---------------------------------|----------------|-------------|
| Unidades | Estação do ano | Medidas |
| A | Verão | 11,5 µS/cm |
| A | Verão | 10,4 µS/cm |
| A | Verão | 13,4 µS/cm |
| A | Inverno | 10,7 µS/cm |
| A | Inverno | 11,97 µS/cm |
| B | Inverno | 10,6 µS/cm |

Tabela 7. Média dos valores de condutividade elétrica a 25°C em amostras de água coletadas durante o verão e inverno/2003 nas unidades A e B.

| Unidades | Pontos analisados | | | |
|----------|---------------------|--------------|----------------|-------------|
| | Cavalete de entrada | | Osmose reversa | |
| | Verão | Inverno | Verão | Inverno |
| A | 195,4 µS/cm | 239,35 µS/cm | 10,2 µS/cm | 10,5 µS/cm |
| B | 99,94 µS/cm | 122,8 µS/cm | 6,15 µS/cm | 8,125 µS/cm |

Condutividade elétrica a 25 °C

A Portaria n° 518/2004 não estabelece limite máximo para condutividade em amostras coletadas no cavalete de entrada (P1). As 18 amostras coletadas neste ponto, em A e B, apresentaram teores de condutividade que variaram de 76,5 µS/cm até 230,6 µS/cm. Apesar da diferença estatística significativa (p < 0,005) para P1 em relação a P2 (Tabela 5), a condutividade em 6 das 18 amostras coletadas após a osmose reversa (P2), estavam fora do limite estabelecido pela RDC n°.154/2004, sendo 5 amostras da unidade A, e 1 amostra da unidade B. As 12 amostras (P2) restantes estavam de acordo com a RDC n°.154/2004 (abaixo de 10 µS/cm) (Tabela 6).

Das 36 amostras coletadas para análise de condutividade, 18 do cavalete de entrada (P1) e 18 após a osmose reversa (P2) os resultados revelaram um aumento de condutividade nos dois pontos no inverno. Em P1 este aumento médio foi de 18,4% na unidade A e 18,6 % na unidade B; e em P2 de 2,85 % na unidade A e 24,3 % na unidade B. (Tabela 7).

Tabela 8. Análise dos teores de sulfatos obtidos no cavalete de entrada (P1) e após a osmose reversa (P2) nas unidades A e B.

| Teores de Sulfato | Pontos analisados | | Total geral |
|-------------------|-------------------|----|-------------|
| | P1 | P2 | |
| <10 mg/L | - | 18 | 18 |
| <25 mg/L | 14 | 0 | 14 |
| <50 mg/L | 4 | 0 | 4 |
| Total geral | 18 | 18 | 36 |

Tabela 9. Endotoxinas bacterianas presentes após a osmose reversa (P2).

| Endotoxina | Ponto |
|------------|-------|
| | P2 |
| >2EU/ml | 2 |
| <2EU/mL | 16 |
| Total | 18 |

EU = unidade de endotoxina; 2 EU = 0,4ng/ml

Teores de Sulfato

Todas as 18 amostras do cavalete de entrada (P1), coletadas em A e B, apresentaram teores de sulfato dentro dos limites da Portaria n° 518/2004 (abaixo de 250 mg/L). Assim como as 18 amostras da osmose reversa (P2), coletadas em A e B, apresentaram teores de sulfato dentro da Portaria RDC n°154/2004 (abaixo de 100 mg/L) (Tabela 8).

A diferença entre as amostras do cavalete de entrada (P1) e após a osmose reversa (P2) foi significativa para as duas unidades, nas estações verão e inverno, para fluoreto, nitrato e condutividade.

Endotoxinas bacterianas

A pesquisa de endotoxinas bacterianas foi realizada durante o verão e inverno nas duas unidades, sendo detectada em duas amostras da unidade A durante o verão (Tabela 9).

DISCUSSÃO

É missão dos órgãos de Saúde Pública informar, divulgar e promover conhecimentos para rediscutir, a adoção de medidas de controle dos serviços, com o objetivo de proteger os pacientes portadores de patologias imunossupressoras, e dessa forma melhorar a qualidade de vida desses pacientes.

Várias reações podem ser observadas quando se analisam os riscos por resíduos químicos a que estão expostos os pacientes numa seção de hemodiálise^{1, 2, 5}.

Se o tratamento da água tratada da rede pública que abastece o serviço de hemodiálise estiver em desacordo com a Portaria n° 518/2004 com relação aos parâmetros físico-

químicos¹³ este poderá sobrecarregar o pré-tratamento e conseqüentemente as membranas de osmose reversa. Se estes tratamentos falharem, os pacientes poderão apresentar reações características de contaminação química tóxica.

O tratamento da água de diálise não é de responsabilidade dos profissionais de enfermagem, porém, eles têm a responsabilidade de entender como este tratamento pode interferir clinicamente nos pacientes⁵. As duas unidades estudadas possuíam técnicos especializados para cuidar do tratamento de osmose reversa. Sendo que na unidade A o técnico permanecia na unidade em período integral, enquanto na unidade B o técnico estava presente conforme a programação pré-estabelecida e em eventuais problemas.

Neste trabalho, observou-se que a realização das coletas semanais melhorou a atenção dos profissionais para os cuidados de higiene local e com a qualidade da água de diálise e com isso estabeleceu-se uma dinâmica entre o trabalho do laboratório e o das unidades. Assim que os resultados das análises eram divulgados, ações corretivas eram realizadas. Isto reforça a importância da supervisão do serviço de vigilância, na elaboração de programas que periodicamente avaliem a qualidade da água destes serviços.

As 18 amostras do cavalete de entrada, coletadas nas unidades A e B apresentaram teores de fluoreto (abaixo de 1,5 mg/L) e nitrato (abaixo de 10mg/L em N) dentro dos limites estabelecidos¹³ pela Portaria nº 518/2004. Assim como as 18 amostras após osmose reversa, coletadas em A e B, apresentaram teores de fluoreto (abaixo de 0,2 mg/L), nitrato (abaixo de 2 mg/L em NO₃) dentro dos limites estabelecidos⁸ pela RDC nº154/2004.

Águas de poços de origem profunda apresentam menor contaminação de matéria orgânica, mas maior de íons inorgânicos como sulfato em relação às águas superficiais⁵. Existem vários relatos sobre níveis de sulfato acima de 200mg/L como indutores de vômito e acidose metabólica. Esses sintomas desaparecem quando estes níveis ficam abaixo de 100mg/L¹⁵. A RDC nº 154/2004 estabelece o limite⁸ de até 100mg/L para íons sulfato na água de diálise. As 18 amostras do cavalete de entrada, coletadas nas unidades A e B apresentaram teores de sulfato (abaixo de 250 mg/L) dentro dos limites estabelecidos¹³ pela Portaria Nº 518/2004. Assim como as 18 amostras após osmose reversa, coletadas em A e B, apresentaram teores de sulfato (abaixo de 100mg/L) dentro dos limites estabelecidos⁸ pela RDC Nº154/2004.

Os parâmetros químicos forneceram subsídios importantes para a avaliação do trabalho das membranas da osmose reversa. Foram 36 amostras analisadas e quando comparados os resultados do cavalete de entrada (P1) e após a osmose reversa (P2), verificou-se a diferença significativa para os íons nitrato e fluoreto ($p < 0,001$) e sulfato < 10 mg/L.

A unidade A utilizou no inverno uma mistura de água de poço (>70%) com água tratada da rede pública. Esta água de poço era comprada e chegava até a unidade para abastecer o reservatório em caminhões pipa. Apesar da unidade A utilizar

essa mistura, não se encontrou amostra em desacordo para sulfato, fluoreto e nitrato, porém seis amostras apresentaram uma pequena variação na condutividade (Tabela 6).

A qualidade da água sofre modificações de acordo com as estações do ano, portanto as variações sazonais representam um dos fatores que influenciam no tratamento da água^{4,16}. Em muitos casos para a manutenção da qualidade da água, é necessária uma quantidade maior de produtos químicos, que podem alterar, aumentando a medida da condutividade.

Apesar da Portaria nº 518/2004 não estabelecer limites de condutividade¹³ para a água tratada da rede pública de abastecimento, verificou-se que quando comparada a média de condutividade dos 18 pontos coletados do cavalete de entrada das duas unidades, houve um aumento deste parâmetro no inverno em relação ao verão, de 18,4% na unidade A e de 18,6% na unidade B.

A resolução⁸ RDC nº 154/2004 estabelece um limite de 10 μ S/cm para água de diálise após a osmose reversa. Quando comparada à média da condutividade entre as duas estações estudadas, nas duas unidades, verificou-se que no inverno ocorreu aumento desse parâmetro de 2,85% na unidade A e 24,30% na unidade B. Estes aumentos de condutividade tanto em P1 quanto em P3 sugerem que o inverno, pode ter influenciado na qualidade da água que chega aos serviços de hemodiálise devido à falta de chuvas que trazem para o tratamento uma água com mais íons, que pode ser verificado com o aumento da condutividade (Tabela 7).

Em 6 amostras após a osmose reversa (P2), a condutividade apresentou pequenas variações acima dos limites permitidos (Tabela 6). Pequenas variações na condutividade da água tratada podem indicar variações na qualidade da água que abastece o sistema de tratamento. Já grandes variações na condutividade podem indicar um problema na membrana da osmose reversa como o seu rompimento¹⁷. Portanto, quanto mais pura uma água do ponto de vista físico-químico, menor será sua condutividade. A água pura tem condutividade de 0,056 μ S/cm¹⁸.

A análise da condutividade foi importante também para a avaliação da sazonalidade, revelando que o inverno influenciou a qualidade da água, apresentando um aumento de íons nas duas unidades tanto na água que chegava pelo cavalete de entrada como a que foi tratada pela osmose reversa (Tabela 7). As amostras coletadas no cavalete de entrada, em A e B, apresentaram condutividade elétrica a 25°C que variaram de 76,5 μ S/cm até 230,6 μ S/cm. Uma das finalidades da medida de condutividade laboratorial é a avaliação das variações sazonais pela concentração mineral dissolvida em águas brutas ou residuais¹⁰.

Apesar da Portaria nº 518/2004 não estabelecer limites⁸ de condutividade para a água da rede pública de abastecimento, verificou-se que quando comparada à média dos valores de condutividade dos 36 pontos coletados do cavalete de entrada e após a osmose reversa, nas duas unidades, houve um aumento deste parâmetro no inverno em

relação ao verão. (Tabela 7). No cavalete de entrada este aumento foi de 18,5% nas duas unidades e após a osmose reversa a unidade B apresentou um aumento de 24,23% enquanto a unidade A de 2,85% no inverno.

A exposição dos pacientes em hemodiálise a endotoxinas, por um longo período de tempo, pode acarretar respostas inflamatórias crônicas⁵. A incidência de reações pirogênicas pode ocorrer quanto maior for a contagem de colônias de bactérias heterotróficas na solução de diálise³.

A pesquisa de endotoxinas bacterianas foi realizada durante o verão e inverno nas duas unidades, somente após a osmose reversa. Em duas amostras na unidade A durante o verão foram detectados valores acima do limite estabelecido, 2 EU/mL conforme a Resolução⁸ a RDC nº.154/2004. Observou-se que a condutividade dessas duas amostras também estava acima dos limites (11,5 µS/cm e 10,7 µS/cm) o que sugere uma variação na qualidade de água que abastecia a unidade naquele momento. A contagem de bactérias heterotróficas destas duas amostras estava acima de 50 UFC/mL¹⁷, indicando um nível de ação, ou seja, a necessidade da adoção de providências para identificação do foco de contaminação, segundo a Resolução⁸ RDC nº. 154/2004. Após a divulgação destes resultados a unidade realizou uma desinfecção das membranas de osmose reversa eliminando o problema.

A atual Resolução⁸ RDC nº154 de 15/06/2004 no seu artigo 5º, determina que 100% dos serviços de diálise devem ser inspecionados e avaliados no mínimo duas vezes por ano⁸. Neste caso programas de monitoramento da qualidade da água de hemodiálise devem ocorrer com continuidade para assegurar o tratamento oferecido aos pacientes com insuficiência renal^{2,3}.

CONCLUSÃO

Neste estudo as membranas da osmose reversa foram 100% eficazes na redução dos íons sulfato, nitrato e fluoreto e 66,7% com relação à condutividade.

REFERÊNCIAS

1. Oie, S. et al. Microbial contamination of dialysate and its prevention in haemodialysis units. *J. Hospital Infection* 2003, 54:115-9.
2. Pisani, B. et al. Surto de bacteriemia por *Pseudomonas aeruginosa* na Unidade de Hemodiálise de um hospital de Campinas, São Paulo, Brasil. *Rev Inst Adolfo Lutz* 2000; 59(1/2): 51-6.
3. São Paulo, Secretaria de Estado da Saúde, Centro de Vigilância. Roteiro de Inspeção da Vigilância Sanitária de Serviços de Terapia renal Substitutiva, 1997.
4. Silva, A.M.M. et al. Revisão/Atualização em Diálise: Água para hemodiálise. *J Bras Nefrol* 1996; 18 (2):180-8.
5. Amato R.L. Water Treatment for Hemodialysis, Including the Latest AMMI Standards. *J Nephrol Nurs* 2001; 28:612-9.
6. Azevedo S.M. et al. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru-Brazil. *Toxicology* 2002; 182:441-6.
7. Favero, M.S. et al. Dialysis-associated infections and their control. *J Hospital Infection* 1998; 24:357-78.
8. Brasil, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução Diretoria Colegiada Nº154, de 15 de junho de 2004 - Diário Oficial da União, Brasília, 17 de Junho de 2004; Seção 1, p.65-69.
9. Sociedade Brasileira de Nefrologia - censos. Disponível em: URRL: <http://www.sbn.org.br/> . Pesquisa realizada em março de 2004.
10. Eaton, A.D. et al. American Public Health Association (APHA). Standard Methods for Examination of Water and Wastewater, 19th ed. 1995, Washington, DC, 1995, 19th ed.
11. Instituto Adolfo Lutz. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos Químicos e Físico para Análise de Alimentos. São Paulo. 3ª.ed., Sulfato e Nitrato, 1985; V.1, p.302-30.
12. USA, Pharmacopeia, USP XXIV, Rockville, Twinbrook Parkway, Bacterial Endotoxins Test, 1995; 24:1829-30
13. Brasil, Portaria nº 518, de março de 2004, Gabinete do Ministro – Ministério Da Saúde, Diário Oficial da União nº 59 de 26/03/2004, Seção 1, pág. 266 –70.
14. Center For Disease Control & Prevention, USA e World Health Organization, Geneva, Switzerland. *Epi Info* 6, 1994; version 6.02.
15. USA, Association for the Advancement of Medical Instrumentation. American National Standards Institute, USA , Inc. Hemodialysis Systems. ANSI/AAMI RD5,1992; 27-58.
16. Monge, R. et al. Estacionalidad de parásitos y bacterias intestinales en hortalizas que se consumen crudas en Costa Rica. *Rev Biol Trop* 1996; 44:369-75.
17. Simões, M. Leveduras, *Pseudomonas aeruginosa* e bactérias heterotróficas em água de diálise. São Paulo, 2004 [Dissertação de Mestrado – Coordenação dos Institutos de Pesquisa da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Instituto Adolfo Lutz].
18. Nanopure Dlamond UF. Ultrapure water system Operation Manual Series 1192, UKA, 2000.

Estudo integrado da qualidade das águas da bacia hidrográfica do rio Bonito em Descalvado - SP

Integrated study on the water quality from rio Bonito watershed in Descalvado - SP

RIALA6/1037

Helder Silva FONSECA^{1*}; Nemésio Neves Batista SALVADOR²

* Endereço para correspondência: Rua Antonio Buzinaro, 488 – CEP 16.430-000 – Guaiçara – SP., e-mail: heldersf@itelefonica.com.br

¹ Vigilância Sanitária Estadual, GVS de Bauru, S.P.

² Universidade Federal de São Carlos, Departamento de Engenharia Civil

Recebido:18/01/2005 – Aceito para publicação: 04/08/2005

RESUMO

Neste estudo é apresentada a qualidade das águas da bacia hidrográfica do rio Bonito, Descalvado - SP. Entre setembro/2000 e dezembro/2001 foram avaliados, por meio de coletas e análises de água, quinze parâmetros de qualidade, tais como: condutividade, cor aparente, coliformes totais, coliformes fecais, demanda bioquímica de oxigênio, demanda química de oxigênio, fósforo total, nitrogênio total, oxigênio dissolvido, sólidos dissolvidos totais, sólidos suspensos totais, sólidos totais, pH, temperatura e turbidez. Os resultados obtidos mostraram que a condutividade, cor aparente, coliformes totais, coliformes fecais, demanda bioquímica de oxigênio, demanda química de oxigênio, fósforo total, nitrogênio total, oxigênio dissolvido e turbidez, foram proporcionados pelo lançamento *in natura* dos esgotos do município de Descalvado. As concentrações de nutrientes - nitrogênio e fósforo sugeriram a contribuição também, das atividades de agricultura e pecuária. Com relação aos fatores pedológicos, a cor aparente, sólidos dissolvidos totais, sólidos suspensos totais e a turbidez receberam influência de processos erosivos do solo (latossolo vermelho-amarelo), no primeiro ponto de amostragem, mais à montante. A poluição provocada pelos lançamentos do abatedouro de frangos e de mineradoras de areia foi detectada. A variação de pH de 6,0 a 7,3, parece estar associada com a própria composição pedológica dos solos da bacia.

Palavras-Chave. qualidade de água, bacia hidrográfica, recursos hídricos, poluição, erosão.

ABSTRACT

The present paper reports a study on the quality of water from the watershed of Bonito river in Descalvado – SP. From September/2000 to December/2001, the water quality was assessed by sampling and analyzing fifteen quality parameters, such as: conductivity, apparent color, total coliforms, fecal coliforms, biochemical oxygen demand, chemical oxygen demand, total phosphorus, total nitrogen, dissolved oxygen, total dissolved solids, total suspended solids, total solids, pH, temperature, and turbidity. The obtained results showed that conductivity, apparent color, total coliforms, fecal coliforms, biochemical oxygen demand, chemical oxygen demand, total phosphorus, total nitrogen, dissolved oxygen, total dissolved solids, total suspended solids, and turbidity were caused by the discharge of *in natura* wastewater from Descalvado town. The concentrations of nutrients – nitrogen and phosphorus detected in the present study suggested that agriculture and cattle activities also adversely contributed. Regarding to the pedological factors, the apparent color, total dissolved solids, total suspended solids, and turbidity were affected by the soil erosive processes (red-yellow oxisol), in the first sampling point from upstream. Pollution caused by the discharge of a poultry slaughterhouse and mining activities was also evidenced. The pH varying from 6.0 to 7.3 suggested that this finding might be associated with watershed soil pedological properties.

Key Words. water quality, watershed, hydric resources, pollution, erosion.

INTRODUÇÃO

Partindo erroneamente do pressuposto que a água é um bem infinito e sua capacidade de autodepuração é ilimitada, o homem vem degradando irremediavelmente os recursos hídricos. Porém, ao próprio homem cabe a busca persistente da melhoria de qualidade de vida das pessoas, evitando a poluição e contaminação dos corpos d'água, e a disseminação de inúmeras doenças.

A situação da poluição da bacia do rio Bonito em Descalvado-SP, objeto deste estudo, não difere de outras bacias. A ação humana se faz presente, comprometendo a qualidade dos recursos hídricos e ambientais em decorrência do destino inadequado dos esgotos, efluentes industriais, ação de mineradoras de areia e uso e manejo inadequado do solo.

A bacia do rio Bonito situa-se entre os municípios de Descalvado (200 km²) e Porto Ferreira (23 km²), na região centro-leste do estado de São Paulo e é delimitada pelas coordenadas (UTM) de 226200 a 244000 e de 758000 a 7584000. Suas nascentes situam-se na Serra Grande, morro do Quadrão, a altitude de 1.042 m e percorre cerca de 38,50 km até atingir a margem direita do rio Mogi-Guaçu.

Os dados de Uso e Ocupação do Solo, bem como a Geologia da bacia do rio Bonito podem ser vistos em Torezan¹. O mapa Pedológico^{2,3} mostra que a área de interesse é composta por 7 unidades diferentes de solo. Para Ranieri⁴, em termos de suscetibilidade à erosão do solo do município de Descalvado, uma área considerável enquadra-se nas categorias de alta e muito alta suscetibilidade.

Através de indicadores físicos, químicos e bacteriológicos de qualidade das águas, em seções do rio localizadas à jusante de áreas erodíveis ou de sub-bacias que possuem diferentes tipos de solo, foi possível estudar as diversas influências na qualidade das águas da bacia, em função dos diversos tipos de solos e atividades antrópicas.

MATERIAL E MÉTODOS

O plano amostral da bacia contemplou cinco pontos, os quais foram georeferenciados com o GPS (Global Position System). Após a delimitação desses pontos, a bacia hidrográfica foi dividida em cinco sub-bacias, demarcadas pela definição visual em mapa, dos divisores de água da topografia da região. Esta subdivisão teve como objetivo a melhor caracterização dos diversos fatores antrópicos ou naturais que concorrem para a qualidade das águas de cada ponto.

Diversos fatores interdependentes contribuem para a qualidade das águas superficiais da bacia do rio Bonito. Para a definição dos pontos amostrais e para a análise da correlação da qualidade das águas com esses fatores, foi utilizado o método de superposição de mapas de Hidrografia, Pedologia, Geologia, Uso e Ocupação do Solo e Erosão.

Foram considerados para análise os parâmetros: cor aparente, sólidos totais (ST), sólidos dissolvidos totais (SDT), sólidos suspensos totais (SST), temperatura, turbidez, condutividade, demanda bioquímica de oxigênio (DBO), demanda química de oxigênio (DQO), fósforo total, nitrogênio total, oxigênio dissolvido (OD), potencial hidrogeniônico (pH), coliformes totais e coliformes fecais⁵.

As amostras foram retiradas no centro de cada seção, na zona sub-superficial de maior correnteza, direcionando-se a boca do frasco contra esta⁶. A temperatura e o oxigênio dissolvido foram medidos *in situ*, diretamente no corpo d'água, respectivamente com termômetro e oxímetro portátil, marca HACH, tipo DO 175, calibrado com a câmara de calibração e estocagem.

A metodologia para as análises de água foi a do Standard Methods for the Examination of Water and Wasterwater⁷, e os limites ou condições da água basearam-se nos parâmetros de qualidade mais relacionados à erosão (Tabela 1) da Resolução nº 20 do CONAMA⁸.

Tabela 1. Parâmetros adotados e seu método de análise.

| PARÂMETROS | Un. | MÉTODO DE ANÁLISE |
|---|-------|---|
| Cor Aparente | uC | Espectrofotometria |
| Sólidos Totais (ST) a 105 °C | mg/L | Gravimetria |
| Sólidos Dissolvidos Totais (SDT) a 105 °C | mg/L | Filtração com membrana e Gravimetria |
| Sólidos Suspensos Totais (SST) a 105 °C | mg/L | Filtração com membrana e Gravimetria |
| Temperatura | °C | Termometria |
| Turbidez | uT | Nefelometria |
| Condutividade | µS/cm | Condutivimetria |
| Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) | mg/L | Diluições e Oximetria |
| Demanda Química de Oxigênio (DQO) | mg/L | Digestão ácida com dicromato de potássio e Espectrofotometria |
| Fósforo Total | mg/L | Digestão com persulfato de potássio e Cloreto estanoso (D) |
| Nitrogênio Total | mg/L | Digestão com persulfato de potássio |
| Oxigênio Dissolvido (OD) | mg/L | Oximetria |
| PH | - | Potenciometria |
| Coliformes Totais | NMP | Tubos Múltiplos |
| Coliformes Fecais | NMP | Tubos Múltiplos |

Un = unidade

Cada ponto amostral foi codificado de forma alfanumérica, com duas letras e um número. As duas letras (PC) representam as palavras ponto de coleta, enquanto que o número significa a posição em relação à nascente, desde o número 1, mais próxima a ela, até o número 5, mais próxima da foz do rio Bonito.

Coletou-se sempre durante o dia, no período da manhã, entre 8 h e 12 h. No total foram retiradas 130 amostras do rio Bonito (PC-1, PC-2, PC-3, PC-4 e PC-5).

As cargas potencialmente poluidoras pontuais a montante dos pontos de coleta são: as mineradoras de areia, o abatedouro de frangos e os esgotos sem tratamento da cidade e estão indicadas no diagrama unifilar do rio Bonito (Figura 1).

O Decreto Estadual nº 10.755⁹, que classifica os corpos d'água do Estado de São Paulo, enquadra o rio Bonito da nascente até a confluência com o córrego do Rosário, como pertencente à Classe 2, e pertencente à Classe 3, desde a confluência com o córrego Rosário até a confluência com o rio Mogi-Guaçu, no Município de Porto Ferreira. Os tributários córrego da Vila Nova, córrego da Bomba, córrego da Serrinha, córrego do Cateto, córrego Santo Antonio, córrego da Capetinga e córrego do Paiolzinho ou da Olaria, pertencem à Classe 2. O córrego do Rosário está enquadrado na Classe 4¹⁰.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para cada parâmetro e medida analisados, foi elaborada uma tabela com as concentrações mínimas, médias e máximas obtidas em cada ponto de coleta.

Conforme os diversos pontos do trecho estudado, e considerando para rios classe 2 ou 3, os resultados podem ser

comparados com o padrão da Resolução CONAMA 20/86⁸, bem como o desvio padrão da média e o coeficiente de variação dos referidos pontos de coleta do rio Bonito (Tabela 2).

Parâmetros Físicos

Cor Aparente

Na Tabela 2, verifica-se que a média dos valores (151,9 uC) está acima dos padrões da Resolução CONAMA 20/86⁸. O menor valor encontrado (18,0 uC) está associado ao período de estiagem da bacia, que vai de abril a setembro. O valor máximo (443,0 uC) indica o lançamento de esgotos da cidade, que se caracterizam por apresentar, predominantemente, matéria em estado coloidal¹¹. O aumento da cor foi detectado no período de chuva, provocado também pelo carreamento de matéria orgânica e sais contidos no solo.

Observa-se pelo mapa pedológico da bacia do rio Bonito, que uma das causas naturais que provocam cor no PC-1 é a contribuição da sub-bacia constituída de latossolo vermelho-amarelo, com textura média de 15 a 35% de argila. Este tipo de solo da bacia contém óxido de ferro e dentre os compostos inorgânicos, são capazes de provocar cor nas águas.

Sólidos Totais

As oscilações dos valores para Sólidos Totais (ST) do rio Bonito vão desde 10 mg/L (PC-1), obtidos tanto na estação chuvosa quanto na seca, até o valor máximo de 300 mg/L, verificado no PC-3 durante o período das chuvas.

Constatou-se no último ponto de coleta (PC-5), uma grande quantidade de sólidos mais grosseiros, visíveis a olho nu, provocando assoreamento do rio. Por toda a região de várzea, extensão do rio com menor velocidade, notou-se vários bancos de areia.

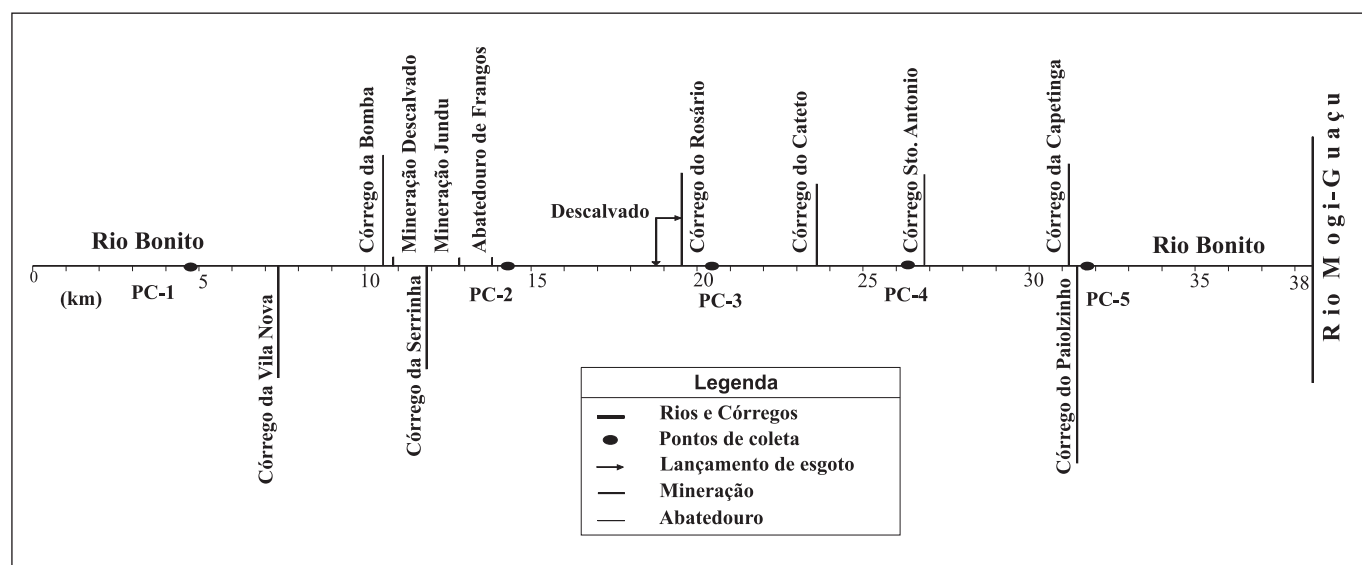


Figura 1. Diagrama unifilar do rio Bonito.

Fonte: Fonseca².

Tabela 2. Resumo de parâmetros e medidas, concentrações nos pontos de coleta, a classificação Resolução CONAMA 20/86, o desvio padrão e o coeficiente de variação nos diversos pontos de coleta do rio Bonito.

| Parâmetros e medidas | Concentração/ Ponto de Coleta (PC) | | | | | Padrão da Resolução CONAMA 20/86 (Classe 2) | Padrão da Resolução CONAMA 20/86 (Classe 3) | Desvio Padrão (±) | Coeficiente de Variação (%) |
|----------------------|------------------------------------|-----------|---------------------|---------------------|----|---|---|---------------------|-----------------------------|
| | Mín. | PC | Méd. | Máx. | PC | | | | |
| Cor Aparente (uC) | 18,0 | 1 | 151,9 | 443,0 | 3 | 75,0 | 75,0 | 87,1 | 57,3 |
| ST (mg/L) | 10,0 | 1 e 5 | 84,1 | 300,0 | 3 | | | 47,8 | 56,8 |
| SDT (mg/L) | <LD | 1 e 5 | 69,8 | 210,0 | 3 | 500,0 | 500,0 | 43,2 | 61,9 |
| SST (mg/L) | <LD | 1 a 5 | 14,3 | 150,0 | 3 | | | 5,9 | 41,2 |
| Temperatura (°C) | 16,4 | 2 e 4 | | 29,8 | 5 | | | | |
| Turbidez (uT) | 3,9 | 1 | 26,3 | 147,0 | 4 | 100,0 | 100,0 | 13,0 | 49,4 |
| Condut. (µ S/cm) | 22,1 | 1 | 68,3 | 170,5 | 3 | | | 26,9 | 39,4 |
| DBO (mg/L) | 0,1 | 1 | 4,1 | 9,5 | 3 | 5,0 | 10,0 | 2,5 | 60,9 |
| DQO (mg/L) | 1,0 | 1,2,4 e 5 | 18,5 | 98,0 | 3 | | | 8,4 | 45,4 |
| Fósf. Total (mg/L) | 0,1 | 1 | 1,2 | 3,1 | 3 | | | 0,7 | 58,3 |
| Nitr. Total (mg/L) | <LD | 1 e 5 | 2,4 | 6,0 | 3 | | | 1,5 | 62,5 |
| OD (mg/L) | 2,0 | 3 | 4,9 | 7,5 | 1 | 5,0 | 4,0 | 1,0 | 20,4 |
| pH | 6,0 | 1 | | 7,3 | 1 | L. Inf.=6,0 L. Sup.=9,0 | L. Inf.=6,0 L. Sup.=9,0 | | |
| Col. Total (NMP) | 2,0x10 ² | 1 | 3,6x10 ⁵ | 5,0x10 ⁶ | 3 | 5,0x10 ³ | 2,0x10 ⁴ | 9,8x10 ² | 27,2 |
| Col. Fecais (NMP) | 2,0x10 ² | 1 | 1,2x10 ⁴ | 2,1x10 ⁵ | 3 | 1,0x10 ³ | 4,0x10 ³ | 3,2x10 ² | 20,6 |

Nota: LD: limite de detecção⁷

Sólidos Dissolvidos Totais

A Resolução CONAMA 20/86⁸, impõe limite de Sólidos Dissolvidos Totais (SDT) de no máximo 500 mg/L. Nenhum valor ultrapassou esse padrão, indicando que as águas do rio Bonito são águas doces (SDT < 500 mg/L). O maior valor obtido foi de 210 mg/L, no PC-3, na estiagem.

Segundo Fonseca⁵, verifica-se uma relação entre a média dos valores da condutividade e a média de SDT. O acréscimo de um corresponde ao acréscimo de outro e vice-versa, para o decréscimo. Desta forma, pode-se dizer que a condutividade é diretamente proporcional à concentração de SDT.

Observando-se o mapa de pedologia do rio Bonito, nota-se que a principal contribuição para os valores de SDT do PC-1 é de latossolo vermelho-amarelo. Os demais pontos amostrais, devido às diversas atividades modificadoras da qualidade das águas, impedem de estabelecer uma associação entre pedologia e sólidos dissolvidos totais.

Sólidos Suspensos Totais

As concentrações de Sólidos Suspensos Totais (SST) variaram até 150 mg/L no período chuvoso. O maior valor foi verificado no dia 10/01/01 (PC-3 = 150 mg/L), provavelmente foi proporcionado somente pela chuva do dia, com precipitação de 43,70 mm e duração de 6:30 h, pois no dia anterior não houve chuvas.

O valor máximo encontrado no PC-3 proveio do lançamento *in natura* dos esgotos da cidade de Descalvado e,

associado a estes, uma contribuição esperada de escoamento superficial urbano no período das chuvas (Tabela 2).

Os resultados das análises dos SST apresentaram a tendência de serem maiores nos meses de chuva, mantendo uma relação direta com a turbidez, ou seja, neste mesmo período houve também um aumento na magnitude desse parâmetro. A mesma relação direta é obtida nos meses de seca, em que ambos valores diminuíram. Os valores máximos da turbidez obtidos coincidiram com os valores máximos de SST no mesmo dia.

Observando o mapa pedológico, verifica-se que as concentrações de SST e a turbidez da sub-bacia do PC-1, foram influenciadas pelo latossolo vermelho-amarelo. As diversas atividades antrópicas nos demais pontos de coleta, em toda bacia, impedem de se estabelecer uma relação entre turbidez e SST.

Temperatura

No verão, a temperatura da água foi significativamente maior que no inverno. No inverno variou de 16,4°C (mínima) e no verão de 29,8°C (máxima). A temperatura também, pode variar com a altitude. No trecho estudado, as temperaturas máximas foram menores nos primeiros pontos de coleta (maiores altitudes) e mais altas nos últimos (menores altitudes).

A temperatura do rio Bonito, no geral, aumentou progressivamente no sentido PC-1 → PC-5. As diferenças observadas foram atribuídas aos diferentes horários de coleta e que também seguiram este mesmo sentido. Observa-se que

no inverno, o rio Bonito encontra-se com a temperatura dentro do esperado. No verão, a máxima encontrada de 29,8°C (PC-5), tem como causa principal a ausência de mata ciliar, não provendo sombreamento, e o horário de coleta, próximo das 12 h.

De maneira geral, as águas do rio Bonito caracterizam-se por apresentarem a temperatura com tendência à elevação nos meses de dezembro, janeiro, fevereiro e março e à queda nos meses de junho, julho, agosto e setembro.

Turbidez

Os valores médios de 26,3 uT estiveram dentro dos padrões estabelecidos pela Resolução CONAMA/20/86⁸, abaixo de 100,0 uT. A turbidez elevada no período das chuvas (147,0 uT) se deveu principalmente ao carreamento de sólidos da drenagem das áreas agrícolas.

Pesquisas atuais em cursos d'água da região, relacionando turbidez e qualidade de água, não são comuns. Verifica-se a proximidade de valores com o Ribeirão Cachim e que tem média de 25,0 uT¹²; portanto, bem próxima a da média do Bonito e que é de 26,3 uT. Já no rio Monjolinho os valores mínimos e máximos variam de 8 a 267 uT¹³ e do rio Bonito de 3,9 a 147,0 uT.

Parâmetros Químicos

Condutividade

Para a condutividade não há padrão estabelecido pela Resolução CONAMA 20/86⁸. O valor médio dos pontos de coleta foi de 68,3 µS/cm e está dentro do esperado para rios brasileiros, que varia na faixa de 10 a 100 µ S/cm¹⁴.

No PC-3 encontrou-se o valor máximo de 170,5 µS/cm, em período de chuva, que pode ser explicado pelo impacto causado pelos esgotos domésticos, devido a pulsos com grandes quantidades de sais dissolvidos¹⁴. Outro fator que certamente, fez elevar a condutividade neste ponto foram os sólidos dissolvidos carreados na lavagem da cidade pelas águas das primeiras chuvas (poluição difusa).

Alguns autores consideram que a condutividade tende a diminuir em períodos de chuvas. Barretto¹³ estudando o rio Monjolinho, em São Carlos, verificou que as maiores concentrações situavam-se nos períodos secos causados pela menor diluição dos efluentes urbanos e pela entrada de águas dos córregos Tijuco Preto e Gregório. Evidencia-se que as águas pluviais tanto podem colaborar com um aumento, como com a diminuição da condutividade, dependendo da quantidade e espécie de íon carreado pelo escoamento. A vazão dos rios exerce efeito sobre a condutividade, provocando maior ou menor diluição das cargas poluidoras.

Demanda Bioquímica de Oxigênio

A concentração do valor médio (4,1 mg/L) manteve-se abaixo do limite estabelecido pela Resolução CONAMA 20/86⁸, ou seja, concentrações inferiores a 5,0 mg/L para cursos d'água da Classe 2 e de 10,0 mg/L para a Classe 3 (Tabela 2).

O valor mínimo encontrado de 0,1 mg/L (PC-1), por ser

trecho à montante, tipicamente apresenta concentração menor de material orgânico, provindo principalmente de drenagem superficial de solos de regiões agrícolas e pastagens. No PC-3, o valor máximo atingiu 9,5 mg/L e este aumento deveu-se a contribuição maior de esgotos domésticos, com grande quantidade de matéria orgânica e em menor escala, da drenagem superficial urbana (poluição difusa).

Demanda Química de Oxigênio

Para a UNESCO/WHO/UNEP¹⁵, a Demanda Química de Oxigênio (DQO) observada em água superficial pode ter o limite de até 20 mg/L, ou menos em água não poluída, ou ainda até 200 mg/L em água recebendo efluentes. Neste sentido, a concentração média encontrada de 18,5 mg/L está dentro da faixa considerada normal.

O valor máximo obtido (98,00 mg/L) refere-se ao período chuvoso. Na estiagem, o menor valor encontrado foi de 1,0 mg/L. Houve um aumento da DQO no período chuvoso e diminuição no período de seca.

Fósforo Total

A concentração máxima de fósforo total encontrada de 3,1 mg/L (PC-3) indica a poluição provocada pelos esgotos da cidade, sem qualquer tipo de tratamento, no período de estiagem.

O PC-1 atingiu um valor mínimo de 0,1 mg/L, indicando que este valor pode estar relacionado à erosão superficial dos solos agrícolas. Junto ao material erodido é de se esperar que matéria orgânica do solo e fertilizantes utilizados em plantios sejam também carreados para o rio.

Nitrogênio Total

Para cursos d'água a Resolução CONAMA 20/86⁸ não estabelece os padrões para nitrogênio total, mas sim para seus compostos derivados. O valor máximo encontrado no PC-3 de 6,0 mg/L indica a poluição provocada pelos esgotos da cidade lançados *in natura* no rio.

Durante a estação seca a concentração de nitrogênio total chegou ao valor de 6,0 mg/L e com o advento do período chuvoso, chegou a menos que o limite de detecção⁷ (<LD), mostrando que para este parâmetro houve uma alteração significativa entre o período seco e o chuvoso.

Oxigênio Dissolvido

A Resolução CONAMA 20/86⁸ prevê para águas de Classe 2, uma concentração de Oxigênio Dissolvido (OD) mínima de 5,0 mg/L. Neste sentido, a média de 4,9 mg/L não atingiu o mínimo necessário, apresentando baixa concentração de OD, devido ao seu consumo na decomposição de matéria orgânica no rio. No trecho onde o rio recebe a classificação 3, a média observada se enquadrou no padrão (Tabela 2).

Foi observada a diminuição dos teores de OD durante a estação chuvosa (verão), em relação aos teores da estiagem (inverno), para um mesmo ponto. Esta constatação pode ser

explicada pela relação inversa entre temperatura e concentração de OD na água e pelo carreamento de matéria orgânica do solo para o rio, no período chuvoso.

O menor valor de OD encontrado foi de 2,0 mg/L (PC-3), durante o período de chuva e coincidiu inversamente com a maior concentração de 98,0 mg/L para a DQO, também verificada no mesmo ponto e na mesma data. Neste ponto o rio sofre descarga de esgotos domésticos, a principal fonte de matéria orgânica, diminuindo o teor de OD. O maior valor encontrado foi 7,5 mg/L (PC-1), no trecho mais a montante, com pouca atividade antrópica, onde, portanto, era esperada uma melhor qualidade de água.

pH

O pH do rio Bonito apresentou valores oscilando entre 6,0 e 7,3. A concentração está dentro da faixa preconizada pela Resolução CONAMA 20/86⁸, que é de 6,0 a 9,0 (Tabela 2). Tanto o valor mínimo de 6,0, quanto o máximo de 7,3 foram registrados no PC-1, respectivamente nos períodos seco e chuvoso. O aumento do pH em regime de chuva deve-se, principalmente, a maior dissolução de sais.

As águas naturais apresentam pH variando de 5,0 a 9,0¹⁶. O rio Bonito não foge a esta regra. Dos resultados das análises, 96,2% indicaram a tendência do rio Bonito a apresentar pH variando de 6,0 a 7,3, que caracterizam as águas como neutras ou levemente ácidas, certamente em razão do tipo e composição pedológica do solo da bacia e da decomposição de matéria orgânica. De maneira geral, há uma ligeira tendência do pH da bacia diminuir em períodos secos.

Parâmetros Bacteriológicos

Coliformes Totais

A Resolução CONAMA 20/86⁸ preconiza para rios Classe 2, uma concentração máxima de $5,0 \times 10^3$ NMP/100ml. Assim, observando a Tabela 2, verifica-se que o valor médio ($3,6 \times 10^5$ NMP/100ml) está acima do limite estabelecido. Para o rio considerado Classe 3, o padrão admitido é de $2,0 \times 10^4$ NMP/100ml. Nota-se também que o valor médio de $3,6 \times 10^5$ NMP/100ml está acima do limite legal.

Os resultados das análises mostraram que não há diferenças assinaláveis entre os períodos de chuva e estiagem. A Tabela 2 mostra que o valor mínimo de $2,0 \times 10^3$ NMP/100ml encontrado no PC-1 está associado ao contato com fezes humanas de moradias isoladas e de fezes de animais de sangue quente. O maior valor concentra-se no PC-4 ($5,0 \times 10^6$ NMP/100ml), sendo que a contribuição se deve ao lançamento dos esgotos da cidade.

Coliformes Fecais

Observando a Tabela 2, verifica-se que a Resolução CONAMA 20/86⁸ limita os rios Classe 2 em até $1,0 \times 10^3$ NMP/100ml e neste sentido, a média obtida de $1,2 \times 10^4$ NMP/100ml, está acima do limite estabelecido. No trecho Classe 3, também não foi atendido o requisito legal.

O valor mínimo de $2,0 \times 10^2$ NMP/100ml está relacionado com as fezes dos indivíduos de moradias isoladas, comuns na região, bem como aos detritos de animais homeotérmicos (animais de sangue quente), que podem conter microrganismos capazes de contribuir para a contaminação da água, principalmente nos períodos de chuva. Para Nuvolari¹⁷ e Daniel¹⁸, os microrganismos oriundos das fezes humanas podem conter organismos patogênicos. O valor máximo de $2,1 \times 10^5$ NMP apresenta contaminação fecal proveniente do lançamento dos esgotos da cidade.

CONCLUSÕES

A principal fonte de matéria orgânica na bacia do rio Bonito é, sem dúvida, a descarga dos esgotos domésticos *in natura* no município de Descalvado. As análises de DBO, DQO, OD, coliformes e nutrientes, confirmam a necessidade da implantação, em caráter de urgência, de um sistema de tratamento dos esgotos para a cidade. Os resultados de DBO e de colimetria indicam também, que o atual sistema de tratamento dos esgotos do abatedouro de frangos necessita de uma reavaliação para se adequar às normas vigentes.

Credita-se geralmente, a degradação da qualidade das águas às atividades urbanas e ao lançamento de efluentes. Entretanto, o tipo de solo e a erodibilidade de uma bacia, associados às atividades agro-pecuárias nela desenvolvidas, podem ser responsáveis pelo aumento significativo das cargas poluidoras difusas, com o conseqüente agravamento dos impactos sobre a qualidade das águas.

Pela análise da série de sólidos, principalmente a de sólidos suspensos totais, verifica-se que não se isenta a ação depredadora das mineradoras e da erosão por atividades agro-pecuárias. O impacto da erosão do solo manifesta-se pelo assoreamento observado, principalmente no PC-5. O aporte de sólidos nesta região de várzea, em que a velocidade do rio é menor, provoca grande quantidade de bancos de areia, diminuindo consideravelmente a altura da lâmina d'água.

Um dos efeitos imediatos no período das chuvas é observado na estrada que dá acesso a esta área e que se situa, aproximadamente, a 300 metros do PC-5 e que devido à enchente, torna-se intransitável. O assoreamento visível normalmente é a menor parte do depósito, sendo que um levantamento batimétrico permitiria o conhecimento da real situação do leito do rio.

A grande variação do desvio padrão de cada parâmetro ou medida (Tabela 2), deve-se ao fato de haver uma oscilação considerável dos parâmetros, observada entre os períodos de seca e o chuvoso.

A frágil condição da bacia destaca-se na ocasião das chuvas, concentradas entre os meses de outubro e março, coincidindo com o período de preparo do solo, justamente quando este fica menos protegido pela vegetação e, portanto, mais susceptível à erosão. Os resultados obtidos confirmam

a relação entre o tipo de solo e a qualidade das águas, com o carreamento de sedimentos para o rio. As maiores concentrações de sólidos foram encontradas em períodos de chuva, a saber: sólidos totais (300,0 mg/L), sólidos suspensos totais (150,0 mg/L), turbidez (147,0 uT) e cor aparente (443,0 uC). A confrontação destes resultados com o mapa pedológico confirma que o latossolo vermelho-amarelo exerce maior influência no carreamento de sólidos, principalmente no PC-1. Além dos impactos físicos, o transporte de partículas sólidas traz, agregado, toda uma carga de poluentes. Dentro deste contexto, as medidas adequadas de controle do transporte de sólidos são fundamentais para minimizar os efeitos indesejáveis da turbidez e do assoreamento do rio, devendo abranger providências na prevenção e controle da erosão na bacia

REFERÊNCIAS

1. Torezan FE. Sistema de manejo ambiental da bacia do rio Bonito com ênfase nas atividades de exploração mineral [Dissertação de Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais]. São Carlos: UFSCar, 2000. 160 pp.
2. Instituto Agrônomo de Campinas - IAC. Pedologia. SF – 23 -VC - I - V. São Paulo; 1981. [1 mapa]. Escala 1:100.000.
3. Instituto Agrônomo de Campinas - IAC. Pedologia. SF – 23 - Y - A - I. São Paulo; 1982. [1 mapa]. Escala 1:100.000.
4. Ranieri VEL. Discussão das potencialidades e restrições do meio como subsídio para zoneamento ambiental: o caso do município de Descalvado [Dissertação de Mestrado em Ciências da Engenharia Ambiental]. São Carlos: EESC/USP, 2000. 87 pp.
5. Fonseca HS. Qualidade das águas superficiais de uma bacia hidrográfica sujeita a processos erosivos – Estudo de caso do rio Bonito, em Descalvado, SP [Dissertação de Mestrado em Engenharia Urbana]. São Carlos: UFSCar, 2002. 193 pp.
6. CETESB. Curso de coletas e preservação de amostras de água. São Paulo, 1996. 58pp.
7. American Public Health Association (APHA). Standard methods for the examination of water and wastewater. 19th ed., Washington, APHA; 1995. 1100 pp.
8. Brasil, Leis, decretos, etc. Portaria nº 20 de 18 de julho de 1986. Estabelece a classificação das águas doces, salobras e salinas do Território Nacional. Diário Oficial da União, Brasília, 30 de julho de 1986, Seção I, p. 11356.
9. SÃO PAULO. Decreto nº 10.755, de 22 de novembro de 1977. Diário Oficial, Dispõe sobre o enquadramento dos corpos de água receptores na classificação prevista no Decreto nº 8.468, de 8 de setembro de 1976, e dá providências correlatas. Disponível em http://www.cetesb.sp.gov.br/licenciamento/legislacao/estadual/decretos/decreto_10755.
10. CETESB. Legislação estadual: controle da poluição ambiental. São Paulo; 1998a. (Série Documentos).
11. Piveli RP. Qualidade das águas. São Paulo: FSP; 1996. 217 pp.
12. Primavesi O, Freitas AR, Oliveira HT, Primavesi ACPA. A qualidade da água na microbacia hidrográfica do Ribeirão Canchim, São Carlos, SP, ocupada por atividade de pecuária. *Acta Limnologica Brasiliensia* 2000; 12: 95-111.
13. Barretto AS. Estudo da distribuição de metais em ambiente lótico, com ênfase na assimilação pelas comunidades biológicas e na sua quantificação no sedimento e água [Tese de Doutorado em Hidráulica e Saneamento]. São Carlos: EESC/USP, 1999. 275 pp.
14. Von Sperling EA. Utilização do parâmetro condutividade na avaliação da qualidade da água em mananciais de abastecimento. In: SILUBESA - Simpósio Luso-Brasileiro de Engenharia Sanitária e Ambiental, 8, João Pessoa. O Saneamento Ambiental na Preservação dos Recursos Hídricos. Rio de Janeiro: ABES; 1998. 3: 748-751.
15. UNESCO/WHO/UNEP. Water quality assessment. London: Chapman & Hall; 1992. 585 pp.
16. Batalha B-HL, Parlatore, AC. Controle da qualidade de água para consumo humano: bases conceituais e operacionais. São Paulo: CETESB; 1993. 198 pp.
17. Nuvolari A. Esgoto sanitário: coleta, transporte, tratamento e reuso agrícola. São Paulo: Edgard Blücher; 2003. 520 pp.
18. Daniel LA. Processos de desinfecção e desinfetantes alternativos na produção de água potável. Rio de Janeiro: RiMa, ABES; 2001. 115 pp.

Influência da irradiação gama (^{60}Co) na destruição da aflatoxina B_1 em amendoim (*Arachis hypogaea* L.)

Effect of gamma-irradiation (^{60}Co) on aflatoxin B_1 inactivation in peanut (*Arachis hypogaea* L.)

RIALA6/1038

Guilherme PRADO^{1,2*}; Eliana P. CARVALHO²; Marize S. OLIVEIRA¹; Jovita E. C. M. GAZZINELLI¹; Vanessa D. MORAES¹; Ricardo F. CORRÊA³; Valbert N. CARDOSO⁴; Thais V. SOARES¹

* Endereço para correspondência: ¹Fundação Ezequiel Dias, Laboratório de Micologia e Micotoxinas. Rua Conde Pereira Carneiro, 80, Gameleira – 30510010. Belo Horizonte/MG.

² Universidade Federal de Lavras, Departamento de Ciência de Alimentos. Pós-Graduação em Ciência de Alimentos.

³ Laboratório de Medidas Nucleares, Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear. Belo Horizonte/MG.

⁴ Laboratório de Radioisótopos. Faculdade de Farmácia. Universidade Federal de Minas Gerais.

Recebido: 18/07/2005 – Aceito para publicação: 06/10/2005

RESUMO

Foi verificado o efeito da irradiação gama (^{60}Co) em doses que variaram de 0 a 30 kGy, na destruição de diferentes níveis aflatoxina B_1 em amostras de amendoim, cultivar Tatu Vermelho, artificialmente e naturalmente contaminadas, procedentes de São Paulo, safras 2001/2002 e 2002/2003. A aflatoxina B_1 foi extraída em mistura de metanol e KCl 4% (270 + 30, v/v), seguido de clarificação com CuSO_4 10% e partição com clorofórmio. A quantificação foi feita por cromatografia em camada delgada, medindo-se a área das fluorescências de amostras e padrões em densitômetro a 366 nm. Doses de irradiação gama (^{60}Co) de 1, 5 e 10 kGy reduziram em cerca de 20 % os níveis de aflatoxina B_1 em amostras artificialmente contaminadas com 55,3, 105,8 e 159,3 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. As amostras naturalmente contaminadas com aflatoxina B_1 (84,0 e 258,3 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) e tratadas com irradiação gama (^{60}Co) em doses de 5 e 10 kGy, não apresentaram redução do teor de aflatoxina B_1 . Entretanto, as amostras naturalmente contaminadas com aflatoxina B_1 (86,0 e 248,0 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) e irradiadas nas doses de 15, 20, 25 e 30 kGy apresentaram valores menores de aflatoxina B_1 , com faixa de redução que variou de 49 a 72%. Desta forma, pode-se concluir que a irradiação gama (^{60}Co) não é capaz de destruir totalmente a aflatoxina B_1 em condições naturais, mesmo em doses de até 30 kGy.

Palavras-Chave. amendoim, aflatoxina B_1 , irradiação gama.

ABSTRACT

The effect of gamma-irradiation in doses ranging from 0 to 30 kGy was verified in order to inactivate aflatoxin B_1 in peanuts sample. Peanut samples of Tatu Vermelho cultivar 2001/2002 and 2002/2003 crops, cultivated in São Paulo state, naturally or experimentally contaminated with aflatoxin B_1 at varied contents, were investigated. Aflatoxin B_1 was extracted with methanol:4% potassium chloride moisture (270 + 30, v/v) followed by clarification with 10% cupric sulfate and partition with chloroform. Aflatoxin quantification was done by means of thin layer chromatography, measuring the samples and the standard fluorescent areas on densitometer at 366 nm. Gamma-irradiation (^{60}Co) at doses of 1.5 and 10 kGy reduced the aflatoxin B_1 contents in around 20% in samples experimentally contaminated with 55.3, 105.8, and 159.3 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. In naturally contaminated peanut samples containing 84.0 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ and 258.3 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ of aflatoxin B_1 , and treated with gamma-irradiation (^{60}Co) at 5 and 10 kGy doses, no reduction of aflatoxin B_1 levels was evidenced. On the other hand, samples naturally contaminated with aflatoxin B_1 (86.0 and 248.0 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) and irradiated with 15, 20, 25 and 30 kGy doses, showed lower values of aflatoxin B_1 , ranging from 49 to 72%. In conclusion, no total inactivation of aflatoxin B_1 occurs by means gamma-irradiation (^{60}Co) in natural conditions, even at 30 kGy dose.

Key Words. peanut, aflatoxin B_1 , gamma irradiation.

INTRODUÇÃO

As aflatoxinas são produtos do metabolismo secundário do *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus nomius*, que contaminam as culturas no campo durante o armazenamento e também os produtos alimentícios. A aflatoxina B₁ apresenta atividade carcinogênica, teratogênica e mutagênica para os seres humanos e animais, e entre todas, é usualmente a toxina de maior ocorrência e concentração nos alimentos¹.

A contaminação de alimentos com aflatoxinas é mais freqüente em regiões tropicais e subtropicais, como o Brasil, onde o clima favorece o desenvolvimento de fungos toxigênicos, principalmente em amendoim^{2,3}.

O processo de irradiação consiste na exposição de alimentos a uma fonte de radiação ionizante, minuciosamente controlada, por tempo pré-fixado. Radiações ionizantes são partículas ou fótons que possuem energia suficiente para produzir partículas eletricamente carregadas (íons) nos materiais com os quais entram em contato. Os irradiadores gama comerciais utilizam, em sua maioria fontes de ^{60}Co . Esta escolha está baseada na insolubilidade do ^{60}Co em água e no fato de este fornecer a mesma dose em tempo 7 vezes menor que o ^{137}Cs ^{4,5}.

A radiação ionizante pode agir diretamente sobre os componentes essenciais da célula ou indiretamente, proporcionando a formação de produtos radiolíticos, particularmente os radicais livres formados a partir da água⁶.

Em 1981, a preservação de alimentos pelo tratamento com a irradiação foi aprovada pelo Comitê Misto da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO/WHO) e a Agência Internacional de Energia Atômica (IAEA). Em 1984 foi criado o Grupo Consultivo Internacional sobre Irradiação de Alimentos (GCIIA) pela WHO, juntamente com a FAO e a IAEA, para acompanhar a evolução dessa tecnologia. O Brasil, junto com mais 44 países, faz parte desse grupo^{7,8}.

No Brasil está em vigor a Resolução RDC N.º 21, de 26 de janeiro de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Não há mais restrições em relação às doses a serem aplicadas. Qualquer alimento pode ser irradiado, desde que sejam observadas as seguintes condições: (1) a dose mínima absorvida deve ser suficiente para alcançar a finalidade desejada; (2) a dose máxima deve ser inferior àquela que comprometeria as propriedades funcionais do alimento⁹.

O objetivo do trabalho foi verificar a eficiência da irradiação gama (^{60}Co) em destruir a aflatoxina B₁ em amostras de amendoim artificialmente e naturalmente contaminadas.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

Os experimentos foram realizados em amostras artificialmente e naturalmente contaminadas, constituídas de grãos de amendoim beneficiado, cultivar Tatu Vermelho, safra

2001/2002 e safra 2002/2003, provenientes da Indústria de Alimentos Santa Helena (Ribeirão Preto - São Paulo).

As cinco amostras encaminhadas apresentavam os seguintes níveis de aflatoxinas:

A. Safra 2001/2002

1. Aflatoxinas: não detectadas (ND)
2. Aflatoxina B₁: 84,0 $\mu\text{g.kg}^{-1}$
3. Aflatoxina B₁: 258,3 $\mu\text{g.kg}^{-1}$

B. Safra 2002/2003

4. Aflatoxina B₁: 248,0 $\mu\text{g.kg}^{-1}$
5. Aflatoxina B₁: 86,0 $\mu\text{g.kg}^{-1}$

A quantificação das aflatoxinas foi efetuada na Indústria de Alimentos Santa Helena e confirmada na Fundação Ezequiel Dias (Laboratório de Micologia e Micotoxinas).

Preparo das amostras

O preparo das amostras foi efetuado de acordo com a finalidade de cada ensaio e descrito a seguir:

Verificação da eficiência da irradiação gama (^{60}Co) na destruição da aflatoxina B₁ em amostras artificialmente contaminadas

A amostra 1 (Aflatoxina B₁: ND) foi espalhada e dividida em 3 bandejas de alumínio, com cerca de 2,0 kg em cada uma delas. Posteriormente, realizou-se a contaminação com solução padrão de aflatoxina B₁ (item 2.3) para obter concentrações de 50, 100 e 150 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de aflatoxina B₁, respectivamente. As amostras permaneceram à temperatura ambiente durante a noite para evaporação do solvente. Em seguida foram moídas, homogeneizadas e passadas em tamiz 20 mesh. Após quarteamento, as amostras foram pesadas em sacos plásticos (200 g) e guardadas sob refrigeração (4°C) até o momento de serem irradiadas. Anteriormente ao processo de irradiação, foram determinados em triplicata os níveis de aflatoxina B₁ das três amostras fortificadas.

Verificação da eficiência da irradiação gama ^{60}Co na destruição da aflatoxina B₁ em amostras naturalmente contaminadas

As amostras 2, 3, 4 e 5 naturalmente contaminadas com aflatoxina B₁, foram moídas, homogeneizadas e passadas em tamiz 20 mesh. Após quarteamento, as amostras foram distribuídas em sacos plásticos contendo cerca de 200 g. Em seguida o material foi acondicionado sob refrigeração (4°C) até o momento de ser irradiado.

Solução padrão de aflatoxina B₁

Solução padrão estoque de aflatoxina B₁ (10,92 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) foi preparada dissolvendo o padrão sólido (Sigma, Sigma Chemical Co. St. Louis, MO) em benzeno:acetonitrila (98:2, v/v

v). A concentração exata foi medida em espectrofotômetro Shimadzu UV-1601 PC, Shimadzu Scientific Instrument, Japan¹⁰.

Metodologia de irradiação

O processo de irradiação foi conduzido e executado na Empresa Brasileira de Radiações Ltda - EMBRARAD (São Paulo). A taxa de dose foi por volta de 4,0 kGy.h⁻¹, tendo o irradiador uma fonte de ^{60}Co com tecnologia da Nordion Canadian.

Em amostras artificialmente contaminadas

A amostra preparada no item 2.2.1 foi irradiada com irradiação gama (^{60}Co) nos níveis de 0,0, 1,0, 5,0 e 10,0 kGy, em triplicata. Posteriormente, a quantificação da aflatoxina B₁ nas três concentrações de contaminação, foi executada em triplicata, obtendo-se então nove resultados para cada nível de irradiação e concentração de aflatoxina B₁.

Em amostras naturalmente contaminadas

As amostras preparadas no item 2.2.2 seguiram o seguinte esquema de irradiação gama:

Amostra 2 (84,0 $\mu\text{g.kg}^{-1}$): Controle (sem irradiação) e irradiada com 5,0 e 10,0 kGy. A irradiação em cada um dos níveis estudados foi efetuada em uma única amostra. As análises de quantificação de aflatoxina B₁ foram realizadas em triplicata;

Amostra 3 (258,3 $\mu\text{g.kg}^{-1}$): Controle (sem irradiação) e irradiada com 1,0, 5,0 e 10,0 kGy. A irradiação em cada um dos níveis estudados e as análises de aflatoxina B₁ foram efetuadas em triplicata.

Amostra 4 (248,0 $\mu\text{g.kg}^{-1}$) e Amostra 5 (86,0 $\mu\text{g.kg}^{-1}$): Controle (sem irradiação) e irradiadas com 15, 20, 25 e 30 kGy. A irradiação em cada um dos níveis estudados foi efetuada em uma única amostra. As análises de quantificação de aflatoxina B₁ foram realizadas em triplicata.

Quantificação de aflatoxina B₁

O método empregado foi o descrito por Valente Soares e Rodriguez-Amaya¹¹. A separação e identificação da aflatoxina B₁ foi realizada por cromatografia em camada delgada (CCD), em placas de sílica gel 60G, 20 x 20 cm (Merck) sem indicador fluorescente, com espessura de 0,25 mm, utilizando-se como fase móvel tolueno:acetato de etila:clorofórmio:ácido fórmico (70:50:50:20, v/v/v/v), recomendado por Gimeno¹². Os extratos das amostras para CCD foram ressuspensos em benzeno:acetonitrila (98:2), em volumes que variavam de 100 a 300 μL . Para aplicação na placa de cromatografia de camada delgada foram utilizados volumes que variaram de 2 a 10 μL . Para a elaboração das curvas de calibração foram utilizados volumes da solução padrão (item 2.3) na faixa de 2 a 10 μL , sempre com um mínimo de 4 pontos. A quantificação das aflatoxinas foi feita por medidas das intensidades das fluorescências dos spots das amostras e de padrões, em Densitômetro Shimadzu, modelo CS9301PC, com lâmpada de xenônio, em leitura linear, com feixe 0,4 x 5,0 mm e alta

sensibilidade de fluorescência. Os níveis de aflatoxina B₁ nas amostras foram calculados a partir das áreas dos picos das aflatoxinas referentes aos extratos das amostras e da solução padrão de aflatoxina B₁.

Delineamento experimental e análise estatística

O modelo estatístico foi dado em função do delineamento inteiramente casualizado, cujo método consiste em realizar análise de variância para identificar diferenças dos tratamentos (13). No experimento descrito no item 2.4.1, o esquema fatorial foi 4 doses de irradiação gama (0, 1, 5 e 10 kGy) e 3 concentrações de aflatoxina B₁, totalizando 12 tratamentos. Analogamente, no experimento descrito no item 2.4.2 foi utilizado o esquema fatorial somente nas amostras 4 e 5, constituindo 5 doses de irradiação gama (0, 15, 20, 25 e 30 kGy) e duas concentrações de aflatoxina B₁, totalizando 10 tratamentos. Em todos os experimentos efetuados os resultados foram avaliados pelo Teste F para constatar a presença de efeitos significativos ($p < 0,05$). Nestes casos foi aplicado o teste de Tukey para determinar as diferenças entre as médias e/ou a técnica de regressão. Foram utilizados os recursos do software estatístico SAS e SISVAR^{14,15}.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Destruição da aflatoxina B₁ em amostras artificialmente contaminadas e irradiadas

As concentrações obtidas de aflatoxina B₁ em amendoim artificialmente contaminado, a partir da fortificação da amostra 1 (item 2.2.1), foram 55,3, 105,8 e 159,3 $\mu\text{g.kg}^{-1}$. Após irradiação com ^{60}Co a 1,0, 5,0 e 10,0 kGy (item 2.4.1), os teores encontrados de aflatoxina B₁ e o resumo da análise de variância estão apresentados nas Tabelas 1 e 2.

Fixando o nível de significância em 5% (teste F), os resultados encontrados indicam que apenas os efeitos principais, doses ($p=0,0000$) e concentração ($p=0,000$), foram significativos, isto é, pelo menos uma das médias apresenta diferença significativa quando comparada com as demais. Convém salientar que a interação dose*concentração não foi significativa ($p=$

Tabela 1. Teores de Aflatoxina B₁ em amendoim *in natura* artificialmente contaminado em três concentrações, após irradiação, em triplicata com ^{60}Co a 0, 1, 5 e 10 kGy.

| Dose de irradiação (kGy) | Aflatoxina B ₁ ($\mu\text{g.kg}^{-1}$) | | |
|--------------------------|---|--------|---------|
| 0 | 55,3* | 105,8* | 159,3* |
| 1 | 43,4** | 91,4** | 135,4** |
| 5 | 39,6** | 85,0** | 132,6** |
| 10 | 39,0** | 82,1** | 131,2** |

*Médias de triplicata.

**Médias de triplicata em cada nível de irradiação da quantificação de aflatoxina B₁.

0,8700), o que leva a crer na ausência da dependência entre as concentrações de aflatoxina B₁ com as doses empregadas de irradiação gama.

Dessa forma, como não ficou comprovada a interação entre os fatores, efetuou-se o teste de Tukey, em nível de significância de 5% para os efeitos principais: dose de irradiação gama e concentração de contaminação de aflatoxina B₁ (Tabela 3).

Os resultados foram considerados para cada fator, independentemente do outro. Comparando-se as doses de irradiação, pode-se verificar que apenas a dose inicial (0 kGy) difere significativamente das demais (letra minúscula diferente), ao passo que doses de 1, 5 e 10 kGy apresentaram comportamento similar (letra minúscula igual). Em relação às concentrações de contaminação, as doses apresentaram médias diferenciadas (letras minúsculas diferentes). Pode-se observar que o aumento da dose de irradiação nas três concentrações de contaminação provocou aumento na redução do teor de aflatoxina B₁. Entretanto, mesmo a dose de irradiação a 10 kGy não foi capaz de eliminar totalmente a aflatoxina B₁.

Destruição da aflatoxina B₁ em amostras naturalmente contaminadas e irradiadas

Os resultados do efeito da irradiação gama (^{60}Co) na destruição da aflatoxina B₁, em amostras naturalmente contaminadas, 84,0 e 258,3 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, amostras 2 e 3, respectivamente (item 2.4.2), e os resumos das respectivas

Tabela 2. Análise de variância das respostas de contaminação em 3 concentrações de aflatoxina B₁ e 4 doses de irradiação gama (^{60}Co).

| Fonte de variação | GL. | Q.M. | p-valor |
|-------------------|-----|------------|---------|
| Concentração | 2 | 27233,7608 | 0,0000 |
| Dose | 3 | 971,5996 | 0,0000 |
| Concentração* | 6 | 29,8403 | 0,8700 |
| Dose | | | |
| Erro | 24 | 74,1427 | |
| Total | 35 | | |

Coefficiente de variação: 9,4%

análises de variâncias dos dados referentes aos efeitos dos tratamentos efetuados são apresentados nas Tabelas 4, 5, 6 e 7.

Observou-se que nas doses de 1, 5, e 10 kGy (Tabelas 4 e 6) praticamente não ocorreu destruição da aflatoxina B₁ em amostras naturalmente contaminadas, diferentemente das amostras artificialmente contaminadas, que apresentaram redução de cerca de 20% (Tabela 1). Esta diferença pode ser explicada pelo fato de a aflatoxina B₁, na amostra *in natura*, estar ligada a componentes naturais como as proteínas, conferindo proteção aos efeitos da irradiação gama. Da mesma forma, as interações dos radicais livres e moléculas ativas, produzidas durante o processo de irradiação, com a aflatoxina B₁ livre, como no caso das amostras fortificadas, devem acontecer de forma mais fácil e efetiva¹⁶.

A análise de variância mostrada na Tabela 5 evidencia estatisticamente que as doses de irradiação gama (5 e 10 kGy – Tabela 5) utilizadas para destruição da toxina na amostra avaliada, apresentaram o mesmo comportamento em relação à amostra não irradiada (0 kGy). Este fato foi constatado em virtude de a probabilidade do teste F (p= 0,824) ser superior a probabilidade 0,05, isto é, nível de significância. Da mesma forma, a análise de variância registrada na Tabela 7 mostra que não há diferença significativa entre as doses de irradiação gama utilizadas (1; 5 e 10 kGy – tabela 6) na destruição da aflatoxina B₁. Este fato foi observado em função de a probabilidade do teste F (p= 0,392) ser superior à probabilidade 0,05, isto é, nível de significância.

Os resultados do efeito da irradiação gama (^{60}Co) em doses de 0, 15, 20, 25 e 30 kGy na destruição da aflatoxina B₁, em amostras naturalmente contaminadas, 248,0 e 86,0 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, amostras 4 e 5, respectivamente (item 2.4.2), são mostrados nas Tabelas 8 e 9 e Figuras 1 e 2.

Fixando o nível de significância em 5%, os resultados encontrados na análise de variância indicaram que os efeitos principais, doses (p= 0,0000) e concentrações de contaminação (p=0,0000) foram significativos, isto é, pelo menos uma das médias apresenta diferença significativa quando comparada com as demais. No caso da interação dose*concentração, esta se mostrou significativa (p= 0,0000). Assim sendo, pode-se afirmar que as doses de irradiação apresentaram-se dependentes da concentração de aflatoxina B₁. Portanto, para melhor investigação tornou-se

Tabela 3. Efeitos médios de doses de irradiação gama (a) e de concentrações de contaminação de aflatoxina B₁ (b) na redução do nível de aflatoxina B₁. Teste de Tukey em nível de significância de 5%.

| Doses de irradiação gama (kGy) | Médias de aflatoxina B ₁ ($\mu\text{g.kg}^{-1}$) |
|--------------------------------|---|
| 10 | 84,1 b |
| 5 | 85,7 b |
| 1 | 90,0 b |
| 0 | 106,8 a |

(a)

| Concentrações de contaminação ($\mu\text{g.kg}^{-1}$) | Médias de aflatoxina B ₁ ($\mu\text{g.kg}^{-1}$) |
|---|---|
| 55,3 | 44,3 c |
| 105,8 | 91,0 b |
| 159,3 | 139,6 a |

(b)

Tabela 4. Teores de aflatoxina B₁ em amendoim naturalmente contaminado com 84,0 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (Amostra 2), após irradiação com ^{60}Co a 0; 5 e 10 kGy e análise em triplicata.

| Dose de Irradiação (kGy) | Aflatoxina B ₁ ($\mu\text{g.kg}^{-1}$) | Média ($\mu\text{g.kg}^{-1}$) | Coefficiente de Variação (%) |
|--------------------------|---|---------------------------------|------------------------------|
| 0 | 69,0 | 84,0 | 29,5 |
| | 71,0 | | |
| | 113,0 | | |
| 5 | 98,0 | 90,3 | 8,3 |
| | 90,0 | | |
| | 83,0 | | |
| 10 | 75,0 | 82,7 | 9,1 |
| | 83,0 | | |
| | 90,0 | | |

Tabela 5. Análise de variância para verificar o efeito da dose de irradiação gama (^{60}Co) na destruição de aflatoxina B₁ em amostra naturalmente contaminada (84,0 $\mu\text{g.kg}^{-1}$).

| Fonte de variação | GL. | Q.M. | p-valor |
|-------------------|-----|------|---------|
| Dose | 2 | 49 | 0,824 |
| Erro | 6 | 243 | |
| Total | 8 | | |

Coefficiente de variação: 18,2%

Tabela 6. Teores de aflatoxina B₁ em amendoim naturalmente contaminado com 258,3 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (Amostra 3) após irradiação, em triplicata, com ^{60}Co a 0; 1; 5 e 10 kGy.

| Dose de Irradiação (kGy) | Repetições | Aflatoxina B ₁ ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)* | Média Aflatoxina B ₁ ($\mu\text{g.kg}^{-1}$) | Coefficiente de Variação (%) |
|--------------------------|------------|--|---|------------------------------|
| 0 | A | 238,7 | 258,3 | 7,2 |
| | B | 259,0 | | |
| | C | 277,3 | | |
| 1 | A | 245,0 | 253,0 | 6,1 |
| | B | 265,7 | | |
| | C | 249,0 | | |
| 5 | A | 277,0 | 266,0 | 7,4 |
| | B | 274,7 | | |
| | C | 247,0 | | |
| 10 | A | 251,3 | 251,0 | 5,7 |
| | B | 245,3 | | |
| | C | 258,3 | | |

* Médias de três determinações

Tabela 7. Análise de variância para verificação do efeito da dose de irradiação gama (^{60}Co) na destruição de aflatoxina B₁ em amostra naturalmente contaminada (258,3 $\mu\text{g.kg}^{-1}$).

| Fonte de variação | GL. | Q.M. | p-valor |
|-------------------|-----|------|---------|
| Dose | 3 | 384 | 0,392 |
| Erro | 32 | 373 | |
| Total | 35 | | |

Coefficiente de variação: 7,5%

Tabela 8. Teores de aflatoxina B₁ em amendoim naturalmente contaminado com 248 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (amostra 5), após irradiação com ^{60}Co a 0, 15, 20, 25 e 30 kGy.

| Dose(kGy) | Repetições | Aflatoxina B ₁ ($\mu\text{g.kg}^{-1}$) | Média($\mu\text{g.kg}^{-1}$)* | Coefficiente de Variação (%) |
|-----------|------------|---|---------------------------------|------------------------------|
| 0 | A | 268 | 248a | 8,3 |
| | B | 227 | | |
| | C | 249 | | |
| 15 | A | 84 | 75b | 12,1 |
| | B | 68 | | |
| | C | 71 | | |
| 20 | A | 84 | 69b | 19,3 |
| | B | 58 | | |
| | C | 66 | | |
| 25 | A | 70 | 69b | 3,6 |
| | B | 72 | | |
| | C | 67 | | |
| 30 | A | 67 | 78b | 18,2 |
| | B | 94 | | |
| | C | 73 | | |

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

necessário a realização do desdobramento das dosagens de irradiação dentro de cada concentração de aflatoxina B₁.

Considerando-se o nível de significância em 5%, os resultados encontrados evidenciam que para cada concentração de aflatoxina B₁ as doses de irradiação apresentaram comportamento diferenciado, conforme mostrado nos modelos quadráticos (Figura 3).

Conforme observado, os modelos ajustados estão adequados aos dados experimentais. Este fato foi comprovado mediante o alto valor do R² verificado em ambas as concentrações de contaminação, ou seja, próximo a 100%. Observou-se, nos modelos acima, que a maior concentração de aflatoxina B₁ ocasionou resposta maior após irradiação da amostra. Notou-se também que à medida que as doses de irradiação gama aumentavam, houve redução na resposta de teor de aflatoxina B₁. Esta redução foi mais acentuada para a maior concentração de aflatoxina B₁.

A aplicação de doses maiores de irradiação gama (15, 20, 25 e 30 kGy), em amostras naturalmente contaminadas com 5-6% de umidade, conferiu redução de aflatoxina B₁ na faixa de 49 a 72% (Figuras 1 e 2). Esses resultados estão em desacordo com os obtidos por Aziz e Youssef¹⁷. Esses autores, no único trabalho descrito em literatura sobre o assunto, conseguiram redução da aflatoxina B₁, em amendoim *in natura*, de 45% na dose de 5 kGy, 82-88% com 10 kGy e 100% com 20 kGy. Deve-se registrar que nesse trabalho foi utilizada amostra com concentração de 27,0 µg.kg⁻¹ de aflatoxina B₁ e que os autores não mencionaram o nível de umidade da amostra irradiada. Sabe-se que quanto maior o teor de água do grão, mais efetivo é o processo de irradiação. O processo de radiólise da água forma maior número de radicais livres e de outras espécies iônicas e excitadas, aumentando os efeitos indiretos da irradiação^{18,19}.

Outra possível explicação para a irradiação gama não ser totalmente efetiva seria o pequeno tamanho da molécula da

Tabela 9. Teores de aflatoxina B₁ em amendoim naturalmente contaminado com 86 µg.kg⁻¹ (Amostra 6), após irradiação com ^{60}Co a 0, 15, 20, 25 e 30 kGy.

| Dose(kGy) | Repetições | Aflatoxina B ₁ (µg.kg ⁻¹) | Média(µg.kg ⁻¹)* | Coefficiente de Variação (%) |
|-----------|------------|--|------------------------------|------------------------------|
| 0 | A | 94 | 86 ^a | 17,4 |
| | B | 96 | | |
| | C | 69 | | |
| 15 | A | 42 | 44 ^b | 9,1 |
| | B | 52 | | |
| | C | 39 | | |
| 20 | A | 38 | 35 ^b | 5,2 |
| | B | 35 | | |
| | C | 32 | | |
| 25 | A | 29 | 29 ^b | 3,9 |
| | B | 29 | | |
| | C | 31 | | |
| 30 | A | 30 | 33 ^b | 13,2 |
| | B | 31 | | |
| | C | 38 | | |

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

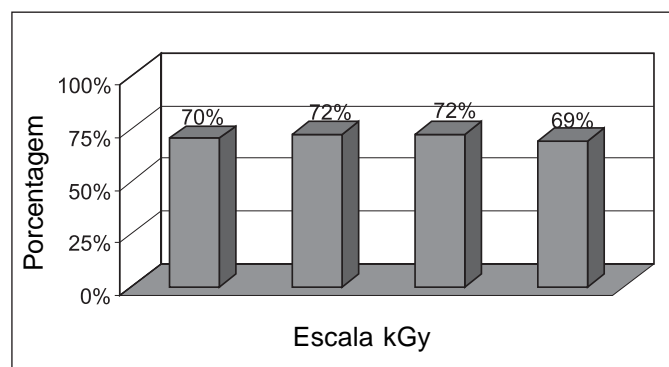


Figura 1. Porcentagem média de redução de aflatoxina B₁ - 248 µg.kg⁻¹ - em função da dose de irradiação.

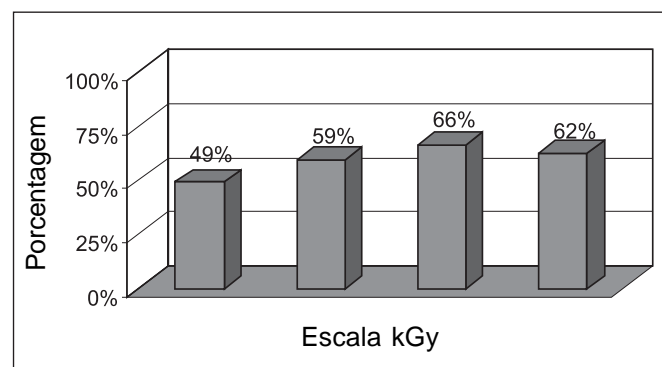


Figura 2. Porcentagem média de redução de aflatoxina B₁ - 86 µg.kg⁻¹ - em função da dose de irradiação.

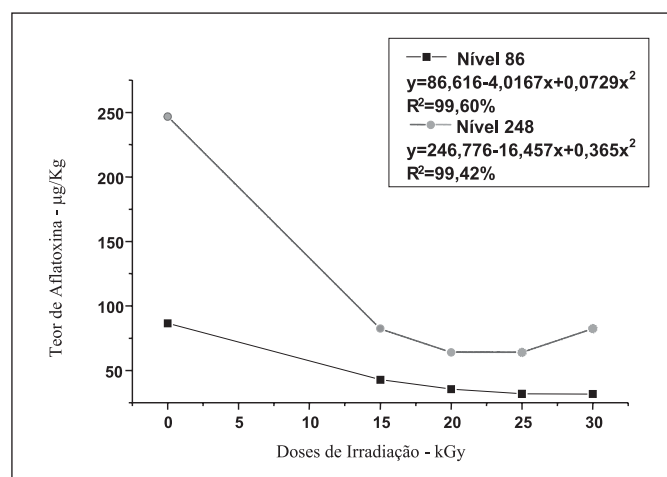


Figura 3. Modelos quadráticos para as doses de irradiação na concentração alta e baixa de aflatoxina.

aflatoxina B₁ (peso molecular 312 g). Sabe-se que a sensibilidade à irradiação gama é proporcional ao seu peso molecular. Uma molécula de DNA, por exemplo, é mais sensível que a de um aminoácido¹⁹. Além disso, o amendoim apresenta elevado teor de proteínas e lípidos (50% de gordura e 22-30% de proteína). Essas moléculas teriam maior probabilidade (efeito competição) de sofrer ação direta e indireta das radiações ionizantes, durante o processo de irradiação, que a aflatoxina B₁^{19,20,21}.

Desde que não foi observada diferença significativa, em nível de 5 % de probabilidade, entre o percentual de destruição de aflatoxina B₁ e as doses de 15, 20, 25 e 30 kGy, sugere-se que seja aplicada a dose de 15 kGy para amendoim *in natura* contaminado com aflatoxina B₁, com o objetivo de reduzir níveis elevados de contaminação. Entretanto, a estabilidade do óleo de amendoim e a qualidade do produto devem ser avaliadas pelo monitoramento dos valores de ácido tiobarbitúrico e do índice de peróxido. Chiou et al. observaram um ligeiro aumento desses parâmetros quando dose de 15 kGy foi aplicada em amendoim em grão²².

CONCLUSÕES

Doses de irradiação gama (^{60}Co) até 10 kGy não foram suficientes para destruir aflatoxina B₁ em amostras naturalmente contaminadas. Estas mesmas doses, entretanto, destruíram cerca de 20% da aflatoxina B₁ em amostras artificialmente contaminadas.

Doses de irradiação gama (^{60}Co) de 15, 20, 25 e 30 kGy destruíram a aflatoxina B₁ em amostras naturalmente contaminadas, em percentual que variou de 49 a 72%.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro e

a Indústria de Alimentos Santa Helena (Ribeirão Preto - São Paulo) pelas amostras utilizadas nesta pesquisa.

REFERÊNCIAS

1. Council for Agricultural Science and Technology - CAST. Mycotoxins: economics and health risks. Ames, Iowa: Council for Agricultural Science and Technology, 2003. Task Force Report 139.
2. Bhat RV. Mould deterioration of agricultural commodities during transit: problems faced by developing countries. *Int J Food Microbiol* 1988; 7: 219-25.
3. Rodriguez-Amaya B, Sabino M. Mycotoxin research in Brazil: The last decade in review. *Braz J Microbiol* 2002; 33: 1-14.
4. Hernandez NK, Vital HC, Sabaa-Srur UO. Irradiação de alimentos: vantagens e limitações. *Bol SBCTA* 2003; 37: 154-9.
5. Verruma-Bernardi MR, Spoto MHF. Efeito da radiação gama sobre o perfil sensorial de suco de laranja. *Ciênc Tecnol Aliment* 2003; 23: 28-32.
6. Worcman-Barninka D, Landgraf M. Irradiação de carnes. *Bol SBCTA* 2003; 37: 22-7.
7. Del Mastro NL. Alimentos esterilizados para uso em hospitais e rações alimentares. *Rev Bras Pes Des* 1999; 2: 4.
8. Giroux M, Lacroix M. Nutritional adequacy of irradiated meat - a review. *Food Res Int* 1998; 31: 257-64.
9. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 21, de 26 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento para irradiação de alimentos. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, 29 jan. 2001.
10. Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of the AOAC International. 16. ed. Gaithersburg: AOAC International, 1997.
11. Valente Soares LM, Rodriguez-Amaya DB. Survey of aflatoxins, ochratoxins A, zearalenone, and sterigmatocystin in some brazilian foods by using multi-toxin thin-layer chromatographic method. *J Assoc Off Anal Chem* 1989; 72: 22-5.
12. Gimeno A. Thin layer chromatographic determination of aflatoxins, ochratoxins, sterigmatocystin, zearalenone, citrinin, T-2 toxin, diacetoxyscirpenol, penicillic acid, patulin and penitrem A. *J Assoc Off Anal Chem* 1979; 62: 579-85.
13. Sampaio MBI. Estatística aplicada à experimentação animal. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998. 221 p.
14. SAS Institute. Users guide: statistics. 1989-1996. Version 6.11. System for Windows. Edition. Cary North Carolina, 1996.
15. Ferreira DF. Sistema de análise estatística - SISVAR. Lavras: UFLA, 2000.
16. Samarajeewa U, Sen AC, Cohen MD, Wei CI. Detoxification of aflatoxins in foods and feeds by physical and chemical methods. *J Food Prot* 1990; 53: 489-01.
17. Aziz NH, Youssef BM. Inactivation of naturally occurring of mycotoxins in some egyptian foods and agricultural commodities by gamma irradiation. *Egypt J Food Sci* 2002; 30: 167-77.
18. Relá PR. Cresce uso de irradiação para conservação de alimentos. *Rev Eng Alim* 2000; 29: 26-9.
19. Landgraf M. Controle do desenvolvimento microbiano nos alimentos. In: Melo Franco BDG, Landraf M. *Microbiologia dos alimentos*. São Paulo: Ed Atheneu; 2003. p. 109-48.
20. Azeredo GA, Bruno RLA, Souza AP, Silva A, Bruno GB, Queiroga VP. Qualidade fisiológica de sementes armazenadas de amendoim. *Rev. Ceres* 2003; 50: 127-41.
21. Fagundes MH. Sementes de amendoim: alguns comentários. 2002 (acesso em: 6 maio 2004). Disponível em: <http://www.conab.gov.br>..
22. Chiou RYY, Lin CM, Shyu SL. Property characterization of peanut kernels subjected to gamma irradiation and its effect on the outgrowth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *J Food Sci* 1990; 55: 210-3.

Otimização de metodologia por CCD para determinação de aflatoxina M₁ em leite de cabra e investigação de sua ocorrência no Estado da Bahia

Optimization of methodology by TLC for determining aflatoxin M₁ in goat's milk and investigation of its occurrence in the State of Bahia

RIALA6/1039

Mariana B. BOTURA¹, Monica M.S. SIMAS¹, Myrna SABINO², Maria José M. BATATINHA^{1*}

* Endereço para correspondência: Escola de Medicina Veterinária /UFBA. Av. Adhemar de Barros, 500, 40170-110, Ondina, Salvador-Bahia; e-mail: mjmb@ufba.br

¹ Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal da Bahia

² Instituto Adolfo Lutz-SP

Recebido: 26/09/2005 – Aceito para publicação: 28/12/2005

RESUMO

A aflatoxina M₁ (AFM₁) é um produto da biotransformação da aflatoxina B₁, a qual é excretada no leite de animais que ingerem alimentos contaminados. Os objetivos deste trabalho foram otimizar o método por cromatografia em camada delgada (CCD) para análise de AFM₁ em leite de cabra e avaliar sua ocorrência no Estado da Bahia. Foram coletadas 100 amostras de leite em cinco propriedades, localizadas na região do Recôncavo Baiano, durante o período de novembro de 2000 a agosto de 2002. A AFM₁ foi determinada no leite por meio de método de CCD conforme Sabino et al. (1989) modificado com a utilização de acetato de chumbo na fase de purificação para promover a precipitação de proteínas do substrato, possibilitando a visualização da AFM₁ na placa cromatográfica. Os limites de detecção e quantificação obtidos pela técnica modificada foram de 0,2 e 0,5 µg/L, respectivamente, com percentual de recuperação de 89,6% e coeficiente de variação igual a zero. Estes resultados revelaram que esta metodologia mostrou-se eficiente para a determinação de AFM₁ em leite caprino. Em todas as amostras analisadas não foi detectada a presença de AFM₁, demonstrando a boa qualidade deste produto quanto à contaminação por esta toxina.

Palavras-Chave: aflatoxina M₁, leite caprino, metodologia por CCD, ocorrência.

ABSTRACT

Aflatoxin M₁ (AFM₁) is a biotransformation product from aflatoxin B₁, which is excreted in milk from animals that ingest contaminated foodstuff. The objectives of this study were to improve the thin layer chromatography (TLC) technique for analyzing AFM₁ in goat milk, and to evaluate its occurrence in samples from State of Bahia. One hundred raw milk samples were collected from five farms, located at the Recôncavo Baiano, during the period from November 2000 to August 2002. Milk samples were analyzed for determining aflatoxin M₁ by means of TLC technique (Sabino et al. 1989) with some modifications. For that, lead acetate was employed during the purification process in order to precipitate proteins found in substrate, and allowed the visualization of AFM₁ on chromatography plate. By means of modified TLC technique the detection and quantification limits of aflatoxin M₁ were of 0.2 and 0.5 µg/L, respectively. The percentage of recoveries average and coefficient of variation for AFM₁ detection were 89.6 e 0%, respectively. These results revealed that this technique was efficient for determining AFM₁ in goat milk. AFM₁ was not detected in any of the analyzed samples, demonstrating the good quality of these products regarding to contamination by this toxin.

Key Words. aflatoxin M₁, goat milk, TLC technique, occurrence.

INTRODUÇÃO

O efetivo de caprinos leiteiros do Brasil representa o oitavo maior rebanho do mundo¹. Atualmente, a produção nacional de leite de cabra é estimada em 7.920.000 litros, sendo que 45,4% desta produção concentram-se na região Nordeste². Devido ao seu alto valor nutricional, excelente digestibilidade e baixo potencial alergênico, o leite de cabra vem sendo bastante utilizado na alimentação humana, especialmente de crianças, idosos e indivíduos portadores de alergia ao leite bovino³.

O leite de cabra é composto principalmente de gordura, proteínas, açúcares, vitaminas e sais minerais. Sua composição média é comparável à do leite de vaca, apresentando um teor de gordura e proteínas ligeiramente mais elevado. As cinco principais proteínas do leite de cabra são β -lactoglobulina, α -lactoalbumina, κ -caseína, β -caseína, α ₂-caseína, as quais têm grande semelhança com seus homólogos no leite de vaca, embora algumas variações na composição e seqüências de aminoácidos destas proteínas têm sido observadas. O leite de ambas as espécies contem níveis similares de β -lactoglobulina, enquanto que o leite caprino apresenta um nível bastante reduzido de α ₁ caseína e aproximadamente o dobro da quantidade de α ₂-caseína e α -lactoalbumina encontrada no leite bovino⁴.

O êxito comercial da produção de leite, a nível nacional e internacional, está diretamente relacionado ao monitoramento da qualidade do produto. Nesse sentido, dentre outros agravantes, a presença de resíduos de micotoxinas, particularmente aflatoxinas no leite, representa um dos mais sérios problemas no controle de qualidade alimentar, consistindo em fonte potencial de risco à saúde pública⁵.

A aflatoxina M₁ (AFM₁) é um produto da biotransformação da aflatoxina B₁ (AFB₁), excretada no leite de mamíferos que ingerem alimentos contaminados por esta toxina⁶. Apesar deste metabólito apresentar menor toxicidade quando comparado com o seu precursor, também tem sido referido como agente mutagênico e carcinogênico⁷.

A ocorrência de AFM₁ tem sido observada em leite de búfalos⁸, caprinos^{9,10}, bovinos^{11,12}, ovinos¹³ e humano¹⁴. No Brasil, os estudos têm demonstrado a presença desta toxina principalmente no leite de bovinos^{15,16} e humano¹⁷, e até o momento, nenhum relato científico sobre o monitoramento de AFM₁ em leite caprino tem sido descrito.

A análise de AFM₁ em leite é geralmente realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)^{18,19}, sendo o método de cromatografia em camada delgada (CCD) também recomendado para laboratórios que não dispõem deste equipamento^{20,21}. Entretanto, os relatos científicos sobre a determinação desta toxina em leite de cabra, empregando este último método são escassos^{22,8}.

O presente trabalho teve como objetivos otimizar o método de cromatografia em camada delgada (CCD) para análise de AFM₁ em leite de cabra, e verificar a ocorrência desta toxina em leite caprino no estado da Bahia.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta das amostras

Foram realizadas quatro coletas de leite em cinco propriedades de caprinos leiteiros, localizadas no Recôncavo Baiano (municípios de Amélia Rodrigues, Camaçari, Feira de Santana e Simões Filho), durante o período de novembro/2000 a julho/2002. A escolha das propriedades foi estabelecida em função da maior concentração de caprinos leiteiros encontrada nesta região, enquanto que o período das coletas foi determinado de acordo com as condições de manejo relacionadas às épocas de produção de leite dos animais, sendo portanto realizadas em novembro/2000, fevereiro/2001, fevereiro/2002 e julho/2002. Em cada propriedade e por coleta, foram obtidas quatro amostras individuais (150 mL cada) dos animais de maior produção de leite e uma amostra (1L) constituída do *pool* de leite de todos os animais em lactação, perfazendo um total de 100 amostras.

Todas as coletas foram realizadas no período da tarde, durante a segunda ordenha do dia. As amostras foram acondicionadas em frascos de vidro, envoltos em papel alumínio, e em seguida transportadas para o laboratório de Toxicologia da Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal da Bahia, sendo mantidas sob congelamento, à temperatura de -20°C, até o momento da análise.

Questionários foram aplicados para obtenção de informações sobre o manejo do rebanho, origem e composição da ração, duração e condições de estocagem da ração e utilização de antifúngicos nas propriedades.

Preparação da solução padrão de AFM₁

O padrão de AFM₁ (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) foi diluído em benzeno: acetonitrila (9:1), conforme a metodologia 971.22 descrita pela AOAC²³.

Otimização do método analítico

A otimização do método de CCD para análise de AFM₁ em leite descrito por Sabino et al.²⁴ foi realizada na fase de purificação do extrato, na qual, foi incluída uma etapa de precipitação de proteínas. Para tanto, após a extração com metanol e obtenção do filtrado, aproximadamente 5 mL de uma solução saturada de acetato de chumbo, foi lentamente adicionada a este filtrado, até a completa precipitação das proteínas, procedendo-se em seguida, a centrifugação (3000 x g) durante 10 minutos. Nesta modificação do método, as quantidades da amostra de leite e dos solventes empregadas na fase de extração foram proporcionalmente reduzidas à metade (Figura 1).

A eficiência do método proposto foi avaliada através da obtenção de seus limites de detecção, quantificação, percentual de recuperação e coeficiente de variação. O limite de detecção corresponde à concentração mínima da substância medida e declarada com 95% ou 99% de confiança de que a concentração do analito é maior que zero, enquanto o limite de quantificação é a menor concentração do analito que pode ser determinada

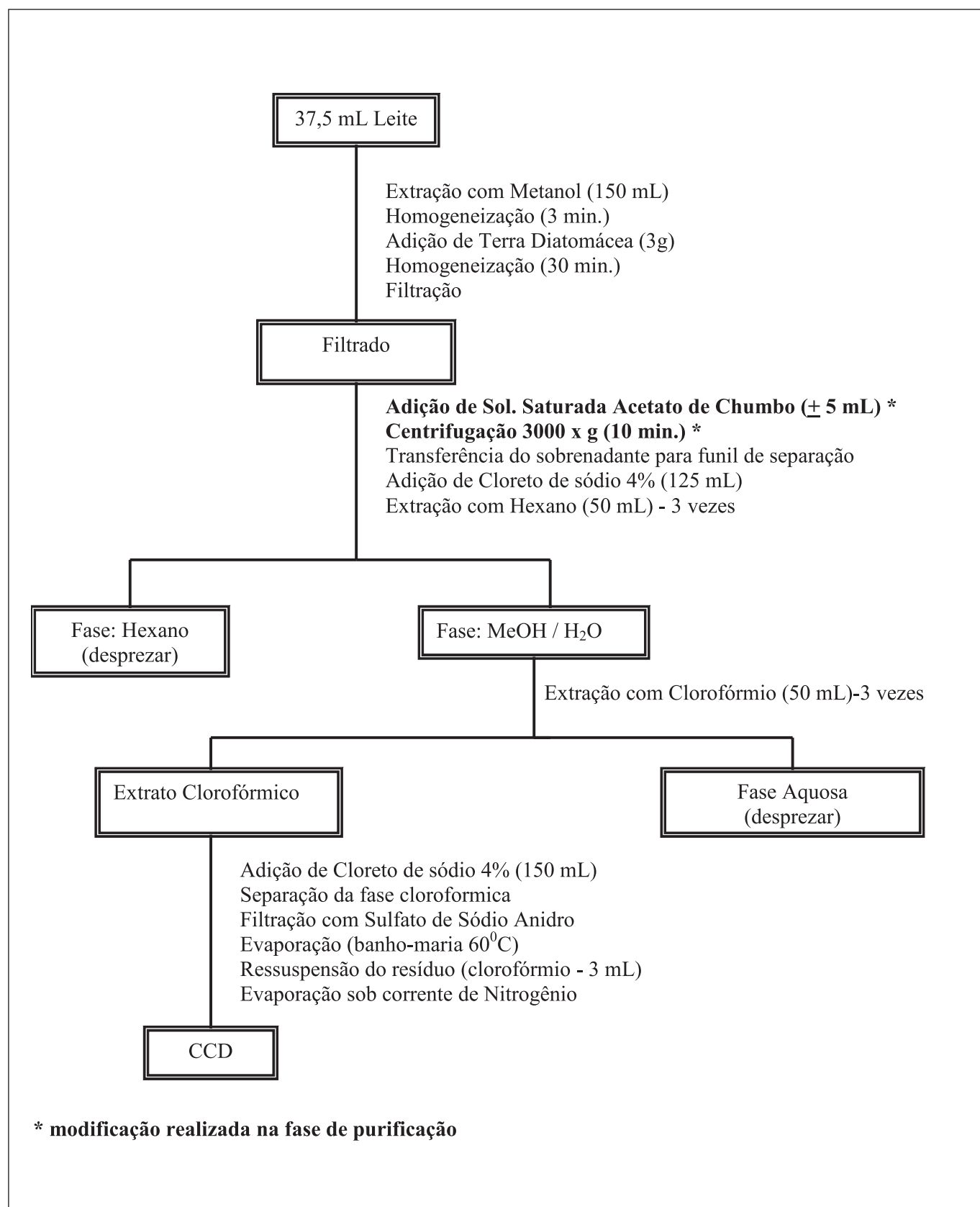


Figura 1. Esquema de extração e purificação da amostra de leite de cabra pelo método SABINO et al. (1989) modificado para a determinação de AFM₁

com um nível aceitável de precisão e exatidão²⁵. Para a determinação dos limites de detecção, quantificação e percentual de recuperação do método, amostras, em que não foram detectadas AFM₁, foram artificialmente contaminadas sequencialmente com níveis de 0,2; 0,3 e 0,5 µg/L de AFM₁. Para cada nível de contaminação foram realizadas três repetições. O percentual de recuperação foi obtido pela diferença entre o valor real (valor inicial adicionado na amostra – 0,5µg/L) e o valor observado na análise, ou seja, valor da leitura do extrato desta amostra na cromatofolha, conferindo a exatidão do método. A precisão da metodologia foi avaliada pelo coeficiente de variação (CV) obtido em condições de repetibilidade.

Análise de AFM₁ em leite caprino

Das 100 amostras de leite coletadas, 80 foram analisadas pelo método de CCD segundo Sabino et al.²⁴ e 20 avaliadas por este mesmo método acrescido das modificações descritas no item anterior. Para a detecção e a quantificação da AFM₁, as cromatofolhas de sílica gel G 60 (Art.1.05553, Merk, Alemanha) foram submetidas a um desenvolvimento unidimensional, ao abrigo da luz, utilizando-se como fase móvel a mistura clorofórmio-acetona-álcool isopropílico (85:10:5).

Estas cromatofolhas foram examinadas em câmara escura sob luz ultravioleta de ondas longas (366nm), e a quantificação da AFM₁, efetuada através da comparação visual das intensidades de fluorescência entre os pontos da solução padrão (1, 3, 5 e 7 µL) e aqueles referentes ao extrato da amostra.

A confirmação da identidade química da AFM₁ foi realizada através da reação com ácido sulfúrico (método 975.37 AOAC²³) e por cromatografia em camada delgada bidimensional, utilizando-se clorofórmio – acetona – álcool isopropílico (85:10:5) e éter-metanol - hexano - água (85: 4: 5:1), como primeira e segunda fases móveis, respectivamente.

Dados climáticos

As informações climáticas referentes à temperatura mínima, média e máxima, precipitação pluviométrica e umidade relativa do ar dos municípios estudados foram fornecidas pelo Instituto Nacional de Meteorologia do Estado da Bahia (INMET-BA).

Análise estatística

A avaliação das variáveis climáticas das microrregiões estudadas e a sua influência sobre a presença de AFM₁ nas amostras de leite de cabra foi realizada através da Análise de Variância Univariada utilizando-se o programa estatístico SPSS (versão 10.1).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A utilização do método de Sabino et al.²⁴ para a análise de AFM₁ em leite de cabra, mostrou resultados não satisfatórios, uma vez que, os extratos obtidos apresentavam muitos interferentes, que dificultavam a visualização da AFM₁ após a

contaminação da amostra para a obtenção do percentual de recuperação, ou quando a solução padrão de AFM₁ era aplicada sobre o extrato na placa cromatográfica (Figura 2). Os relatos de utilização deste método têm sido referidos para análise de AFM₁ em leite de vaca^{24,26}; no entanto, nenhuma referência sobre sua adequação para a análise desta toxina em leite de cabra tem sido descrita.

Estes resultados sugerem que as diferenças na composição química entre o leite caprino e bovino podem interferir na eficiência do método analítico. O leite de cabra apresenta teor de gordura e proteína ligeiramente mais elevado quando comparado com o leite de vaca, contendo um nível bastante reduzido de α_{s1} caseína e aproximadamente o dobro da quantidade de β-caseína e α-lactoalbumina encontrada no leite bovino. Devido a estas diferenças, a sedimentação por centrifugação da caseína do leite caprino é menor do que em leite de vaca. Além disso, diferenças na composição e seqüências de aminoácidos, que compõe estas proteínas, entre os dois tipos de leite têm sido verificadas⁴.

A otimização do método através da utilização de acetato de chumbo associado à centrifugação do extrato metanólico do leite, objetivando a precipitação das proteínas contidas no mesmo, resultou na obtenção de extratos mais limpos que permitiram uma melhor visualização da toxina sob a luz ultravioleta (Figura 3), quando comparados aos resultados obtidos com a utilização do método original (Figura 2). A utilização de acetato de chumbo para precipitação de proteínas tem sido recomendada em diferentes metodologias para a análise de aflatoxina em leite^{20,27}. Entretanto, Sylos e Rodriguez-Amaya²⁸ relataram que o uso deste produto a 20% não foi eficiente na remoção de constituintes indesejáveis em leite de vaca, uma vez que, os extratos obtidos apresentavam manchas com caudas e interferentes, quando aplicados sobre placas de CCD.

A redução das quantidades do substrato (leite) e solventes empregados na modificação do método durante a fase de extração pode também contribuir para a redução dos custos da análise de AFM₁ em leite de cabra.

As modificações realizadas no método descrito por Sabino et al.²⁴, ainda permitiram a obtenção de um bom percentual de recuperação da toxina (89,6%), com coeficiente de variação igual à zero. Estes resultados indicam que a otimização do método mostrou-se adequada para a determinação de AFM₁ em leite caprino, uma vez que atendem aos critérios adotados pela CE²⁹ e Horwitz et al.³⁰, que estabelecem valores de 60 a 120% como percentuais de recuperação aceitáveis e 25% como valor máximo de coeficiente de variação para níveis de contaminação entre 0,01 a 0,5 µg/L.

Os limites de detecção e quantificação, do método modificado para a determinação de AFM₁ em leite de cabra, foram de 0,2 e 0,5 µg/L, respectivamente. O limite de detecção do método descrito por Sabino et al.²⁴ foi de 0,5 µg/L para a análise de AFM₁ em leite de vaca. No entanto, os autores não fazem referência sobre o limite de quantificação, percentual de

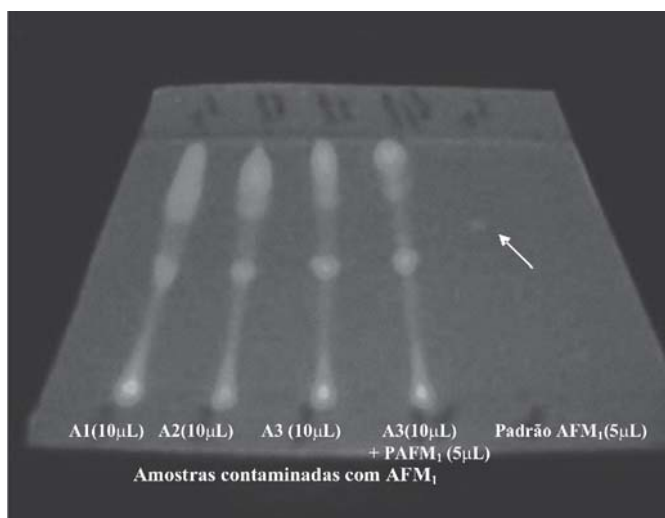


Figura 2. Cromatograma obtido por CCD de amostras de leite caprino contaminadas artificialmente com AFM₁ (0,5mg/L) e analisadas pelo método descrito por Sabino *et al.* (1989)

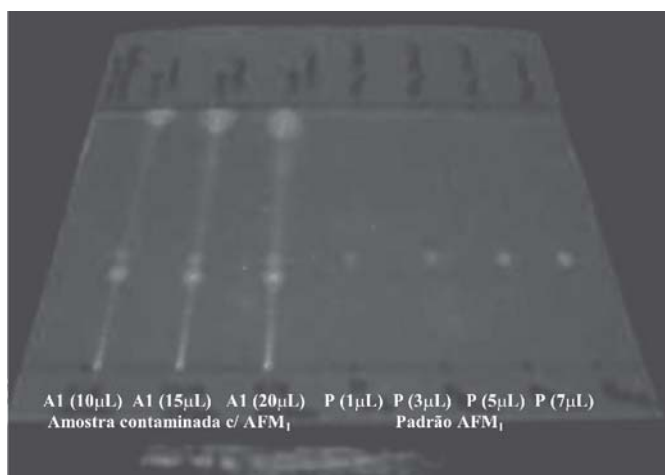


Figura 3. Cromatograma obtido por CCD de amostras de leite caprino contaminadas artificialmente com AFM₁ (0,5mg/L) e analisadas pelo método descrito por Sabino *et al.* (1989) modificado

recuperação e coeficiente de variação. Limites de quantificação de 0,02 e 0,3 µg/L foram obtidos, respectivamente, pela associação de colunas de imunoafinidade e realização de pequenas modificações na fase de extração do método de CCD para a análise de AFM₁ em leite de vaca²¹.

Os resultados da análise de AFM₁ nas amostras de leite de cabra avaliadas pelo método Sabino *et al.*²⁴ ou pela técnica modificada não revelaram a presença desta toxina, e isto provavelmente decorreu da utilização de rações de boa qualidade, cujo acondicionamento era realizado em tonéis de plástico tampados, mantidos em depósitos em bom estado de conservação e arejados e por um curto período (8 a 15 dias). A ausência de AFM₁ em todas as amostras de leite avaliadas teve correlação direta com estudos paralelos, que também não

evidenciaram a ocorrência de AFB₁ nas rações ingeridas pelos animais durante o mesmo período experimental.

A AFM₁ é um produto da biotransformação da AFB₁, a qual é excretada no leite de animais que ingerem alimentos contaminados por esta toxina^{6,7}. Investigações científicas sobre a excreção da AFM₁ em leite de cabra, revelam taxas de eliminação entre 0,45 a 3,67%^{31,32,33}, podendo ocorrer variação destes níveis entre os animais, ordenhas e fases de lactação³⁴.

Em todas estas propriedades estudadas predominava o sistema de criação semi-intensivo e intensivo, com regime alimentar semelhante, constituído de volumoso, ração e suplemento mineral. A ração era fornecida duas vezes ao dia para os animais em lactação, em quantidades diárias variáveis de 300 a 700g/animal, a depender da produção de leite do rebanho.

Nossos resultados revelaram que, apesar da AFM₁ não ter sido detectada no leite, nem a AFB₁, avaliada em estudos paralelos, ter sido encontrada nas rações destes animais, observou-se predominância de condições climáticas favoráveis ao desenvolvimento fúngico e conseqüente produção de aflatoxinas, tais como temperatura média em torno de 25°C e umidade relativa do ar acima de 70% (Tabela 1), condições estas, correlatas com a literatura^{35,36}.

A análise dos fatores climáticos revelou que não houve diferença significativa dos índices de temperatura (mínima, média e máxima) e umidade relativa do ar entre as microrregiões das propriedades em estudo, embora valores significativamente elevados de precipitação pluviométrica tenham sido observados nas propriedades B e C (Tabela 1).

Os maiores índices de temperatura mínima média e máxima ocorreram nos períodos das 2^a. e 3^a. coletas enquanto que os níveis de precipitação pluviométrica e umidade relativa do ar foram significativamente mais altos durante a 1^a. e 4^a. coletas (Tabela 1).

As variações dos fatores climáticos não tiveram influência sobre a presença de AFM₁ nas propriedades estudadas. Corrêa *et al.*²⁶ também não verificaram a presença de AFM₁ em amostras de leite de vaca coletadas em diferentes estações climáticas. Entretanto, diversos estudos têm demonstrado uma tendência sazonal na contaminação do leite de diferentes espécies animais por AFM₁, e a maior incidência, geralmente ocorre durante o inverno, quando os animais são alimentados principalmente com concentrados^{5,10,12,34}. Neste estudo, o manejo alimentar dos animais não sofreu modificações durante todo período experimental.

Estudos realizados por Martins *et al.*²² em Portugal e por Tiwari e Chauhan⁸ na Índia, também não evidenciaram a presença de AFM₁ em amostras de leite de cabra analisadas. Entretanto, esta ocorrência tem sido verificada no leite destes animais na Alemanha³⁷, Itália⁹ e Grécia¹⁰, em percentuais variáveis de 30 a 53,5%, das amostras analisadas, e em níveis de contaminação inferiores a 0,05µg/L, limite permitido pela legislação da Comunidade Européia. A presença de AFM₁ em amostras de queijos produzidos com leite caprino provenientes

Tabela 1. Médias dos fatores climáticos medidos nas propriedades produtoras de leite caprino durante o período das coletas

| Fatores Climáticos | Propriedade | | | | | Coletas | | | |
|----------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------------------|-------------------|--------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | A | B | C | D | E | 1 ^a . | 2 ^a . | 3 ^a . | 4 ^a . |
| Temperatura mínima (°C) | 20,5 ^a | 20,6 ^a | 20,6 ^a | 20,1 ^a | 20,1 ^a | 20,6 ^A | 20,8 ^A | 21 ^B | 19,3 ^C |
| Temperatura média (°C) | 25 ^a | 24,9 ^a | 24,9 ^a | 24,5 ^a | 24,5 ^a | 25,1 ^A | 25,7 ^B | 25,6 ^B | 22,7 ^C |
| Temperatura máxima (°C) | 30,2 ^a | 30 ^a | 30 ^a | 30 ^a | 30 ^a | 30,6 ^A | 31,5 ^B | 31,1 ^C | 26,9 ^D |
| Precip. pluviométrica (mm) | 96,3 ^{ab} | 106,7 ^a | 106,7 ^a | 72,8 ^b | 72,8 ^b | 122,9 ^A | 49,6 ^B | 63,7 ^B | 128 ^A |
| Umidade relativa (%) | 78,7 ^a | 79,7 ^a | 79,7 ^a | 77,2 ^a | 77,2 ^a | 77 ^A | 73,8 ^B | 75,4 ^C | 88 ^D |

* Letras minúsculas comparam os valores nas linhas entre as propriedades e letras maiúsculas os valores nas coletas (p<0,05)

da Espanha e Itália, em níveis variáveis de 0,019 a 200µg/kg, também tem sido relatada por Barrios et al.³⁸ e Finoli e Vecchio⁹, respectivamente.

No Brasil, a ocorrência de AFM₁ tem sido verificada principalmente em leite bovino, evidenciando níveis de contaminação superiores a 0,5µg/L^{15,16,24}, limite estabelecido pela legislação brasileira³⁹, e no leite humano, embora em baixa concentração (0,024µg/L)¹⁷. O presente estudo representa o primeiro relato científico sobre o monitoramento de AFM₁ em leite de cabra no país.

AGRADECIMENTOS

À FAPESB e Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação (UFBA) pelo auxílio financeiro.

Ao PROCES e CAPES pela bolsa de Mestrado concedida.

REFERÊNCIAS

1. FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). Global Livestock Production and Health Atlas, 2003. [http://www.fao.org/ag/aga/glipha/index.jsp]. 04 de agosto de 2005.
2. Costa AL. Leite caprino: um novo enfoque de pesquisa, 2003. [http://www.cnpc.embrapa.br/artigo-4.htm]. 03 de agosto de 2005.
3. Ribeiro ELA, Ribeiro HJSS. Uso nutricional e terapêutico do leite de cabra. *Semina* 2001; 22 (2): 229-35.
4. Jenness R. Composition and characteristics of goat milk: review 1968-1979. *J Dairy Sci* 1980; 63 (10): 1605-30.
5. Galvano F, Galafaro V, Galvano G. Occurrence and stability of aflatoxin M₁ in milk and milk products: a worldwide review. *J Food Prot* 1996; 59 (10): 1079-90.
6. CAST (Council of Agricultural Science and Technology). Mycotoxins: risks in plant, animal and human systems. Task Force Report, n.139. EUA: CAST; 2003.
7. Creppy EE. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicol Lett* 2002; 127:19-28.
8. Tiwari V, Chauhan RKS. Aflatoxin detection in milk samples of cattle. *Sci Lett* 1991; 14 (10): 391-2.
9. Finoli C, Vecchio A. Aflatoxin M₁ in goat dairy products. *Microbiol Alim Nutr* 1997; 15 (1): 47-52.
10. Roussi V. Occurrence of aflatoxin M₁ in raw milk and market milk commercialized in Greece. *Food Addit Contam* 2002; 19 (9): 863-8.
11. Rastogi S, Dwivedi PD, Khanna SK, Das M. Detection of aflatoxin M₁ contamination in milk and infant milk products from Indian markets by ELISA. *Food Control* 2004; 15: 287-90.
12. Kamkar A. A study of the occurrence of aflatoxin M₁ in raw milk produced in Sarab city of Iran. *Food Control* 2005; 16: 593-9.
13. Kaniou-Grigoriadou I, Eleftheriadou A, Mouratidou T, Katikou P. Determination of aflatoxina M₁ in ewe's milk samples and the produced curd and feta cheese. *Food Control* 2005; 16: 257-61.
14. Turconi G, Guarcello M, Livieri C, Comizzoli S, Maccarini L, Castellazzi AM et al. Evaluation of xenobiotics in human milk and ingestion by newborn. *Eur J Nutr* 2004; 43:191-7.
15. Oliveira CAF, Germano PML, Bird C, Pinto CA. Immunochemical assessment of aflatoxin M₁ in milk powder consumed by infants in São Paulo, Brazil. *Food Addit Contam* 1997; 14 (1): 7-10.
16. Sassahara M, Netto DP, Yanaka EK. Aflatoxin occurrence in foodstuff supplied to dairy cattle and aflatoxina M₁ in raw milk in the north of Paraná state. *Food Chem Toxicol* 2005; 43 (6): 981-4.
17. Navas SA, Sabino M, Rodriguez-Amaya D. Aflatoxin M₁ and ochratoxin A in human milk bank in the city of São Paulo, Brazil. *Food Addit Contam* 2005; 22 (5): 457-62.
18. Garrido NS, Ilha MH, Ortolani MRS, Fávoro RMD. Occurrence of aflatoxins M₁ and M₂ in milk commercialized in Ribeirão Preto-SP, Brazil. *Food Addit Contam* 2003; 20 (1): 70-3.
19. Prado G, Oliveira MS, Abrantes FM, Santos LG, Soares CR, Veloso T. Ocorrência de aflatoxina M₁ em leite consumido na cidade de Belo Horizonte – Minas Gerais/Brasil – agosto/98 à abril/99. *Ciênc Tecnol Aliment* 1999; 19 (3): 420-3.
20. Scussel VM. Comparison of methods by TLC and HPTLC for determination of aflatoxin M₁ in milk and B₁ in eggs. *Ciênc Tecnol Alimen* 2003; 23 Suppl 1: 46-52.
21. Shundo L, Ruvieri V, Navas SA, Sabino M. Otimização da determinação da aflatoxina M₁ em leite, utilizando coluna de imunoafinidade e cromatografia em camada delgada. *Rev Inst Adolfo Lutz* 2004; 63 (1): 43-8.
22. Martins HML, Martins MLL, Cruz MB. Métodos: ELISA e TLC aplicados à pesquisa de aflatoxina M₁ em leites de origem ovina e caprina. *Veterinária Técnica* 1994; 4 (6):20-5.
23. AOAC (Association of Official Analytical Chemists). Official methods of Analysis of AOAC.16th ed. Arlington: AOAC; 1996. Chapter 49.
24. Sabino M, Purchio A, Zorzetto MAP. Variations in the levels of aflatoxin in cows milk consumed in the city of São Paulo, Brazil. *Food Addit Contam* 1989; 6 (3): 312-26.
25. INMETRO (Instituto Nacional de Meteorologia, Normalização e Qualidade Industrial). Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. [www.inmetro.gov.br/credenciamento/laboratórios/cal.ensaios-DOQ-CGCR 008-Rev. 01 - março 2003]. 01 de setembro de 2005.
26. Corrêa B, Galhardo M, Costa EO, Sabino M. Distribution of molds and aflatoxins in dairy cattle feeds and raw milk. *Rev Microbiol* 1997; 28: 279-83.
27. Della Rosa HV, Moraes ECF. Determinação de resíduo de aflatoxina M₁ em leite por flúorodensitometria. *Rev Farmacol Bioquim Uni S Paulo* 1981; 17 (2): 270-84.
28. Sylos CM, Rodríguez-Amaya D. Estudo comparativo de métodos para determinação de aflatoxina M₁. *Rev Inst Adolfo Lutz* 1996; 56 (1): 87-97.
29. CE (European Committee) Commission Directive 98/53/EC. Laying down the sampling methods and the methods of analysis for the official control of the levels for certain contaminants in foodstuffs, annex II, JOL 201, 17 July, 1998, p. 93-101.

30. Horwitz W, Kamps LR, Boyaler VW. Quality assurance in the analysis of foods for trace constituents. *J Assoc Off Anal Chem* 1980; 63 (6): 1344-54.
31. Goto T, Hsieh DPH. Fractionation of radioactivity in the milk of goats administered ¹⁴C-aflatoxin B₁. *J Assoc Off Anal Chem* 1985; 68 (3): 456-8.
32. Helferich WG, Baldwin RL, Hsieh DPH. [¹⁴C] aflatoxin B₁ metabolism in lactating goats and rats. *J Anim Sci* 1986; 62: 697-705.
33. Acosta A, Escobar A, Margolles E, Mella C. Dinámica de excreción de aflatoxina M₁ en leche de cabras. *Rev Salud Anim* 1989; 1: 208-211.
34. Patterson DSP, Glancy EM, Roberts BA. The "carry over" of aflatoxin M₁ into the milk of cows fed rations containing a low concentration of aflatoxin B₁. *Fd Cosmet Toxicol* 1980; 18: 35-7.
35. Bullerman LB, Schroeder LL, Park K. Formation and control of mycotoxins in food. *J Food Protec* 1984; 47 (8): 637-646.
36. Gourama H, Bullerman LB. *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*: aflatoxigenic fungi of concern in foods and feeds: a review. *J Food Prot* 1995; 58 (12): 1395-1404.
37. Hahn G, Knorr S. Bacteriological, cytological and residue studies on milk from ewes and goats. *Arbeitstagung des Arbeitsgebietes "Lebensmittelhygiene"* 1989; 30:332-42.
38. Barrios MJ, Gualda MJ, Cabanas JM, Medina LM, Jordano R. Occurrence of aflatoxin M₁ in cheeses from the south of Spain. *J Food Prot* 1996; 59 (8): 898-900.
39. Brasil. Resolução RDC nº274, de 15 de out. 2002 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Regulamento técnico MERCOSUL sobre limites máximos de aflatoxinas admissíveis no leite, no amendoim no milho. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 16 out. 2002.

Análise de sucralose por cromatografia líquida de alta eficiência em refrigerante dietético e adoçante de mesa

Analysis of sucralose by high performance liquid chromatography in diet soft drink and table top sweetener

RIALA6/1040

Iracema de Albuquerque KIMURA^{1*}; Cristiane Bonaldi CANO²; Letícia Araújo Farah NAGATO²; Maristela Satou MARTINS¹

* Endereço para correspondência: Seção de Aditivos, Divisão de Bromatologia e Química, Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr. Arnaldo, 355, CEP 01246-902, S. Paulo / SP, telefone (11) 3068-2944.

¹ Seção de Aditivos, Divisão de Bromatologia e Química, Instituto Adolfo Lutz.

² Seção de Bebidas, Divisão de Bromatologia e Química, Instituto Adolfo Lutz..

Recebido: 04/04/2005 – Aceito para publicação: 30/09/2005

RESUMO

A sucralose é obtida a partir da sacarose em um processo que substitui 3 grupos hidroxilas por 3 átomos de cloro, aumentando assim o poder adoçante em até 600 vezes, quando comparado ao açúcar. Nos produtos “light” e “diet” o edulcorante sucralose pode ser utilizado isoladamente ou associado a outros edulcorantes. A técnica comumente empregada para a determinação de sucralose é a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector de índice de refração. O objetivo deste trabalho foi aplicar o método recomendado pelo Food Chemicals Codex (FCC) e pelo JECFA (FAO/OMS) para o edulcorante sucralose puro, em amostras de refrigerante dietético e adoçante de mesa. A técnica utilizada foi a CLAE com coluna C18, fase móvel água/acetonitrila (85:15 v/v) e detector de índice de refração. Para a quantificação foi adotado o método de padronização externa. A curva de calibração obtida foi linear a 95 % de confiança com $R^2_{\text{ajust}} = 1,00$. A recuperação variou de 96 a 101 %. Os resultados de sucralose encontrados variaram de 0,1 a 7 g. 100g⁻¹ para os adoçantes e de 6,1 e 16,2 mg. 100mL⁻¹ para os refrigerantes. A aplicação desta metodologia mostrou ser eficiente na separação e quantificação desse composto, nas amostras testadas.

Palavras-Chave. sucralose, edulcorantes, adoçante de mesa, refrigerante dietético, CLAE

ABSTRACT

Sucralose is derived from sucrose in a process that substitutes three hydroxyl groups by three chlorine atoms, resulting in a high intensity sweetener, approximately 600 times sweeter than sugar. For light and diet products the sucralose sweetener can be used either isolated or associated to other sweeteners. The most suitable technique for sucralose determination is the high performance liquid chromatography (HPLC) with refractive index detection. The present study aimed to use a technique recommended by Food Chemical Codex (FCC) and by JECFA (FAO/WHO) for analysis of pure sucralose in diet soft drinks and table top sweeteners samples. The employed technique was HPLC on a C-18 reverse-phase column, with a mobile phase water/acetonitrile (85:15 v/v), and refractive index detection; the external standard method was used for quantification. The obtained calibration curve was linear at 95 % confidence level with $R^2_{\text{adjust}} = 1.00$. The recoveries varied from 96 to 101 %. Sucralose concentrations ranged from 0.1 to 7 g. 100 g⁻¹ for table top sweeteners, and from 6.1 to 16.2 mg. 100 mL⁻¹ for soft drinks samples. The application of this methodology proved to be very efficient for processing the sucralose separation and its quantification in analyzed samples.

Key Words. sucralose, sweeteners, table top sweetener, diet soft drink, HPLC.

INTRODUÇÃO

Entre os edulcorantes artificiais de uso em alimentos e bebidas para dietas com ingestão controlada de açúcares e controle de peso, destaca-se a sucralose, cujo uso foi aprovado pela legislação brasileira em novembro/95¹. Alguns anos após esta data houve um crescimento significativo do emprego deste edulcorante em adoçantes e em vários tipos de alimentos, tais como: refrigerantes, néctares, sucos, bebidas lácteas, iogurtes, geléias, achocolatados, bolos, etc.

A sucralose é obtida a partir da sacarose em um processo que substitui 3 grupos hidroxilas por três átomos de cloro, aumentando assim o poder adoçante em até 600 vezes, quando comparado ao açúcar^{2,3,4,5}.

A Figura 1 apresenta a estrutura da sucralose (4, 1', 6' - triclorigalactosacarose), cuja fórmula molecular é $C_{12}H_{19}Cl_3O_8$ ^{2,6}.

Segundo a Resolução RDC nº 3/01 que aprova o uso de aditivos edulcorantes, a sucralose é permitida em alimentos com limites máximos de 0,033 a 0,045 g .100g⁻¹, em bebidas de 0,019 a 0,025 g . 100mL⁻¹ e em goma de mascar até 0,25 g . 100g⁻¹. Em adição, para os adoçantes de mesa não há limite na legislação⁷.

A sua ingestão diária aceitável (IDA) foi estabelecida pelo Comitê Conjunto de Experts sobre Aditivos Alimentícios (JECFA) da FAO/OMS em 0-15 mg . Kg⁻¹ de peso corpóreo⁸.

Nos produtos “light” e “diet” o edulcorante sucralose pode ser utilizado isoladamente ou associado a outros edulcorantes. Essa combinação geralmente permite uma melhor estabilidade e aceitação pelo consumidor do sabor doce do produto³.

Uma das técnicas mais usadas para a análise de sucralose é a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A detecção deste analito pode ser feita por ultravioleta (UV) ou por índice de refração (IR). A detecção por UV é realizada a 190 - 200 nm; nesta região são absorvidos muitos compostos presentes nas amostras que podem interferir na análise. Como a sucralose tem o mesmo comportamento que os carboidratos, o detector de índice de refração é o mais comumente utilizado^{2,4,5,9}.

Neste trabalho o objetivo foi aplicar o método recomendado pelo Food Chemicals Codex (FCC) e JECFA (FAO/OMS)^{6,10}, para o edulcorante sucralose puro, em amostras de refrigerantes “light” e “diet” e adoçantes de mesa.

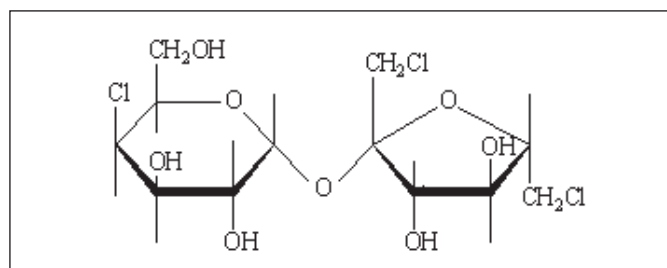


Figura 1. Fórmula estrutural da sucralose – P.M. 397,64.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

Foram adquiridas no comércio três amostras de adoçantes de mesa contendo sucralose, dois refrigerantes “light” de sabor cola e dois refrigerantes “diet”, sabores laranja e guaraná, nos quais foi adicionada quantidade conhecida de sucralose.

Método

Utilizou-se o método recomendado pelo FCC e JECFA (FAO/OMS) que emprega a cromatografia líquida de alta eficiência com detector de índice de refração^{6,10}. O método descrito utiliza uma coluna RadPak C18 de 10 cm x 8 mm, 5 µm e vazão de fluxo de 1,5 mL min⁻¹. Este método prevê que podem ser feitos ajustes nas condições cromatográficas de modo que o tempo de retenção da sucralose fique próximo de 9 min.

Equipamento e condições cromatográficas: cromatógrafo a líquido (Shimadzu), bomba (LC-10AD); forno (CTO 10 A); detector de índice de refração (RID-10 A), temperatura de 35,5 °C; injetor Rheodyne de 20 µL; desgaseificador; coluna C18 (Lichrospher 100), 125 mm de comprimento x 4 mm de diâmetro, com partículas de 5 µm, pré-coluna de mesma fase, 4 X 4 mm, temperatura do forno: 30 °C; vazão de fluxo: 0,6 mL . min⁻¹. Aquisição de dados: software Class LC10, versão 1.63, Shimadzu Corporation (1996).

Reagentes e solventes:

Padrão de sucralose: fornecido pelo fabricante “Johnson & Johnson” (pureza acima de 99%).

Fase móvel: água/acetoneitrila (85:15 v/v), desgaseificada e filtrada com membrana filtrante de 0,45µm (Millipore, tipo HVPVDF). O solvente utilizado para cromatografia foi grau CLAE e a água foi purificada em equipamento “Milli-Q”.

Preparação do padrão e amostras:

Padrão: foi preparada uma solução estoque de sucralose na concentração de 50 mg .100mL⁻¹, diluída na fase móvel. Para a curva de calibração foram preparadas quatro soluções de trabalho diluídas na fase móvel, nas concentrações de sucralose de 5, 10, 15 e 20 mg . 100mL⁻¹.

Recuperação: foi realizado um estudo de recuperação em uma amostra de adoçante (amostra sólida) e uma de refrigerante, adicionando-se duas soluções-padrão de sucralose nas concentrações de 5 e 10 mg . 100mL⁻¹, injetadas em triplicata. As amostras usadas neste teste foram: adoçante 1 e refrigerante cola 1.

Amostras

Adoçantes de mesa (sachets e tabletes): foram homogeneizados e pesados em quantidades próximas às concentrações das soluções do padrão, diluídos na fase móvel e filtrados. Estas concentrações foram baseadas nas formulações declaradas na rotulagem.

Refrigerantes: as amostras foram previamente degaseificadas no ultra-som por 20 minutos. Nos refrigerantes que continham sucralose, alíquotas de 50 mL foram transferidas para balões volumétricos de 100 mL, completados os volumes com a fase móvel e filtrados. Nos outros dois refrigerantes “diet”, que não continham sucralose, sabores guaraná e laranja, foi adicionado este edulcorante nas concentrações de 101,4 mg. 100mL⁻¹ e 100,4 mg. 100mL⁻¹, respectivamente, em seguida foram pipetados 10 mL para um volume de 100 mL, completados o volume com a fase móvel e filtrados.

As soluções de trabalho e as amostras preparadas foram filtradas com unidade filtrante HV, membrana Durapore, 0,45µm (Millipore) e injetadas diretamente no cromatógrafo, em triplicata. Para a quantificação de sucralose foi utilizado o método de padronização externa.

Análise estatística: para gerar a curva de calibração foi aplicada uma análise de variância (ANOVA) que corresponde à regressão linear simples entre as variáveis área do pico cromatográfico e concentração das soluções do padrão no nível de 95% de confiança. Para testar a significância dos coeficientes da calibração (intercepto e sensibilidade do método) foram aplicados o teste-*t* e intervalos de confiança e de predição no nível de 95 % de confiança. Toda a análise estatística foi realizada usando o pacote estatístico Minitab for Windows, v. 13.31 (2000)¹¹. Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) foram realizados através da distribuição t-student dos valores do intercepto e sensibilidade do método obtidos na regressão linear¹².

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 2 ilustra o cromatograma obtido por CLAE-IR, de uma solução padrão de sucralose a 10 mg 100mL⁻¹. O método oficial recomenda que o tempo de retenção da sucralose fique em torno de 9 min; como foi utilizada uma coluna de 12,5 cm x 4mm, 5µm, foram realizados alguns ajustes nas condições cromatográficas, tais como: redução da vazão de fluxo para 0,6 mL.min⁻¹ e temperatura na coluna de 30 °C, obtendo um tempo de retenção variando de 6,45 a 7,89 min

A curva de calibração conforme os resultados da ANOVA foi extremamente significativa para o modelo linear ($F_{obs(1;13;0,05)} = 205028, p = 0,000$) e com $R^2_{ajust} = 1,00$, o que sugere que toda a faixa estudada de concentração (0 a 20 mg 100mL⁻¹, medida em triplicata) possui homogeneidade de variância (Figura 3). A equação da reta foi $y = 24110 x$, onde $y = \text{área}$ e $x = \text{concentração de sucralose}$. O limite de detecção (LOD) foi de 1,65 mg 100mL⁻¹ e o limite de quantificação (LOQ) foi de 4,95 mg 100mL⁻¹.

A Tabela 1 mostra os dados de recuperação feitos em uma amostra de adoçante e uma amostra de refrigerante.

Nas duas faixas de concentração estudadas houve uma recuperação elevada de 96 a 101 %, mostrando que o método é aplicável diretamente a essas matrizes, sem a necessidade de se fazer uma extração prévia da amostra. Como até o presente

momento não foi relatado um método de análise para a determinação de sucralose em amostras de adoçantes e refrigerantes pelos órgãos regulamentadores e pela literatura nacional, este método poderia ser aplicado na rotina, devido à sua simplicidade, rapidez e precisão.

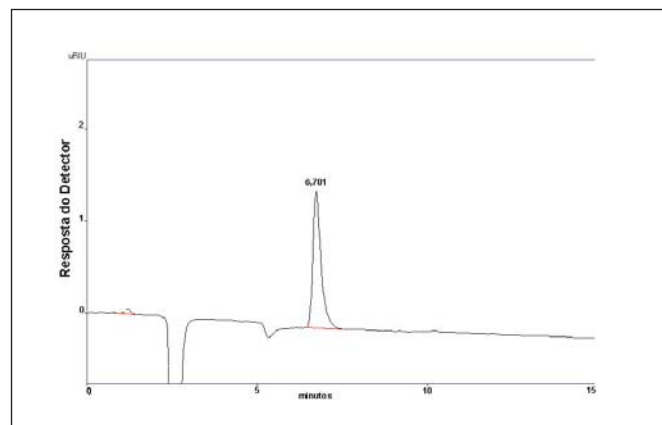


Figura 2. Cromatograma por CLAE-IR de uma solução padrão de sucralose (10 mg.100 mL). Coluna C18 (Lichrospher 100), 5 µm, 125x4 mm, temperatura do forno: 30 °C; fase móvel: água/ acetonitrila (85:15 v/v), vazão de fluxo: 0,6 mL.min⁻¹, detector de índice de refração, temperatura de 35,5 °C.

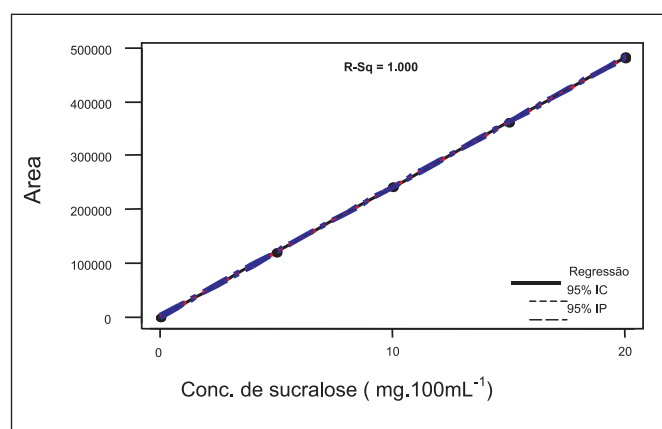


Figura 3. Curva de calibração da sucralose (mg.100 mL) obtida por CLAE-IR. Cada ponto é a média de três medidas. IC - intervalo de confiança e IP – intervalo de predição a 95 % de confiança.

Tabela 1. Dados de recuperação (%) de sucralose

| Concentração de sucralose adicionada (mg 100mL ⁻¹) | Adoçante* | Refrigerante* |
|--|------------|---------------|
| 5 | 96,9 ± 0,5 | 98,1 ± 0,7 |
| 10 | 96,8 ± 0,6 | 101,2 ± 1 |

* Média ± desvio padrão de triplicatas

Foram injetadas no cromatógrafo, amostras de adoçante de mesa e refrigerante “light” que não continham sucralose e verificou-se pelos cromatogramas que não houve nenhum pico no intervalo do tempo de retenção deste composto, tanto para o adoçante, quanto para o refrigerante, quando comparadas com os mesmos tipos de amostras contendo sucralose, conforme Figuras 4 e 5. Estes resultados estão de acordo com os elevados valores obtidos na recuperação, não havendo o efeito de matriz sobre a determinação deste composto.

Os resultados encontrados dos teores de sucralose em amostras de adoçantes e refrigerantes estão descritos na Tabela 2.

No caso das amostras de adoçantes, observou-se valores muito diferentes de sucralose entre as marcas analisadas. Esses teores variaram devido à formulação de cada produto bem como as formas de apresentação (sachet e tablete). O adoçante 1 apresentou um teor menor de sucralose por ser do

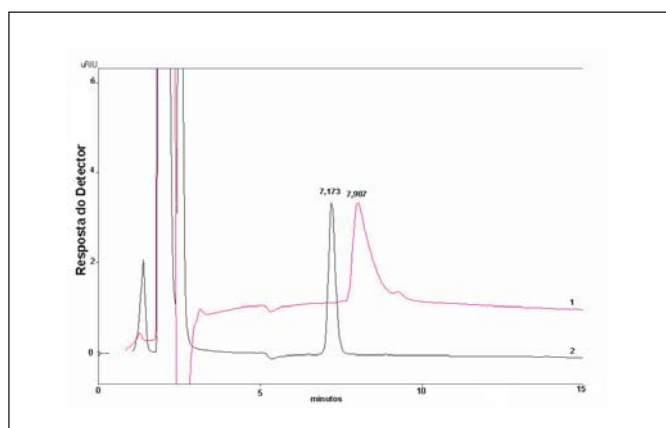


Figura 4. Cromatogramas de adoçantes obtidos por CLAE-IR: (1) adoçante de mesa sem sucralose; (2) adoçante de mesa contendo sucralose. Mesmas condições cromatográficas da solução padrão de sucralose.

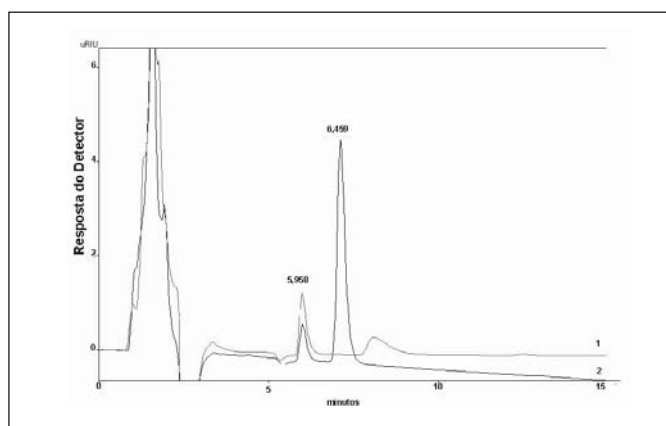


Figura 5. Cromatogramas de refrigerantes obtidos por CLAE-IR: (1) refrigerante “light” sem sucralose; (2) refrigerante “light” contendo sucralose. Mesmas condições cromatográficas da solução padrão de sucralose.

Tabela 2. Teores médios de sucralose encontrados nas amostras de refrigerante e adoçante de mesa

| Amostras | Sucralose (mg. 100g ⁻¹ ou 100 mL ⁻¹)* | Teor adicionado (mg. 100 mL ⁻¹) |
|----------------------|--|---|
| Adoçante 1 | 153 ± 1 | - |
| Adoçante 2 | 1298 ± 6 | - |
| Adoçante 3 | 7558 ± 52 | - |
| Refrigerante cola 1 | 6,1 ± 0,1 | - |
| Refrigerante cola 2 | 16,2 ± 0,1 | - |
| Refrigerante guaraná | 108 ± 2 | 101,4 |
| Refrigerante laranja | 103 ± 2 | 100,4 |

* Média ± desvio padrão de triplicatas

tipo “light” e conter sacarose em sua composição. O adoçante 2 continha o edulcorante acessulfame-K associado e o adoçante 3 (tablete) continha somente a sucralose como edulcorante.

As amostras dos adoçantes identificadas como 1 e 2 não apresentavam na rotulagem qual era a quantidade exata de edulcorante sucralose utilizada na sua composição. Quanto à amostra do adoçante 3, o teor obtido de sucralose foi concordante com o declarado em sua formulação (teor declarado = 7800 mg. 100g⁻¹).

No comércio foi encontrado somente refrigerante de cola contendo sucralose, devido à dificuldade de se encontrar refrigerantes de outros sabores contendo este composto, foi adicionada uma quantidade conhecida deste edulcorante em refrigerantes “diet”, sabores guaraná e laranja, onde se verificou a aplicabilidade do método utilizado nestas matrizes.

Os valores do edulcorante encontrados em amostras de refrigerantes de cola 1 e 2 foram concordantes com os declarados na rotulagem.

CONCLUSÕES

A técnica de cromatografia líquida com detector de índice de refração recomendado pelo Food Chemicals Codex (FCC) e JECFA (FAO/OMS) para o edulcorante sucralose puro mostrou ser aplicável em amostras de adoçantes de mesa e refrigerantes.

O método empregado mostrou-se muito rápido, simples e preciso, sem necessidade de extração prévia nestes tipos de amostra sendo satisfatório para a determinação de sucralose nas análises de rotina.

REFERÊNCIAS

1. Brasil. Portaria nº 318 de 24 de nov de 1995, da DTEN do Ministério da Saúde. [Aprova o uso do aditivo sucralose, com a função de edulcorante em alimentos e bebidas dietéticas]. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 28 nov. 1995. Seção 1, nº 227, 19406.

2. Miller GA. Alternative Sweeteners, New York: Marcel Dekker, Inc., 1991. p. 173-95.
3. Katrin S, Manczyk C. Reformulando as regras: novas opções em sistemas edulcorantes. *Food Ingredients* 2003; 24: 50-2.
4. Quinlan ME, Jenner MR. Analysis and stability of the sweetener sucralose in beverages. *J Food Sci* 1990; 55(1): 244-6.
5. Wallis KJ. Sucralose: features and benefits. *Food Australia* 1993; 45(12): 578-80.
6. JECFA-Joint Fao/Who Expert Committee on Food Additives - Compendium of Food Additive Specifications. Rome, 1992. p. 1535-6.
7. Brasil. Resolução RDC nº 3, de 2 de jan. de 2001 da ANVISA do Ministério da Saúde [Aprova o uso de aditivos edulcorantes, estabelecendo seus limites máximos para os alimentos]. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 5 jan. 2001. Seção 1, nº 4, p. 39-40.*
8. JECFA. Joint Fao/Who Expert Committee on Food Additives - Disponível em www.inchem.org/documents/jecfa/jecval/jec_1914.htm. Acesso em: 11 fev 2005.
9. Lawrence JF, Charbonneau CF. Determination of seven artificial sweeteners in diet food preparations by reverse-phase liquid chromatography with absorbance detection. *J Assoc Off Anal Chem* 1988; 71(5): 934-7.
10. Committee on Food Chemicals Codex – Food Chemicals Codex. 4ª ed. Washington D. C.: National Academic Press; 1996. p. 398-400.
11. MINITAB for windows, [Minitab- Inc, USA.] Versão. 13.31 .2000. CD-rom.
12. Currie L A. Detection and quantification limits: origins and historical overview. *Analytica Chimica Acta* 1999, 391: 127-34.

Qualidade química e física do leite de cabra distribuído no Programa Social “Pacto Novo Cariri” no Estado da Paraíba

Chemical and physical quality of goat milk distributed in the social program “New Pact Cariri” of State of Paraíba, Brazil

RIALA6/1041

Renata Â. G. PEREIRA¹; Rita de C. R. E. QUEIROGA^{1*}; Rodrigo P. T. VIANNA¹; Maria Elieidy G. de OLIVEIRA¹

* Endereço para correspondência: Departamento de Nutrição, Universidade Federal da Paraíba. Campus I, João Pessoa-PB
rcqueiroga@uol.com.br *

¹ Departamento de Nutrição, Universidade Federal da Paraíba. Campus I, João Pessoa-PB

Recebido: 24/08/2005 – Aceito para publicação: 21/11/2005

RESUMO

O objeto desta pesquisa foi avaliar a qualidade química e física do leite de cabra produzido em mini-usinas de beneficiamento e distribuído no programa social do Governo do Estado denominado “Pacto Novo Cariri”. As amostras foram obtidas por coletas realizadas nas cidades do Cariri Paraibano, contempladas com o Programa. Foram analisadas amostras provenientes de 21 municípios quanto ao conteúdo de proteína, extrato seco total, extrato seco desengordurado, lipídio, lactose e verificação de densidade, acidez e peroxidase. Com base nos resultados, o leite de cabra distribuído pelo programa obteve os valores médios: acidez 0,16 g/mL; densidade 1.030,2 g/cm³; extrato seco total 11,8 g/100mL; extrato seco desengordurado 8,4 g/100mL; lactose 4,4 g/100mL; proteína 3,3 g/100mL; lipídio 3,5 g/100mL e peroxidase com 70,7% das amostras aprovadas. Os resultados foram comparados com a legislação federal vigente e revelaram que a maioria dos dados atendeu aos padrões exigidos, estando à margem os seguintes parâmetros: extrato seco desengordurado (38,1%), lactose (9,5%) e lipídios (9,5%). Desta forma, os dados mostraram que a qualidade do leite de cabra do programa apresentou-se satisfatória, porém uma maior adequação das etapas que envolvem o transporte e beneficiamento da matéria prima poderiam garantir a qualidade final do produto.

Palavras-Chave. leite de cabra, qualidade físico-química, composição, programa social.

ABSTRACT

The purpose of the present investigation was to evaluate the physical and chemical quality of goat milk produced in processing mini-factories, and distributed by the state government social program called “New Pact Cariri”. Milk samples were collected from cities of Cariri region included in the respective Program. Samples from 21 cities were analyzed regarding to protein content, total solids contents, non-fat solids contents, lipids, lactose, density, acidity, and peroxidase. Based on these results, the goat milk distributed by the Milk Program showed the following mean values: acidity 0.16 g/mL; density 1,030.2 g/cm³; total dry extract 11.8g/100mL; non-fat solids contents 8.4 g/100mL; lactose 4.4 g/100mL; protein 3.3 g/100mL; lipid 3.5 g/100mL and peroxidase in 70.7% of approved samples. The results were in accordance with the in force federal legislation, the majority of them were within required standards, and the parameters in disagreement to the standards were non-fat solids contents (38.1%), lactose (9.5%) and lipids (9.5%). Thus, the data showed that the quality of the goat milk distributed by the respective Program seems to be satisfactory. In spite of that, a better adequacy of the stages related to raw materials processing and shipment would provide the high quality of final product.

Key Words. goat milk, physical-chemical quality, composition, social program.

INTRODUÇÃO

A caprinocultura vem ganhando grande impulso nos últimos anos pelo potencial que representa, como um instrumento eficaz de promoção de desenvolvimento da zona semi-árida, no Nordeste brasileiro. A sua exploração desempenha papel relevante como fonte de proteína e importante promotor de desenvolvimento socioeconômico para os pequenos produtores, através da utilização de seus subprodutos^{1,2}.

Dados da FNP-ANUALPEC³ calculam que 94% do efetivo caprino brasileiro está distribuído na região Nordeste. A caprinocultura leiteira brasileira, ainda que, com um rebanho numericamente significativo, participa apenas com 1,6% da produção de leite mundial, portanto, com níveis reduzidos de produção (138,000 Mt/ano), principalmente, quando são comparados com países da Europa, a exemplo da França e Espanha, que produzem respectivamente, 530 e 450 mil toneladas anuais, dispendo de um efetivo caprino de 1,2 e 3,1 milhões de cabeças⁴.

O fortalecimento da caprinocultura leiteira no Nordeste ainda depara-se com alguns entraves, como o fornecimento de alimento para os animais na época de estiagem e a melhoria da qualidade dos produtos como mecanismo impulsionador da aceitabilidade dos mesmos. Estudos relacionados às características químicas do leite caprino nas condições edafoclimáticas da região Nordeste se fazem necessárias para desenvolver tecnologias próprias de acordo com as suas peculiaridades.

A caprinocultura leiteira baseada no desenvolvimento de modelos alternativos estimula a geração de renda, a criação e o fortalecimento de microempresas rurais, ligadas a programas de crédito, dentro de uma visão macro do agronegócio. Parcerias entre governo e população, representadas por suas entidades de classe, podem contribuir para uma estabilidade econômica, bem como no mecanismo construtivo da cidadania e da promoção de Desenvolvimento social^{1,5}.

Segundo Silva⁵, o surgimento de alternativas organizacionais na região Nordeste, poderá incrementar a produção da caprinocultura leiteira no Brasil em função das características regionais que permitem a consolidação de atividades competitivas, podendo tornar o Nordeste um grande exportador de leite e derivados, não só para outras regiões, como também para outros países.

O sistema de criação predominante na região Nordeste é o extensivo, e a pastagem nativa tem servido de suporte para o rebanho, que na sua maioria depende dela como única fonte de alimento. No entanto, a quantidade de biomassa vem a ser drasticamente reduzida no período de estiagem, que predomina na maior parte do ano, sendo esta a principal causa dos baixos índices produtivos e reprodutivos aportados pelos caprinos na região e conseqüente sazonalidade na oferta dos seus produtos (carne, leite e pele).

De acordo com Queiroga⁶, pesquisadores tem estudado a composição do leite de cabra, entretanto, pouco se sabe a

respeito da sua composição em regiões tropicais e, menos ainda, nas suas microrregiões destacando a influência de múltiplos fatores como raça, mestiçagem, fatores ambientais e períodos de lactação sobre a qualidade do leite produzido.

A qualidade nutricional do leite de cabra está relacionada à sua composição química, sendo constituída de proteínas de alto valor biológico e ácidos graxos essenciais, ressaltando-se também o seu conteúdo mineral⁷. A importância do leite de cabra na alimentação se deve ao seu alto valor nutritivo, maior digestibilidade, características terapêuticas e dietéticas^{8,9,10}. As características físico-químicas, qualidade bacteriológica e variação da composição bioquímica do leite podem ser alteradas devido a alguns fatores tais como: nutricionais, ambientais, fraudes do produto, como por exemplo, adição de água, fatores genéticos e forma de criação, dentre outros^{11,12,13}.

Estudos revelam diferenças na composição química entre o leite de vaca e de cabra, no que se refere aos teores de proteínas, extrato seco total, cinzas, entre outros. Outros trabalhos são controversos, concluindo que, em relação aos aspectos físico-químicos, os leites citados são similares e as variações ocorrem devido às espécies dos animais.

O leite de cabra apresenta densidade mais elevada do que o leite de vaca, situando-se em torno de 1032 g/l, enquanto que o leite de cabra pode atingir 1034 g/l. Quanto ao teor de acidez, o leite caprino apresenta-se ligeiramente inferior mais devido às diferenças entre os grupos carboxílicos das duas espécies, podendo este índice ser utilizado como indicador do seu estado de conservação, variando entre 0,11 e 0,18 °D^{8,9}.

O teor de gordura entre o leite de cabra e vaca, tanto do ponto de vista quantitativo quanto do ponto de vista físico, apresenta diferenças devido a diversos fatores; entre eles os genéticos, sendo relatados valores entre 2,0% a 8,0% de gordura para o leite de cabra. Com relação ao aspecto físico, verifica-se que os glóbulos de gordura do leite de cabra são menores, podendo explicar a sua maior digestibilidade, levando a suposição de que as lipases atuam nas gorduras com maior rapidez devido a uma maior área de exposição⁸.

As proteínas do leite de cabra são formadas principalmente pela α -lactoalbumina; β -lactoalbumina; β -caseína; κ -caseína; α -S₁ caseína e α -S₂ caseína, as quais se assemelham aos homólogos do leite de vaca. Entretanto, no leite de cabra, a β -caseína representa 55% da composição destas proteínas, enquanto a α -S₁ caseína apresenta-se com maior percentual no leite bovino^{10,14}. Presume-se que as proteínas do soro (α -lactoalbumina; β -lactoalbumina) do leite de cabra e de vaca apresentam-se estruturalmente diferenciadas, e, além disso, variam percentualmente, o que explicaria a melhor tolerância do primeiro por crianças portadoras de quadros alérgicos ao leite de vaca.

Inovação, qualidade, quantidade e competitividade apresentam-se como condições básicas e a produção de bens e produtos de alto valor agregado, uma premissa de desenvolvimento. Entretanto, a precariedade da tecnologia aplicada no Brasil e a não utilização de padrões de controle

higiênico-sanitário para o leite de cabra e seus derivados, tem-se constituído como os principais entraves à agroindústria especializada em produtos lácteos de caprinos, estando à expansão deste setor vinculada à melhoria da estrutura de comercialização e à aplicação de tecnologia adequada aos padrões de qualidade exigidos^{15,16}.

No ano de 2000, no Estado da Paraíba, foi criado um programa social chamado de “Pacto Novo Cariri” com ações voltadas a caprinocultura, com a participação dos criadores de caprinos do local, visando o incentivo a caprinocultura leiteira da microrregião do Cariri e a absorção da produção para um programa de distribuição de leite de cabra a famílias cadastradas. Esta ação, financiada pelo Governo Federal e pelo Governo do Estado, visa a melhoria do estado nutricional das crianças e conseqüentemente a diminuição das taxas de morbimortalidade.

O Cariri Paraibano está subdividido em Cariri Ocidental e Cariri Oriental, compostos por 17 e 13 municípios, respectivamente. A população total desta região é de aproximadamente 175.720 habitantes. Apresenta clima semi-árido caracterizado por ser quente e seco, com chuvas de verão, alcançando os índices mais baixos de precipitação do estado, com média anual de 500 mm. A temperatura média anual é de 26°C e a umidade relativa do ar não ultrapassa os 75%¹⁷.

Neste contexto, o Programa do “Pacto Novo Cariri” se insere envolvendo os 30 municípios do Cariri objetivando melhorar as condições de nutrição das crianças desta região oferecendo-lhes um alimento de alto valor biológico, com característica de hipoalergenicidade, garantindo a Segurança Alimentar destas. A distribuição deste leite é feita por funcionários do estado em pontos específicos em cada município com repasse de aproximadamente 8072 litros de leite e um valor igual de crianças beneficiadas. Estimando-se a cobertura do programa e, tomando como base a população total e número de famílias, calcula-se que, 17,04% das famílias residentes nos Cariris têm as crianças beneficiadas pelo programa¹⁸.

Considerando que o principal objetivo de uma avaliação é influir sobre a tomada de decisões, tornam-se extremamente necessárias informações que indiquem a efetividade do Programa e as possíveis razões para falhas no alcance de seus objetivos. Assim, visou-se avaliar neste estudo a qualidade física e química do leite de cabra produzido em mini-usinas de beneficiamento e distribuído no programa social do Governo do Estado denominado “Pacto Novo Cariri”, gerando então, informações que propiciarão a fabricação de produtos de qualidade satisfatória.

MATERIAL E MÉTODOS

Local de execução e amostragem

Foram analisadas 84 amostras de leite de cabra pasteurizado entre os meses de Fevereiro a Junho de 2005, provenientes das mini-usinas de beneficiamento e dos postos

de distribuição localizados em 21 municípios, dos 30, do Cariri Paraibano/PB que fazem parte do Programa “Pacto Novo Cariri”.

As amostras foram coletadas de forma asséptica e transportadas em caixas térmicas até o laboratório na cidade de João Pessoa/PB. Tanto nos postos de distribuição quanto nas usinas beneficiadoras, o leite encontrava-se armazenado em congeladores horizontais. As análises foram realizadas no laboratório de Bromatologia do Centro de Ciências da Saúde na Universidade Federal da Paraíba.

Determinações físicas e químicas

As análises físicas e químicas foram realizadas pelos seguintes métodos:

- Proteína: pelo método Micro-Kjedahl¹⁹;
- Extrato seco total: procedeu-se secagem em estufa estabilizada a 105°C, até obtenção de peso constante¹⁹;
- Lipídio: utilizou-se o Lacto-butirômetro de Gerber²⁰;
- Lactose: a análise foi realizada segundo o método de redução de Fehling, expressando-se os resultados em lactose (g/100g)²⁰;
- Densidade: foi medida mediante a leitura em termolactodensímetro a 15 °C²⁰;
- Acidez: realizou-se a titulação, sendo utilizada a acidez em ácido láctico²⁰;
- Cinzas: obtidas mediante incineração em temperatura próxima a 550-570°C²⁰;
- Peroxidase: através da solução alcoólica de guaiacol a 1%²⁰;
- Extrato seco desengordurado: foi obtido pela subtração do teor de gordura do extrato seco total²¹.

Avaliação da qualidade do leite

Os resultados obtidos nas análises físico-químicas foram comparados com os valores estabelecidos pela legislação²².

Análise estatística

Todos os dados foram transcritos para meio digital e o banco de dados foi analisado com o auxílio do programa estatístico SPSS for Windows versão 8.0²³. Para cada parâmetro físico e químico foram calculados a média e o desvio-padrão para cada município.

Os valores inferiores ao estabelecido pela legislação específica foram categorizados em adequado ou inadequado e cada município foi classificado de acordo com o número de parâmetros que atenderam as recomendações legais. Foi construído um mapa para a visualização espacial dos municípios com o programa TABWIN²⁴.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores médios (%) e desvios-padrões dos parâmetros físicos e químicos do leite de cabra distribuído no Cariri Paraibano estão mostrados na Tabela 1.

Considerando-se os 21 municípios estudados, constatou-se que os resultados das análises apresentaram com maior frequência, valores inferiores aos mínimos estabelecidos pela legislação: extrato seco desengordurado (38,1%), lipídios (9,5%) e lactose (9,5%).

Na Tabela 2 encontra-se a frequência de amostras de leite pasteurizado de mini-usinas da região do Cariri Paraibano de acordo e em desacordo com os padrões estabelecidos pela legislação específica.

Quanto às alterações das características físico-químicas, pôde-se observar que as mais freqüentes foram verificadas nos teores de extrato seco desengordurado, lipídios e lactose, estando esses parâmetros fora das preconizações estabelecidas no Brasil²², que estabelece para extrato seco desengordurado, lipídios e lactose valores mínimos de 8,2%, 2,9% e 4,3%, respectivamente. Verificou-se também, que além das amostras pré-estabelecidas, a prova de peroxidase apresentou frequência negativa de 29,3% (24) das amostras analisadas, demonstrando assim, que provavelmente o produto pode ter sido submetido a uma temperatura superior a 75°C, ou seja, a temperatura ideal de pasteurização, por mais de 20 segundos, contribuindo para a inativação da ação da mesma²⁰.

Do total dos 30 municípios (Figura 1) que compõem os Cariris Ocidental e Oriental, 21 foram analisados e observou-se que 11 (52,4%) apresentaram valores-médios para algum dos parâmetros físicos e químicos aquém dos valores recomendados pela literatura, constituindo-se um dado um tanto quanto preocupante, visto ser mais da metade do universo amostral (Figura 2).

Todavia, levando-se em consideração o número de repetições feitas por amostras de cada município, verifica-se que do total de 530 análises realizadas, apenas 13 (2,45%) encontravam-se à margem dos padrões, com pouca representatividade quando comparado ao mesmo universo amostral.

Cruz⁷, em pesquisa com leite de cabra, relata valores médios de densidade variando entre 1030,8 a 1032,2 g/cm³, enquanto neste estudo foram encontrados valores médios semelhantes que variaram entre 1027,6 a 1033,4 g/cm³. O mesmo vale para Carvalho²⁵, que ao analisar leite de cabra de micro-usinas da região da grande São Paulo, encontrou valores entre 1031,9 a 1032,5 g/cm³. Valores superiores ao valor médio encontrado na pesquisa (1030,2 g/cm³) foram observados por Benedet²⁶, Chornobai et al,²⁷ e Queiroga²⁸: 1032,0; 1031,7 e

Tabela 1. Valores médios (%) e desvios-padrões dos parâmetros físicos e químicos do leite de cabra distribuído no Programa “leite da Paraíba” no Cariri Paraibano.

| Cidades | Proteína (g/100g) n=78 | Lipídios (g/100mL) n=82 | Lactose (g/100mL) n=84 | ESD ¹ (g/100g) n=82 | EST ² (g/100g) n=82 | Densidade (g/cm ³) n=42 | Acidez (g/mL) n=84 |
|-------------------|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|---|--------------------------|
| Amparo | 3,3 ± 0,08 | 3,3 ± 0,09 | 4,2 ± 0,25 | 7,8 ± 0,14 | 11,3 ± 0,06 | 1031,4 ± 0,00 | 0,15 ± 0,00 |
| Camalaú | 3,4 ± 0,16 | 3,8 ± 0,13 | 4,4 ± 0,03 | 7,8 ± 0,30 | 11,7 ± 0,33 | 1032,0 ± 0,00 | 0,15 ± 0,00 |
| Congo | 3,2 ± 0,09 | 3,5 ± 0,05 | 4,3 ± 0,05 | 8,7 ± 0,13 | 12,2 ± 0,09 | 1033,2 ± 0,00 | 0,17 ± 0,00 |
| Monteiro | 3,7 ± 0,03 | 3,5 ± 0,47 | 4,3 ± 0,19 | 8,4 ± 1,16 | 11,5 ± 0,61 | 1033,0 ± 0,00 | 0,14 ± 0,01 |
| Ouro Velho | 3,5 ± 0,05 | 4,1 ± 0,78 | 4,3 ± 0,02 | 8,0 ± 0,91 | 12,1 ± 0,13 | 1030,3 ± 0,00 | 0,16 ± 0,00 |
| Parari | 3,2 ± 0,22 | 4,4 ± 0,10 | 4,5 ± 0,05 | 8,2 ± 0,15 | 12,5 ± 0,15 | 1029,5 ± 0,01 | 0,17 ± 0,00 |
| Prata | 3,3 ± 0,17 | 3,4 ± 0,15 | 4,3 ± 0,02 | 8,6 ± 0,19 | 12 ± 0,29 | 1030,0 ± 0,00 | 0,17 ± 0,00 |
| S. S. Umbuzeiro | 2,6 ± 0,07 | 3,3 ± 0,15 | 4,3 ± 0,20 | 8,0 ± 0,29 | 11,2 ± 0,18 | 1028,7 ± 0,01 | 0,14 ± 0,03 |
| S. J. Cordeiros | 3,8 ± 0,14 | 3,4 ± 0,17 | 4,2 ± 0,04 | 9,1 ± 0,52 | 12,5 ± 0,31 | 1028,9 ± 0,00 | 0,16 ± 0,00 |
| Serra Branca | 3,5 ± 0,19 | 3,8 ± 0,09 | 4,3 ± 0,03 | 9,0 ± 0,13 | 12,7 ± 0,11 | 1031,5 ± 0,00 | 0,16 ± 0,01 |
| Sumé | 3,3 ± 0,02 | 3,4 ± 0,53 | 4,3 ± 0,08 | 8,4 ± 0,15 | 11,9 ± 0,34 | 1033,4 ± 0,01 | 0,17 ± 0,00 |
| Zabelê | 2,6 ± 0,33 | 2,9 ± 0,07 | 4,3 ± 0,09 | 8,1 ± 0,12 | 11,1 ± 0,21 | 1029,0 ± 0,00 | 0,16 ± 0,01 |
| Barra de Santana | 3,2 ± 0,07 | 3,3 ± 0,23 | 5,0 ± 0,03 | 8,3 ± 0,49 | 11,6 ± 0,31 | 1027,6 ± 0,00 | 0,14 ± 0,02 |
| Barra de S.Miguel | 3,1 ± 0,11 | 3,5 ± 0,18 | 4,5 ± 0,04 | 8,6 ± 0,19 | 12,1 ± 0,26 | 1029,2 ± 0,00 | 0,16 ± 0,00 |
| Boqueirão | 3,3 ± 0,36 | 3,3 ± 0,30 | 4,5 ± 0,12 | 8,9 ± 0,13 | 12,2 ± 0,21 | 1028,7 ± 0,01 | 0,16 ± 0,00 |
| Cabaceiras | 3,4 ± 0,12 | 4,3 ± 0,16 | 4,4 ± 0,02 | 8,1 ± 0,31 | 12,4 ± 0,13 | 1030,2 ± 0,00 | 0,15 ± 0,00 |
| Caraúbas | 3,4 ± 0,13 | 3,3 ± 0,21 | 4,4 ± 0,03 | 8,8 ± 0,28 | 12,1 ± 0,09 | 1030,1 ± 0,00 | 0,17 ± 0,00 |
| Caturité | 3,4 ± 0,06 | 2,6 ± 0,08 | 4,5 ± 0,07 | 8,5 ± 0,08 | 11,1 ± 0,09 | 1030,2 ± 0,00 | 0,15 ± 0,00 |
| Gurjão | 3,3 ± 0,12 | 3,6 ± 0,35 | 4,4 ± 0,01 | 8,0 ± 0,38 | 11,6 ± 0,14 | 1030,6 ± 0,00 | 0,16 ± 0,00 |
| Riacho S. Antonio | 3,4 ± 0,12 | 3,5 ± 0,17 | 4,3 ± 0,13 | 8,0 ± 0,74 | 11,5 ± 0,61 | 1029,6 ± 0,00 | 0,16 ± 0,00 |
| Santo André | 3,5 ± 0,03 | 2,8 ± 0,05 | 4,4 ± 0,15 | 8,4 ± 0,46 | 11,2 ± 0,38 | 1032,5 ± 0,01 | 0,16 ± 0,00 |
| Média | 3,3 ± 0,29 | 3,5 ± 0,49 | 4,4 ± 0,20 | 8,4 ± 0,53 | 11,8 ± 0,24 | 1030,2 ± 0,01 | 0,16 ± 0,00 |

¹ Extrato seco desengordurado

² Extrato seco total

Tabela 2. Frequência de amostras de leite de cabra pasteurizado provindo de mini-usinas da região do Cariri Paraibano em relação à legislação específica.

| Análises físico-químicas | | | De acordo | | Em desacordo | |
|--------------------------|----------------|----|-----------|------|--------------|------|
| Parâmetros | Padrão | N | n | % | n | % |
| Acidez % * | 0,13–0,18 | 84 | 84 | 100 | 0 | 0 |
| Densidade (15°C) | 1028,0–1034,0 | 42 | 42 | 100 | 0 | 0 |
| ESD% ** | mín. 8,2 | 82 | 74 | 90,2 | 8 | 9,8 |
| Lactose% | mín. 4,3 | 84 | 82 | 97,6 | 2 | 2,4 |
| Lipídio% | acima 2,9 | 82 | 79 | 96,3 | 3 | 3,7 |
| Peroxidase | aprov./reprov. | 82 | 58 | 70,7 | 24 | 29,3 |
| Proteína % | mín. 2,8 | 78 | 78 | 100 | 0 | 0 |

*acidez, em % ácido láctico

**Extrato seco desengordurado

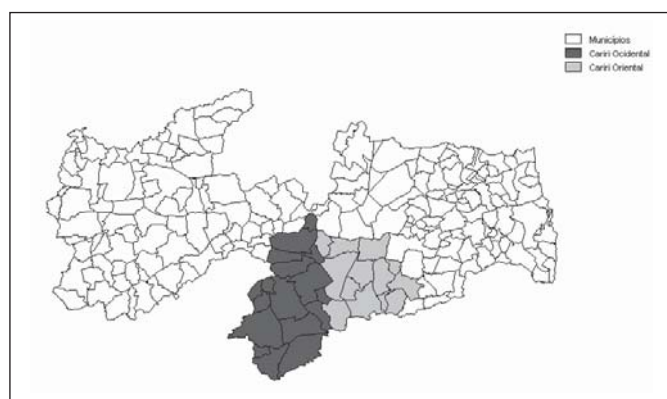


Figura 1. Mapa do Estado da Paraíba com destaque das microrregiões do Cariri Ocidental e Oriental.

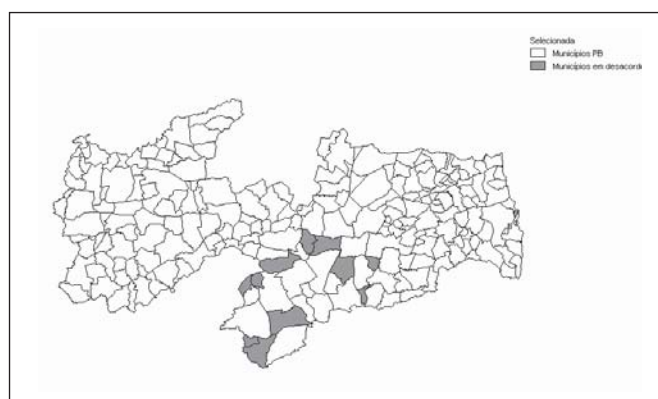


Figura 2. Mapa do Estado da Paraíba com destaque das microrregiões do Cariri Paraibano que se encontram em desacordo com a legislação vigente.

1032 g/cm³, respectivamente. Já Queiroga⁶, analisando o leite caprino detectou valor inferior de 1028 g/cm³.

No tocante ao extrato seco total (EST), Cruz⁷ e Carvalho²⁵ em suas análises encontraram intervalos médios de 9,82 a 12,96% e 11,76 a 12,68%, respectivamente. Valores semelhantes para este parâmetro também foram encontrados nesta pesquisa, cujos resultados variaram de 11,1 a 12,7 g/100g. Morgan et al.¹⁴ cita valor médio similar, 11,8 g/100mL, ao do estudo. Queiroga⁶, Prata et al.²⁹ e Chornobai et al.²⁷, em seus experimentos, constataram valores médios superiores de 12,7, 12,4 e 12,2%, respectivamente, ao aqui encontrado (11,8 g/100mL). Todavia, também foram determinados por Benedet²⁶, Sung et al.³⁰ e Queiroga²⁸ valores inferiores: 10,69, 11,1 e 11,4 g/100mL, respectivamente. O EST é um indicador importante devido à exigência de padrões mínimos no leite e pela influência no rendimento dos produtos lácteos, podendo-se observar que o pagamento do leite e seus produtos é em função do conteúdo extrato seco, especificamente gordura e proteína.

No que diz respeito ao extrato seco desengordurado (7,8 a 9,1 g/100mL), os valores determinados mostraram-se semelhantes aos encontrados por Cruz⁷ e Carvalho²⁵: 7,2 a 8,75 % e 8,87 a 9,09 %. Entretanto, Benedet²⁶, analisando leite caprino

do estado de Santa Catarina, determinou valores médios inferiores (7,34%) ao valor médio já constatado (8,4%) nesta pesquisa.

Quanto às proteínas, Cruz⁷ verificou intervalo médio de 2,62 a 3,88 g/100g em amostras de leite caprino comercializado no estado da Paraíba. Valores similares foram encontrados no leite produzido no Cariri paraibano, com variação de 2,6 a 3,8 g/100mL e valor médio de 3,29% por Benedet²⁶. Queiroga²⁸, em suas análises, obteve valor médio inferior (2,7 g/100mL) ao obtido no presente estudo (3,3 g/100mL).

Cruz⁷ relata valores médios de ácido láctico variando entre 0,17 a 0,19 g/100mL. Resultados análogos também foram aqui verificados, cujo intervalo médio foi de 0,14 a 0,17 g/100mL. Em referência ao teor lipídico, Cruz⁷ em seu experimento observou valores com variação de 2,62 a 3,88 g/100mL, resultados estes próximos aos aferidos no estudo (2,6 a 4,4 g/100mL). Porém, Queiroga⁶ constatou valor médio de 4,6 g/100mL, constituindo-se este valor superior ao encontrado (3,5 g/100mL). Já Benedet²⁶, Prata et al.²⁹ e Chornobai et al.²⁷ notaram valores inferiores de 3,34, 3,27 e 3,34 g/100mL, respectivamente. A acidez é normalmente utilizada como indicador do estado de conservação do leite em função da relação entre a

disponibilidade de lactose e produção de ácido lático por ação microbiana que acarreta em aumento na acidez e diminuição no teor de lactose²⁸.

O valor médio de lactose determinado de 4,4% foi superior ao reportado por Queiroga²⁸, 4,1 g/100mL, Queiroga⁶, 4,2 g/100mL e Prata et al.,²⁹ 4,3 g/100mL. Todavia, Sung et al.³⁰ e Dias et al.³¹ apresentaram valores médios superiores de 4,6% e 4,76% aos encontrados, enquanto que Benedet²⁶, avaliando leite de cabra de Santa Catarina relatou valores médios inferiores de 3,19%. A lactose é um dos nutrientes mais estáveis da composição química do leite, estando diretamente relacionada com a regulação da pressão osmótica, de forma que maior produção de lactose determina maior produção de leite com mesmo teor de lactose³².

Com relação à concentração de gordura no leite, segundo Mendes³³ e Gonzáles et al.³², o teor de gordura do leite caprino é susceptível a oscilações devido a vários fatores, como: genética, turno de ordenha, período de lactação, disponibilidade de determinados alimentos e a sazonalidade. Variações na composição centesimal do leite podem ser decorrentes a múltiplos fatores, dentre eles as condições higiênico-sanitárias, fraudes por adição de água e mistura de leites de outras espécies. Fatores como o manejo e características genéticas são determinantes na avaliação do perfil nutricional dos produtos lácteos. No entanto, na detecção de valores discordantes dos estabelecidos pela regulamentação técnica, deve-se haver a investigação de suas possíveis causas, com o controle desde a ordenha até a distribuição, preservando a garantia de sua qualidade.

CONCLUSÃO

Este estudo proporcionou a percepção de que os valores obtidos para os parâmetros estudados mostraram-se semelhantes, em sua maioria, aos referenciados pela literatura, como também com os preconizados pela legislação em vigor. Entretanto, ressalta-se que alguns parâmetros se encontravam, claramente, à margem do que a legislação específica rege, a citar: extrato seco desengordurado, lipídios e lactose, podendo estar relacionado a alterações de ordem biológica e/ou física.

Assim, verifica-se a importância de continuar o monitoramento da qualidade do processo de beneficiamento do leite de cabra distribuído no programa, de modo que propicie a oferta de um produto de qualidade. Isso refletirá no fortalecimento do programa, visto que o produto terá uma maior aceitabilidade, tendo como natural resposta um maior desenvolvimento nutricional e consequentemente uma redução da taxa de morbi-mortalidade da população beneficiada pelo programa Pacto Novo Cariri, em especial crianças menores de seis anos. Além disso, promoverá um desenvolvimento da caprinocultura da microrregião do cariri, contribuindo ao crescimento econômico da população.

AGRADECIMENTOS

Ao Governo do Estado da Paraíba, em especial, ao Coordenador do Programa “Leite da Paraíba”, Pesquisador Msc. Aldomário Rodrigues, pela disponibilidade de dados e incentivo e apoio no desenvolvimento da presente pesquisa.

REFERÊNCIAS

1. Lima LAA. Ovinocaprinocultura na Agricultura Familiar. Sobral (CE): Informativo do Centro Nacional de Caprinos CNPq/ EMBRAPA; 2000.
2. Rodrigues A, Quintans LJ. A importância dos caprinos de leite para o Nordeste. In: Anais do 2nd Simpósio Internacional de caprinos de corte. João Pessoa: Empresa Estadual de Pesquisa Agropecuária da Paraíba S.A., 2003.
3. FNP – ANUALPEC. Anuário da pecuária Brasileira. São Paulo (SP): 315-9. 2003.
4. FAOSTAT. http://www.fao.org/waicent/portal/statistics_en.asp. Acesso em 14 de março de 2005.
5. Silva RR. Agribusiness do leite de cabra. Salvador (BA): SEBRAE; 1998.
6. Queiroga RCRE. Características físicas, químicas e condições higiênico-sanitárias do leite de cabras mestiças no Brejo paraibano [Dissertação de Mestrado]. João Pessoa, Paraíba: Universidade Federal da Paraíba, 1995. 84 pp.
7. Cruz GRB, Costa RG, Queiroga RCRE. Características físicas do leite de cabra produzido no Estado da Paraíba. In: Anais da 35^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia. Botucatu: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 1998.
8. Haenlein GFW. Goat milk in human nutrition. *Small Ruminant Research* 2004; 51(1): 155-63.
9. McCullough FSW. Nutritional interest of goat's milk – Present information and future prospects. In: International Symposium the future of the sheep and goat dairy sectors. Zaragoza: CIHEAM-IAMZ, 2004.
10. Moneret-Vautrin A Allergy to goat milk and sheep milk. In: International Symposium the future of the sheep and goat dairy sectors. Zaragoza: CIHEAM-IAMZ, 2004.
11. Anifantakis EM, Kandarakis J. Contribution to the study of the composition of goat's milk. *Milchwissenschaft* 1980; 35: 617-9.
12. Barbosa M. Goat's milk research in Portugal. *Lait* 1993; 73: 425-9.
13. Jaubert G, Kalantzopoulos G. Quality and goat milk cheese and other products. In: Proceedings of the 6th International Conference on Goats. Beijing: International Academic Publishers, 1996: 274.
14. Morgan F, Massouras T, Barbosa M, Roseiro L, Ravosco F, Kandarakis I, et al., Characteristics of goat milk collected from small and medium enterprises in Greece, Portugal and France. *Small Ruminant Research* 2003; 47:39-49.
15. Cordeiro PRC. O desenvolvimento econômico da caprinocultura leiteira. *Rev Cons Fed Med Vet* 1998; 4(13): 28-30
16. Simplicio AA, Wander A. Organização e Gestão da Unidade Produtiva na Caprinocultura. In: Anais do 5th Congresso Pernambucano de Medicina Veterinária – Seminário Nordestino de Capri-ovinocultura. Recife: 2003.
17. Rodriguez JL, Costa IFL. Atlas Paraíba: Espaço Geo-Histórico e Cultural. João Pessoa (PB): Grafset; 2002.
18. IBGE. Censos Demográficos e Contagens Populacional. <http://www.datasus.gov.br>. Acesso em 28 de abril de 2005.
19. AOAC Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis, 16 ed., 4 rev, 1998. 2v.
20. Instituto Adolfo Lutz. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. São Paulo (SP): O Instituto, 1985.

21. Brasil. Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Animal - métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes. II – métodos físicos e químicos, Brasília: LANARA, 1981. p.XIV 1-22.
22. Brasil. Instrução Normativa nº 37 de 8 de novembro de 2000 do Ministério da Agricultura. Regulamento Técnico de Produção, identidade e qualidade do leite de cabra. Diário Oficial da União. Disponível no site www.agricultura.gov.br/das/dipoa/legislacaoespecifica_leited.htm. Acesso em 13 de maio de 2001.
23. Statistical package for social science – SPSS for Windows. Release 8.0 Statistical Package. Standard version. SPSS Inc. 1987 - 1997. USA. 1997.
24. Tab para Windows. *Tabwin, versão 3.0. Data SUS*. Departamento de informática do SUS. Brasília, 2004.
25. Carvalho MGX. Características físico-químicas, biológicas e microbiológicas do leite de cabra processados em micro-usinas da região da Grande São Paulo – SP [Tese de Doutorado]. São Paulo, São Paulo: Universidade de São Paulo, 1998. 103 pp.
26. Benedet HD, Carvalho MW. Caracterização de leite de cabra no Estado de Santa Catarina, Brasil. *Ciênc Tecnol Alim* 1996; 16(2):116-9.
27. Chornobai CA, Damasceno JC, Visentainer JV, Souza NE, Matsushita, M. Physical-chemical composition of in nature goat milk from cross Saanen throughout lactation period. *Archivoc Latinoamericanos de Nutrición* 1999; 49(3): 283-6.
28. Queiroga RCRE. Caracterização nutricional, microbiológica, sensorial e aromática do leite de cabra Saanen, em função do manejo do rebanho, higiene da ordenha e fase de lactação [Tese de Doutorado]. Recife, Pernambuco: Universidade Federal de Pernambuco, 2004. 148 pp.
29. Prata LF, Ribeiro AC, Rezende KT. Composição, perfil nitrogenado e características do leite caprino (Saanen). *Região Sudeste. Ciênc Tecnol Aliment* 1998; 18(4): 429-32.
30. Sung YY, Wu TI, Wang PH. Evaluation of goat milk quality of Alpine, Nubian, Saanen and Toggenburg breeds in Taiwan. *Small Ruminant Research* 1999; 33:17-23.
31. Dias JM, Tanezini CA, Pontes IS. Características minerais do leite caprino “in natura” da bacia leiteira de Goiânia. *Ciênc Tecnol Aliment* 1995; 15(1): 24-8.
32. González FHD, Durr JW, Fontanelli R, editores. *Uso de leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras*. Porto Alegre: 2001. 72p.
33. Mendes ES. Características químicas e físicas do leite de cabra sobre os efeitos dos tratamentos térmicos e das estações do ano em duas regiões do estado de Pernambuco [Dissertação de Mestrado]. Piracicaba, São Paulo: Universidade de São Paulo, 1993. 86pp.

Avaliação da qualidade higiênico-sanitária do leite exposto ao consumo na região metropolitana de Belém-PA

Evaluation of milk exposed to consumption in Northern Brazil

RIALA6/1042

José de Arimatéa FREITAS^{1*}; Jefferson Pinto de OLIVEIRA²; Glaucio Antonio Rocha GALINDO²

* Endereço para correspondência: Travessa Humaitá nº 1130, apartamento 103, Pedreira, CEP-66085-220, Belém/Pará, E. mail – jaf.bel@terra.com.br

¹ Laboratório de Controle e Inspeção de Produtos de Origem Animal, Instituto de Saúde e Produção Animal, Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, Pará

² Agência de Defesa Agropecuária do Pará, Belém, Pará

Recebido: 29/09/2004 – Aceito para publicação: 28/12/2005

RESUMO

A avaliação da qualidade físico-química e microbiológica de 56 amostras (oito de leite pasteurizado integral, nove de leite pasteurizado desnatado, 31 de leite pasteurizado tipo C, de duas marcas comerciais e oito de leite cru de dois fornecedores), de leite fluido exposto ao consumo na região metropolitana de Belém, estado do Pará, demonstrou que no conjunto das amostras 21,15% de leite pasteurizado tipo C, 7,87% de leite pasteurizado integral, 15,05% de leite pasteurizado desnatado e 38,37% de leite cru estavam fora dos padrões oficiais. Os padrões físico-químicos e microbiológicos foram extrapolados em 18,01% e 27,80%, 8,17% e 10,00%, 15,88% e 13,56%, 36,14% e 39,99%, respectivamente. Distorções relativas ao tratamento térmico e de estabilidade físico-química foram detectadas no leite pasteurizado e as relativas ao aspecto, limpeza de embalagem, volume do conteúdo e conservação na exposição para venda, foram observadas para todos os tipos de leite. Concluiu-se que, de modo geral, a qualidade do leite exposto ao consumo apresentou-se insatisfatória devido os percentuais de amostras excedentes aos padrões oficiais e apesar do aumento no fornecimento de leite pasteurizado, o leite não certificado ou clandestino continua sendo exposto ao consumo.

Palavras-Chave. leite pasteurizado, leite de consumo, qualidade físico-química e microbiológica do leite, leite não certificado, leite cru, Belém do Pará.

ABSTRACT

A survey on liquid milk on sale for consumption in the metropolitan area of Belém, state of Pará, Brazil, was performed. Fifty six samples (eight pasteurized integral milk, nine pasteurized skimmed milk, 31 type C pasteurized milk; from two commercial brands, and eight raw milk from two suppliers) were evaluated by means of the official physiochemical and microbiologic analytical methods, and the observed results were compared to official standards. On the whole, it was observed that the samples results exceeded the limits of respective standards in 21.15% of type C pasteurized milk samples, in 7.87% of integral pasteurized milk, in 15.05% of skimmed pasteurized milk, and in 38.37% of raw milk. On an individual analysis, the physiochemical and microbiologic patterns were exceeded in 18.01% and 27.80%, 8.17% and 10%, 15.88% and 13.56%, 36.14%, and 39.99%, respectively. Improperities related to the thermal treatment and physiochemical stability were detected in pasteurized milk; and in all type of milk irregularities on sensorial characteristics, aspect, packing cleanness content volume, and storage temperature at markets were found out. All in all, the quality of milk displayed for consumption showed to be inadequate. In spite of pasteurized milk supply has lately increased, the non-certificated milks have still been placed on sale for consumption. **Key Words.** pasteurized milk, milk exposed for consumption, quality of milk, physiochemical and microbiologic characteristics of milk, non-certificated milk, Brazil.

INTRODUÇÃO

O leite é um dos alimentos mais completos, mas sua composição química e a microbiota que o acompanha o tornam um produto altamente perecível, necessitando para sua conservação de adequados tratamentos higiênicos e tecnológicos^{1, 2}.

No Brasil, a produção leiteira ainda apresenta obstáculos na cadeia produtiva, especialmente em relação as condições higiênico-sanitárias, que comprometem a qualidade final do produto, mormente em regiões como a Amazônia¹.

No estado do Pará, assim como em outros estados brasileiros, fatores de natureza higiênica, sanitária e tecnológica têm marcante influência na qualidade do leite produzido e, conseqüentemente, na qualidade do alimento exposto ao consumo^{3,4,5}.

A qualidade do leite é uma somatória de vários atributos, entre os quais a estabilidade físico-química e microbiológica, o elevado nível higiênico e a inocuidade sanitária; por isso, foram fixadas exigências relativas à produção, manejo, transporte e comercialização, estabelecendo-se para os produtores da região norte o ano de 2007 para adequação à nova realidade do setor⁶.

O leite comercializado na área metropolitana de Belém apresenta irregularidades em graus variáveis, que muitas vezes penalizam o consumidor e a população como um todo (comunicação pessoal).

O objetivo do presente estudo foi analisar a qualidade físico-química e microbiológica do leite exposto ao consumo na região metropolitana de Belém-PA, em diferentes épocas dos anos de 2002 e 2003.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

O total de 56 amostras de leite exposto ao consumo, em diferentes épocas do ano, na região metropolitana de Belém, estado do Pará, das quais oito de leite pasteurizado integral, nove de leite pasteurizado desnatado, 31 de leite pasteurizado tipo C, de duas marcas comerciais e oito de leite cru de dois fornecedores, foram coletadas para análise da qualidade do produto.

Métodos

As amostras foram coletadas nos locais de venda e transportadas sob refrigeração até o laboratório de análises. No momento da coleta foram verificadas as condições de limpeza da embalagem, medida a temperatura de conservação e registrados dados a respeito do local de venda.

As amostras foram submetidas a métodos físico-químicos e microbiológicos oficiais e à apreciação de características sensoriais, volume e temperatura.

Foram realizadas as seguintes determinações físico-químicas: densidade relativa a 15 °C, acidez titulável pelo método de Dornic, estabilidade frente ao álcool-alizarol, peroxidase, teor de gordura, extrato seco e extrato desengordurado. A determinação de volume contido na embalagem foi efetuada em proveta aferida a conter, segundo procedimento rotineiro. As análises microbiológicas incluíram a contagem de mesófilos e de estafilococos, o número mais provável (NMP) de coliformes totais e coliformes fecais e a pesquisa de *Salmonella* spp., conforme procedimentos e recomendações oficiais^{7,8}. A contagem de estafilococos não incluiu a pesquisa de coagulase.

Os resultados foram comparados aos padrões oficiais, para apreciação da qualidade higiênico-sanitária do produto exposto ao consumo^{6,9}.

RESULTADOS

Todos os tipos de leite analisados apresentaram irregularidades em graus variáveis, cujos dados são apresentados nas Tabelas 1, 2 e 3.

Entre os três tipos de leite pasteurizado, o leite tipo C apresentou o maior percentual de amostras insatisfatórias, isto é, em desacordo com os padrões físico-químicos e microbiológicos oficiais, 21,15%, seguido do leite pasteurizado desnatado, 15,05% e pasteurizado integral, 7,87% (Tabela 1). O leite cru, em conformidade com as normas a serem implantadas definitivamente na região norte, apresentou percentual de 38,37% de amostras insatisfatórias (Tabela 1).

Os percentuais de amostras que satisfizeram os padrões oficiais estão resumidos nas Tabelas 2 e 3, que em ordem decrescente foram os seguintes: para o leite pasteurizado integral,

Tabela 1. Distribuição percentual de amostras de leite fluido exposto ao consumo na área metropolitana de Belém, estado do Pará em desacordo com os padrões oficiais, segundo o tipo de leite e análises laboratoriais realizadas. Belém, 2006.

| Tipo de leite | Percentual de amostras em desacordo | | |
|------------------------|-------------------------------------|-----------------|-----------------------------|
| | Físico-químicos | Microbiológicos | Total amostras em desacordo |
| Pasteurizado C | 18,01 | 27,80 | 21,15 |
| Pasteurizado integral | 8,17 | 10,00 | 7,87 |
| Pasteurizado desnatado | 15,88 | 13,56 | 15,05 |
| Cru | 36,14 | 39,99 | 38,37 |

Tabela 2. Percentual de amostras fora do padrão oficial do leite fluído exposto ao consumo na região metropolitana de Belém, estado do Pará, segundo o tipo de leite e análises físico-químicas realizadas. Belém, 2006.

| Análises | Tipo de leite | | | |
|-------------------------------|----------------|-----------------------|------------------------|-----------------|
| | Pasteurizado C | Pasteurizado integral | Pasteurizado desnatado | Cru |
| Densidade | | | | |
| Nº de amostras | 30 | 8 | 9 | 8 |
| Variação | 1,024 a 1,039 | 1,0315 a 1,039 | 1,0286 a 1,0347 | 1,0293 a 1,0312 |
| Fora do padrão | 6 | 2 | 5 | z |
| % fora do padrão | 20,00 | 28,6 | 55,50 | z |
| Dentro do padrão | 24 | 6 | 4 | 8 |
| % dentro do padrão | 80,00 | 71,4 | 44,50 | 100,00 |
| Acidez titulável | | | | |
| Nº de amostras | 31 | 8 | 9 | 8 |
| Variação | 11,03 a 28 | 14,58 a 17,67 | 14 a 17,25 | 13,7 a 27 |
| Fora do padrão | 5 | z | z | 8 |
| % fora do padrão | 16,13 | z | z | 100,00 |
| Dentro do padrão | 26 | 8 | 9 | z |
| % dentro do padrão | 83,87 | 100,00 | 100,00 | z |
| Gordura | | | | |
| Nº de amostras | 14 | 8 | 9 | 8 |
| Variação | 2,80 a 4 | 3,5 a 4,5 | 0,10 a 0,80 | 4,10 a 4,70 |
| Fora do padrão | 1 | z | 1 | z |
| % fora do padrão | 7,14 | z | 11,10 | z |
| Dentro do padrão | 13 | 8 | 8 | 8 |
| % dentro do padrão | 92,86 | 100 | 88,90 | 100,00 |
| Extrato seco | | | | |
| Nº de amostras | 14 | 14 | 9 | 8 |
| Variação | 10,09 a 14,30 | 12,2 a 14,3 | 8,85 a 9,60 | 12,42 a 13,39 |
| Fora do padrão | 1 | z | z | z |
| % fora do padrão | 7,14 | z | z | z |
| Dentro do padrão | 13 | 14 | 9 | 8 |
| % dentro do padrão | 92,86 | 100,00 | 100,00 | 100,00 |
| Extrato desengordurado | | | | |
| Nº de amostras | 14 | 8 | 9 | 8 |
| Variação | 6,05 a 10,30 | 8,7 a 10,3 | 8,67 a 9,40 | 8,32 a 8,65 |
| Fora do padrão | 5 | z | z | 2 |
| % fora do padrão | 35,72 | z | z | 40,00 |
| Dentro do padrão | 9 | 8 | 9 | 6 |
| % dentro do padrão | 64,28 | 100,00 | 100,00 | 60,00 |
| Estabilidade | | | | |
| Nº de amostras | 30 | 8 | 9 | 8 |
| Amostras estáveis | 28 | 8 | 9 | 5 |
| % amostras estáveis | 93,40 | 100 | 100,00 | 62,00 |
| Amostras instáveis | 2 | z | z | 3 |
| % amostras instáveis | 6,60 | z | z | 38,00 |
| Pasteurização | | | | |
| Nº de amostras | 30 | 7 | 9 | 8 |
| Eficiente | 20 | 5 | 5 | 2 |
| % eficiente | 66,67 | 71,45 | 55,50 | 25,00 |
| Ineficiente | 10 | 2 | 4 | 6 |
| % ineficiente | 33,33 | 28,0 | 44,54 | 75,00 |
| % dentro do padrão | 81,99 | 91,83 | 84,12 | 63,86 |
| % fora do padrão | 18,01 | 8,17 | 15,88 | 36,14 |

91,83% e 90,00%; para o leite pasteurizado desnatado 84,12% e 86,44%; para o leite pasteurizado tipo C, 81,99% e 72,20% e para o leite cru, 63,86% e 60,01%, para as características físico-químicas e microbiológicas, respectivamente.

Todos os tipos de leite apresentaram, em graus variáveis, alterações nas características sensoriais de odor, sabor e aspecto, neste caso com a presença de grumos. Em

todas as amostras a embalagem apresentava-se suja externamente, a temperatura de conservação situava-se na faixa de 5 °C quando exposto em balcões frigoríficos de supermercados; nas padarias e bares as amostras eram mantidas em refrigeradores sem registro de temperatura. O volume oferecido ao consumo variava muito, desde 880 até 1.010 mL.

Tabela 3. Percentual de amostras fora do padrão oficial do leite líquido exposto ao consumo na região metropolitana de Belém, estado do Pará, segundo o tipo de leite e as análises microbiológicas realizadas. Belém, 2006.

| Análises | Tipo de leite | | | |
|-------------------------------|----------------------------------|--|---|--|
| | Pasteurizado C | Pasteurizado integral | Pasteurizado desnatado | Cru |
| Contagem de mesófilos | | | | |
| Nº de amostras | 31 | 7 | 7 | 7 |
| Varição | <1,0x10 ¹ a incontáv. | <1,0x10 ¹ a 1,0x10 ⁴ | <1,0x10 ¹ a incontáv. | 2,5x10 a incontáv. |
| Dentro do padrão | 18 | 7 | 5 | 4 |
| % fora do padrão | 58,10 | 100,00 | 71,50 | 57,20 |
| Fora do padrão | 13 | z | 2 | 3 |
| % fora do padrão | 41,90 | z | 28,50 | 42,80 |
| NMP coliformes totais | | | | |
| Nº de amostras | 30 | 6 | 7 | 7 |
| Varição | 1,1 a 110 | 21,0 a 110 | 0,0 a 110 | 9,3 a 110 |
| Dentro do padrão | 10 | 3 | 6 | 1 |
| % dentro do padrão | 33,40 | 50,00 | 85,70 | 14,30 |
| Fora do padrão | 20 | 3 | 1 | 6 |
| % fora do padrão | 66,60 | 50,00 | 14,30 | 85,70 |
| NMP coliformes fecais | | | | |
| Nº de amostras | 23 | 6 | 7 | 7 |
| Varição | 0,0 a 110 | 0,0 | 0,0 | 0,0 a 1,90 |
| Dentro do padrão | 23 | 6 | 7 | 7 |
| % dentro do padrão | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 |
| Fora do padrão | z | z | z | z |
| % fora do padrão | z | z | z | z |
| Pesquisa Salmonella | | | | |
| Nº de amostras | 30 | 6 | 5 | 2 |
| Varição | Ausência | Ausência | Ausência | Ausência |
| Dentro do padrão | 30 | 6 | 5 | 2 |
| % dentro do padrão | 100,00 | 100,00 | 100,00 | 100,00 |
| Fora do padrão | z | z | z | z |
| % fora do padrão | z | z | z | z |
| Contagem estafilococos | | | | |
| Nº de amostras | 23 | 3 | 4 | 7 |
| Varição | <1,0x10 ¹ a incontáv. | <1,0x10 ¹ a incontáv. | <1,0x10 ¹ -2,0x10 ⁴ | <1,0x10 ¹ -1,25x10 ⁶ |
| Dentro do padrão | 16 | 3 | 3 | 2 |
| % dentro do padrão | 69,50 | 100,00 | 75,00 | 28,57 |
| Fora do padrão | 7 | z | 1 | 5 |
| % fora do padrão | 30,50 | z | 25,00 | 71,43 |
| % Amostras dentro do padrão | 72,20 | 90,00 | 86,44 | 60,01 |
| % Amostras fora padrão | 27,80 | 10,00 | 13,56 | 39,99 |

DISCUSSÃO

Conforme os dados da Tabela 1, o percentual de amostras insatisfatórias de leite cru, 38,37%, foi ligeiramente superior ao percentual determinado por Freitas et al.¹⁰, 32,73%. O percentual de amostras insatisfatórias de leite pasteurizado tipo C, 21,15%, superou aquele determinado por Polegato e Rudge¹¹, 14,40%, mas foi inferior ao observado por Cardoso e Araujo³, 39,49%.

As amostras insatisfatórias de leite pasteurizado integral alcançaram o percentual de 7,87%, valor inferior ao determinado por Garrido et al.¹², 22,30% e Cardoso e Araujo³, 40,00%. Por outro lado, o percentual de amostras insatisfatórias do leite pasteurizado desnatado atingiu 15,05%, mostrando-se também inferior ao percentual determinado por Freitas et al.¹⁰, 22,28%.

No que se refere apenas aos resultados das análises físico-químicas (Tabela 2) as amostras do leite pasteurizado tipo C extrapolaram o respectivo padrão em 18,01%, valor inferior aos percentuais de 41,10% observado por Cardoso e Araujo³ e 20,00% observado por Freitas et al.¹⁰, porém superior àquele observado por Garrido et al.¹² e Oliveira et al.¹³, 3,00% e 2,97%, respectivamente.

Para este tipo de leite, a instabilidade ao álcool-alizarol foi observada em 6,60%, a ineficiência da pasteurização em 33,33% e a acidez elevada em 16,13%. Em relação à pasteurização, a ineficiência no emprego do calor foi também observada neste tipo de leite por Tinoco et al.¹⁴, Oliveira et al.¹³ e por Freitas et al.¹⁵, no caso deste último estudo em 100,00% das amostras. A elevação da acidez foi também observada por Oliveira et al.¹³ e por Freitas et al.¹⁵ em 33,30% das amostras.

Segundo os dados da Tabela 2, o percentual de amostras de leite cru fora dos padrões físico-químicos atingiu o valor considerável de 36,14%, com elevada participação da acidez titulável, 100,00% das amostras e do extrato desengordurado, 40,00% das amostras, superior aos valores observados por Freitas et al.¹⁰ e Sachetti et al.¹⁶, 24,07% e 19,67%, respectivamente.

Neste tipo de leite, a instabilidade ao álcool-alizarol estava presente em 38,00% das amostras, mas a pasteurização foi realizada adequadamente em 25,00% delas. Nesse mesmo tipo de leite a instabilidade foi observada por outros pesquisadores em 42,50%, 25,00% e 25,00% das amostras^{15,17,18}

Ainda do ponto de vista físico-químico o percentual fora do padrão relativo ao leite pasteurizado integral foi 8,17%, inferior àquele determinado por Garrido et al.¹², próximo ao observado por Freitas et al.¹⁰ e relativamente inferior ao resultado observado por Cardoso e Araujo³, respectivamente, 19,10%, 9,17% e 40,00%. Neste tipo de leite a eficiência da pasteurização foi observada em 100,00% das amostras analisadas.

No leite pasteurizado desnatado, o percentual de amostras fora dos padrões físico-químicos foi 15,88% do qual o relativo, especificamente, à densidade alcançou o elevado valor de 55,50%; de modo semelhante, aquele relativo especificamente ao teor de gordura atingiu o valor de 11,10%.

No que se refere apenas às características microbiológicas (Tabela 3) o percentual das amostras de leite

cru que extrapolaram os padrões adotados foi 39,99%, inferior aos percentuais observados por Sachetti et al.¹⁶, 92,80%. Os percentuais que excederam os padrões referentes à contagem de mesófilos e NMP de coliformes totais, 42,80% e 85,70% foram superiores aos percentuais observados por Sachetti et al.¹⁶, respectivamente, 28,57% e 77,8%, inferior àquele observado por Ponsano et al.¹⁹ para a contagem de mesófilos, 83,33% e superior ao NMP de coliformes totais, 38,33%, observado por esses mesmos autores.

Ainda em relação a esse tipo de leite, o percentual observado neste estudo para o NMP de coliformes fecais, 0,00% (Tabela 3) foi expressivamente inferior ao percentual de 88,90% observado por Sachetti et al.¹⁶, que significou a ausência de microrganismos desse grupo nas amostras analisadas.

Nesse mesmo tipo de leite Badini et al.²⁰ determinaram 83,3%, 38,3% e 68,3% de amostras fora dos padrões adotados para coliformes totais, coliformes fecais e mesófilos, respectivamente, inferior, superior e superior aos percentuais determinados neste estudo (Tabela 3).

No leite cru, a contagem de estafilococos demonstrou o elevado percentual de 71,43% de amostras excedentes ao padrão oficial adotado. Por outro lado, com exceção dos valores referentes à pesquisa de *Salmonella* spp. e NMP de coliformes fecais, 0,00% e 0,00%, as amostras de leite cru continham elevados percentuais excedentes para coliformes totais e estafilococos, o que confere ao produto baixa qualidade higiênica devido, provavelmente, as péssimas condições de ordenha e manejo do leite e instalações zootécnicas inadequadas e ainda precárias condições sanitárias dos rebanhos leiteiros, pois nestas situações o leite cru apresenta elevada carga microbiana^{5,19,21}.

As amostras de leite pasteurizado tipo C extrapolaram os respectivos padrões microbiológicos em 27,80%, valor que superou os percentuais de 10,6%, 11,3%, 20% e 15,3% observados, respectivamente por Wendpap e Rosa²², Garrido et al.¹², Martini et al.²³ e Freitas et al.¹⁰, mas inferior aos percentuais de 37,98% e 57,1% observados por Cardoso e Araujo³ e Hoffman et al.²⁴.

Ainda em relação ao leite pasteurizado tipo C os percentuais de amostras fora dos padrões microbiológicos relativos a mesófilos e coliformes totais, respectivamente, 41,90% e 66,60%, foram superiores àqueles observados por Nader Filho et al.²⁵, 5% e 16,25% e aos percentuais observados por Gonçalves e Franco²⁶, 16,6% e 23,33%.

Leite Jr et al.²⁷ observaram percentuais de 65,63% e 31,25% excedentes aos padrões para coliformes em duas marcas desse tipo de leite; os percentuais excedentes aos padrões relativos a coliformes fecais observados por esses mesmos autores, 34,35% e 6,25% foram, obviamente, superiores àqueles observados neste estudo, 0,00%. Por outro lado, Oliveira et al.¹³ observaram percentual excedente de 47,5% para coliformes fecais nesse tipo de leite, valor também comparativamente superior ao observado neste estudo (Tabela 3).

No que se refere à pesquisa de *Salmonella* spp e contagem de estafilococos neste tipo de leite, Wendepap e Rosa²² também não observaram amostras fora dos padrões para esses microrganismos, enquanto que Hoffman et al.²⁴ observaram a presença do primeiro em 25,00% das amostras por eles analisadas.

Do ponto de vista microbiológico, nas amostras do leite pasteurizado integral o percentual que extrapolou os respectivos padrões alcançou 10,00%, significativamente inferior aos percentuais de 18,51%, 25,55%, 30,77%, 21,12% e 26,12%, determinados para esse tipo de leite por outros pesquisadores^{10,12,23,28,29}. Nader Filho et al.³⁰ observaram os percentuais de 0,70%, 5,00% e 5,00%, quanto aos padrões de mesófilos, NMP de coliformes totais e NMP de coliformes fecais, respectivamente superior, inferior e superior aos respectivos percentuais determinados neste estudo (Tabela 3).

Entre os quatro tipos de leite expostos ao consumo na região metropolitana de Belém, o leite cru apresentou o mais elevado percentual de amostras insatisfatórias, 38,37% (Tabela 1), ao mesmo tempo em que apresentava elevados percentuais referentes as análises físico-químicas e microbiológicas, respectivamente, 36,14% e 39,99% (Tabela 2, 3). Esses são valores excedentes que traduzem inadequadas condições higiênico-sanitárias e, provavelmente, de manejo do produto, isto é, ausência ou precárias condições de filtração e resfriamento do leite na unidade produtora³¹, que contrariam as novas normas estabelecidas para produtos lácteos no país⁶.

Do mesmo modo, os elevados percentuais assinalados configuram também potenciais riscos sanitários para a saúde do consumidor, representados pela possibilidade de ocorrência de intoxicações alimentares e infecções de origem alimentar^{19,20}.

Dentre os três tipos de leite pasteurizado o leite tipo C apresentou o considerável percentual de 21,15% de amostras insatisfatórias, seguido do leite pasteurizado desnatado, 15,05% e pasteurizado integral, 7,87% (Tabela 1).

A baixa qualidade do leite pasteurizado pode configurar, do ponto de vista microbiológico, elevada contaminação da matéria-prima, contaminação pós-processamento, falhas na pasteurização, assim como inadequadas condições de temperatura de conservação pós-processamento e ou de exposição para consumo, situações que podem ser identificadas nas provas e teste de peroxidase e estabilidade frente ao álcool-alizarol, na apreciação de características sensoriais e de temperatura de conservação na venda para consumo. Conforme enfatizou Luque Forero³² o leite pode ser contaminado por ignorância, negligência, prática fraudulenta e emprego de técnicas deficientes na conservação, transporte, industrialização e comercialização.

De modo geral, não foi observada uma melhora da qualidade do leite exposto ao consumo na região metropolitana de Belém para os aspectos analisados, desde as abordagens anteriores^{1,10,15}, o que parece ser um problema nacional, conforme demonstrado pelos autores referenciados neste estudo e pela constatação da venda para consumo de leite não certificado,

clandestino, nesta cidade.

CONCLUSÕES

Amostras de leite expostas ao consumo apresentaram várias irregularidades do ponto de vista físico-químico, microbiológico, sensorial, aspecto e apresentação, em graus variáveis, entre as quais as seguintes: variação de volume do conteúdo embalado; embalagem do produto suja externamente; ausência de controle de temperatura de conservação nos locais de venda; características sensoriais de odor, sabor e aspecto alteradas; padrões físico-químicos e microbiológicos extrapolados, principalmente em relação ao leite pasteurizado tipo C e leite cru; alteração na estabilidade físico-química e ineficiência de tratamento térmico em leite pasteurizado; venda de leite não certificado, clandestino, com flagrante desobediência à legislação em vigor, cujo produto apresentava elevado percentual de amostras insatisfatórias em relação aos padrões físico-químicos e microbiológicos analisados.

REFERÊNCIAS

1. Freitas JA. Qualidade do leite frente ao seu beneficiamento e obtenção de derivados. In: Seminário de Zootecnia da Faculdade de Ciências Agrárias do Pará, 1., Belém, 2001. Anais... Belém, 2001. p.105-10
2. Guimarães R. Importância da matéria-prima para a qualidade do leite fluido de consumo. *Rev Hig Alim* 2002; 16 (102/103): 18-23.
3. Cardoso L, Araujo WMC. Parâmetros de qualidade em leites comercializados no Distrito Federal, no período 1997-2001. *Rev Hig Alim*. 2003; 17 (114/115): 34-40.
4. Freitas JA. Acidez elevada do leite bovino no estado do Pará. *Arq Bras Med Veter Zootec* 1996; 48 (5): 629-32.
5. Santos D, Bergman GP. Influência da temperatura durante o transporte na qualidade do leite cru. Parte I. mesófilos aeróbios. *Rev Hig Alim* 2003; 17 (109): 69-74.
6. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n.º 51 de 18/9/2002, que dispõe sobre o regulamento técnico de identidade e qualidade do leite cru refrigerado. Brasília: MAPA; 2002.
7. Brasil. Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Animal. Portaria n.º 001/81 de 7 de outubro de 1981, que aprova os métodos analíticos para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes. II. Métodos físicos e químicos. Brasília: MA; 1981.
8. Brasil. Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Animal. Portaria n.º 001/81 de 7 de outubro de 1981, que aprova os métodos analíticos para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes. I. Métodos microbiológicos. Brasília: MA; 1981.
9. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n.º 12 de 2 de janeiro de 2001, publicada no DOU de 10/1/2001, que aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Brasília: MS; 2001.
10. Freitas JÁ, Oliveira JP, Sumbo FD, Carvalho RCF, Amorim Jr B, Moraes RJ et al. Características físico-químicas e microbiológicas do leite fluido exposto ao consumo na cidade de Belém, Pará. *Rev Hig Alim* 2002;16 (108): 89-96.
11. Polegato EPS, Rudge AC. Estudo das características físico-químicas e microbiológicas dos leites produzidos por mini-usinas da região de Marília-SP, Brasil. *Rev Hig Alim* 2003; 17 (110): 56-63.

12. Garrido NS, Martins AMB, Ribeiro EGA, Faria RD, Yokosama CE, Oliveira MA *et al.* Condições físico-químicas e higiênico-sanitárias do leite pasteurizado tipos “C”, “B” e integral comercializados na região de Ribeirão Preto-SP. *Rev Inst Adolfo Lutz* 1996; 56 (2):65-70.
13. Oliveira MMA, Nunes, IFS, Abreu, MC. Análise microbiológica e físico-química do leite pasteurizado tipo “C” comercializado em Teresina-PI. *Rev Hig Alim* 2003; 17 (111):92-4.
14. Tinoco ALA, Barcellos RMC, Pinto PSA, Coelho MSL. Análise das condições físico-químicas do leite oferecido ao comércio em Viçosa-MG. *Rev Hig Alim* 2002; 16 (98):101-6.
15. Freitas JA, Silva RAG, Nascimento JAC. Características do leite fluido consumido em Belém, Pará. *Arq Bras Med Veter Zootec* 1995; 47(3): 435-445.
16. Sacheti AA, Soares EA, Sinões SF, Santos Jr V, Spinosa WA. Avaliação microbiológica do tipo de leite consumido no setor 3 da cidade de Assis-SP. *Rev Hig Alim* 2003; 17 (112): 47-50.
17. Agnese AP, Nascimento AND, Veiga FHA, Pereira BM. Avaliação físico-química do leite cru comercializado informalmente no município de Seropédica-RJ. *Rev Hig Alim* 2002; 16 (94): 58-61.
18. Nascimento AMD, Agnese AP, Veiga FHA, Pereira BM, Oliveira VM. Avaliação físico-química do leite cru comercializado informalmente no município de Seropédica- RJ. In: Congresso Brasileiro De Medicina Veterinária, 27., 2000, Águas de Lindoia. *Anais... Águas de Lindoia*, 2000.
19. Ponsano EH, Pinto MF, Delbem ACB, Lara JAF, Perri SHV. Avaliação da qualidade de amostras de leite cru comercializado no município de Araçatuba e potenciais riscos decorrentes de seu consumo. *Rev Hig Alim* 2001; 15 (86): 31-8.
20. Badini KB, Náder Filho A, Amaral LA, Germano PML. Risco à saúde representado pelo consumo de leite cru comercializado clandestinamente. *Rev Saúde Pública* 1996; 30 (6): 549-552.
21. Antunes LAF, Oliveira JS. Qualidade microbiológica do leite cru. *Rev Inst Latic Cândido Tostes*, 1986; 41 (244): 20-4.
22. Wendpap LL, Rosa OO. Qualidade microbiológica do leite pasteurizado tipo “C” comercializado em Cuiabá-MT. *Rev Hig Alim* 1995; 9 (39): 11-4.
23. Martini M, Bassoli EE, Gubel Jr R. Avaliação de resultados das análises microbiológicas do leite pasteurizado obtido de mini/microusinas do estado de São Paulo com registro de inspeção estadual (SISP), no ano de 2000. *Rev Hig Alim* 2001; 15 (80/81): 100.
24. Hoffman FL, Garcia-Cruz CH, Venturim TM, Fazio MSL. Microbiologia do leite pasteurizado tipo C, comercializado na região de São José do Rio Preto-SP. *Rev Hig Alim* 1999; 12 (65):51-4.
25. Nader Filho A, Amaral A, Rossi Jr OD, Schoeken-Iturrino RP. Características microbiológicas do leite pasteurizado dos tipos B e C, processados por algumas usinas de beneficiamento do estado de São Paulo. *Rev Hig Alim* 1996; 10 (43): 30-2.
26. Gonçalves RMS, Franco RM. Determinação da carga bacteriana em leite pasteurizado tipos B e C, comercializados na cidade do Rio de Janeiro, RJ. *Rev Hig Alim* 1998; 12 (53):43 –6.
27. Leite Jr AFS, Torrano ADM, Gelli DS. Qualidade microbiológica do leite tipo C, comercializado em João Pessoa-PB. *Rev Hig Alim* 2000; 14 (74): 45-9.
28. Souza CM, Rabelo JÁ, Moulin MRI, Squilassi KMBS, Souza WM, Vieira MCM. Avaliação microbiológica do leite pasteurizado comercializado no estado de Goiás no período de abril a dezembro de 1999. In: Congresso Brasileiro De Medicina Veterinária, 27., Águas de Lindoia, 2000. *Anais... Águas de Lindoia*, 2000. p.87
29. Vieira MCM, André MCDPB, Silva EV, Lima SVL, Souza CM, Rabelo JA. Características microbiológicas de leite pasteurizado comercializado no estado de Goiás no período de janeiro a março de 1999. In: Congresso Brasileiro De Medicina Veterinária, 27., 2000, Águas de Lindoia. *Anais... Águas de Lindoia*, 2000. p.86
30. Náder Filho A, Amaral A, Rossi Jr OD, Schoecken DL. Características microbiológicas do leite pasteurizado integral, processado por mini-usinas de beneficiamento do estado de São Paulo. *Rev Hig Alim* 1997; 11 (50): 21-3.
31. Xavier VG, Benitez LB. Quantificação de coliformes em leite de vaca comercializado numa feira rural de Santa Cruz do Sul-RS. *Rev Hig Alim* 2001; 15 (86): 48-54.
32. Luque Forero F. La leche: consideraciones sobre la higiene y la alimentacion. *Medicina* 1988; 19: 349.

Avaliação da atividade de água e da contaminação por bolores e leveduras em mel comercializado na cidade de São Paulo – SP, Brasil

Assessment of water activity and molds and yeasts contamination in honey traded on São Paulo city -SP, Brazil

RIALA6/1043

Celina Adriana S. DENARDI; Érica Junko NISHIMOTO; Simone C. BALIAN; Evelise Oliveira TELLES*

* Endereço para correspondência: Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87 (depto VPS), Cidade Universitária, CEP 05508-031, São Paulo, SP, e-mail: bufalo@usp.br

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

Recebido: 20/09/2004 – Aceito para publicação: 17/11/2005

RESUMO

Foram analisadas 60 amostras de mel vendidas em feiras-livres, supermercados e casas de produtos naturais da zona oeste do município de São Paulo, para avaliar a atividade de água – Aa (Aqualab 3TE - Decagon) e a contagem de bolores e leveduras (em ágar batata contendo 2 e 20% de dextrose). A Aa apresentou valor médio de 0,578 e desvio padrão de 0,027, valor mínimo de 0,489 e máximo de 0,661. A contagem de bolores e leveduras apresentou valor mínimo, mediano e máximo, respectivamente de: $<0,5 \times 10^1$; $<0,5 \times 10^1$ e $3,9 \times 10^2$ UFC/g no ágar 2% de dextrose e $<0,5 \times 10^1$; $0,5 \times 10^1$ e $3,9 \times 10^2$ UFC/g no ágar 20%. Não houve diferença significativa entre as contagens obtidas nos meios com 2 e 20% de dextrose, porém houve maior número de amostras com ausência de crescimento no meio 2%. Concluiu-se que 59/60 amostras (98,33%) tinham pouca probabilidade de sofrer fermentação por apresentarem baixas contagens (<15 UFC/g) e/ou Aa ($<0,61$); apenas 1/60 (1,67%) amostra apresentou uma condição potencial de fermentação, com contagem >100 UFC/g e Aa $>0,61$; há necessidade de mais informações sobre a importância da osmolaridade do meio de cultura na quantificação e identificação de bolores e leveduras em mel.

Palavras-Chave. mel, atividade de água, bolores e leveduras, qualidade.

ABSTRACT

Water activity - Aw (Aqualab 3TE - Decagon) and molds and yeasts counting were assessed in 60 honey samples traded on open-air markets, supermarkets and natural products establishments at Western region of São Paulo city. Water activity measures showed a mean value of 0.578, and 0.027 as standard deviation, being 0.489 and 0.661 the minimum and maximum values, respectively. Molds and yeasts counting (performed on culture containing 2 and 20% dextrose potato agar) presented the minimum, median and maximum values of $<0.5 \times 10^1$; $<0.5 \times 10^1$ e 3.9×10^2 CFU/g respectively on 2% dextrose agar, and $<0.5 \times 10^1$; 0.5×10^1 e 3.9×10^2 CFU/g, respectively on 20% dextrose agar. No significant difference in mold/yeast counting on 2 and 20% dextrose agar was evidenced; although high rate of absence of mold and yeast growing was observed onto 2% dextrose agar. In conclusion, 59/60 (98.33%) samples presented low probability for fermenting process, as these honey specimens showed low counts of most and yeast (<15 CFU/g) and/or Aw (<0.61). Of 60 samples, only one (1.67%) showed a potential fermenting condition owing to the counting value of >100 CFU/g and Aw >0.61 . Further studies should be carried out to investigate the culture medium osmolarity for quantifying and identifying molds and yeasts

Key Words. honey, water activity, moulds and yeasts, quality.

INTRODUÇÃO

O Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Mel¹, que estabelece requisitos de qualidade, determina 20% o valor máximo permitido para umidade e, embora não estabeleça limite máximo tolerável para bolores e leveduras, define que o produto não pode ter indícios de fermentação.

A Teoria dos Obstáculos de Leistner explica a interação dos fatores que modulam a dinâmica de multiplicação/sobrevivência de microrganismos no alimento, permitindo avaliar a estabilidade e segurança microbiológica do produto².

A importância dessa perspectiva de avaliação está registrada no trabalho de Schweitzer³ que associou o percentual de umidade e a presença de levedura à ocorrência da fermentação no mel; quando a umidade é inferior a 17,1% o produto não fermenta, independentemente do número de leveduras, pois elas não conseguem se multiplicar, mas quanto mais alta a umidade, menor a quantidade de leveduras necessária para a fermentação do produto. Entre 17,1 e 18,0% não haverá fermentação se o número de leveduras for inferior a 1000 por grama de mel, mas se a contaminação for maior, haverá fermentação; entre 18,1 e 19,0% não haverá fermentação se o número de leveduras for inferior a 10 por grama; se entre 19,1 e 20,0% ela não ocorre se o número for inferior a 1 por grama. No entanto, se acima de 20%, sempre haverá risco de fermentação.

Embora a umidade seja o parâmetro oficial adotado para estabelecer a qualidade do mel e haja informações técnicas que correlacione a umidade com o potencial fermentativo do produto, a atividade de água (Aa) é, segundo Franco e Landgraf², o parâmetro que determina a água disponível no alimento para o metabolismo microbiano; a água ligada às macromoléculas, por forças físicas, não está livre para agir como solvente ou para participar de reações químicas e, portanto, não pode ser aproveitada pelos microrganismos.

Quando se fala em quantidade de água no mel, a alta higroscopicidade do produto é uma característica que deve ser considerada. Um ambiente com alta umidade relativa induz a trocas em sua composição⁴, alterando a Aa e, conseqüentemente, favorecendo a deterioração.

Segundo Franco e Landgraf², os valores limítrofes de atividade de água para multiplicação de bactérias halofílicas, bolores xerofílicos e leveduras osmofílicas são, respectivamente, 0,75; 0,65 e 0,61, e o mel varia entre 0,54 e 0,75.

Salamanca et al.⁴ relatam valores entre 0,574 e 0,590 que assegura condição inóspita para atividade microbiana. Montville⁵ afirma que em produtos com Aa menor que 0,60 as principais espécies de leveduras são *Torulopsis famata* e *Saccharomyces rouxii* e de bolores são *Aspergillus echinulatus* e *Xeromyces bisporus*.

Há poucos dados disponíveis na literatura, mas eles mostram que há diferentes níveis de contaminação por bolores e leveduras em méis, desde ausência de crescimento até $5,0 \times 10^3$ UFC/g em Recife, onde *Aspergillus* spp e *Penicillium* spp foram os gêneros mais freqüentemente

isolados⁶ e de 0,5 a $1,4 \times 10^2$ UFC/g⁷ em São José do Rio Preto.

Talvez por ser um alimento de baixo risco, característica conferida por sua baixa atividade de água/umidade e baixo pH, que determinam um ambiente inóspito para microrganismos, especialmente os patogênicos, associado à ainda baixa taxa de consumo, o mel não tem sido estudado com entusiasmo no Brasil. No entanto, com a crescente procura por produtos naturais percebe-se uma tendência no aumento do consumo do mel e dos produtos que contenham mel ao invés de açúcar e, assim, estudos sobre a estabilidade, ocorrência de fraudes e adulterações desse alimento são necessários.

Esta pesquisa visou determinar a atividade de água e a contagem de bolores e leveduras em méis adquiridos em diversos pontos de venda no município de São Paulo-SP.

MATERIAL E MÉTODOS

Entre abril e julho de 2003, foram adquiridas no município de São Paulo 60 amostras de mel provenientes de feiras-livres, supermercados e casas de produtos naturais, para análise no Laboratório de Higiene Alimentar da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

Bolores e leveduras: uma alíquota de 25 gramas foi homogeneizada em 225ml de água peptonada 0,1% e foram realizadas diluições seriadas e sucessivas até 10^{-5} ; semeadura em ágar batata dextrose 2% e ágar batata dextrose 20% (obtido pela adição de glicose anidra até concentração final de 20%), segundo recomendações do manual “Métodos de Análise Microbiológica para Alimentos”⁸, e incubação a 25°C/5 dias.

Atividade de água: utilizou-se o Analisador de Atividade de Água Aqualab Serie 3TE- Decagon, seguindo os procedimentos indicados pelo fabricante.

Análise estatística: foram realizados testes de normalidade dos dados (Kolmogorov-Smirnov), pelo pacote estatístico SPSS. Dados com distribuição normal tiveram análise descritiva (média e desvio padrão) e para dados não-normais, foram calculadas a mediana e valores mínimo e máximo, também utilizando o SPSS. Os resultados das contagens nos meios ágar batata dextrose 2 e 20% foram submetidas ao Wilcoxon Matched-Pairs Signed-Rank Test, usando o SPSS. Para fins de análise estatística, representou-se com o número 0 (zero) os resultados que estavam abaixo do limite de detecção da técnica ($<0,5 \times 10^1$ UFC/g).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores mínimo, da mediana e máximo de bolores e leveduras foram respectivamente: $<0,5 \times 1$, $<0,5 \times 1$, e $3,9 \times 10^2$ UFC/g no ágar batata dextrose 2% e $<0,5 \times 1$, $0,5 \times 10^1$ e $3,9 \times 10^2$ UFC/g no

ágar batata dextrose 20%. Não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre os valores encontrados nos meios contendo 2% e 20% de dextrose. Na Tabela 1 pode-se notar, no entanto, que o meio dextrose 20% revelou melhor desempenho na detecção de amostras com baixa contagem de bolores e leveduras, o que pode ser constatado pela menor frequência de amostras abaixo do limite de detecção. Esse fato poderia ser decorrente da presença de células melhor adaptadas à alta osmolaridade do mel. Sugere-se outros estudos para avaliar o significado dessa observação, especialmente porque a nova metodologia do Ministério da Agricultura, aprovada em agosto de 2003⁹, não mais determina o emprego dos dois meios para quantificar bolores e leveduras em mel.

Nota-se, ainda na Tabela 1, que a contaminação por bolores e leveduras foi > 100 UFC/g em quatro amostras do meio 2% dextrose (e em cinco no meio 20% dextrose); esse grau de contaminação pode levar à fermentação do produto se a umidade for superior a 18%, segundo Schweitzer³. Destaca-se que três dessas amostras excederam 100 UFC/g em ambos os meios empregados.

A máxima contaminação encontrada no presente estudo foi de $3,9 \times 10^2$ UFC/g, registrada nos dois meios. Esses resultados concordam com aqueles obtidos por Garcia-Cruz et al.⁷, que obtiveram valor máximo de $1,4 \times 10^2$ UFC/g, sendo que 45% das amostras estavam com contagem inferior a 10 UFC/g, mas Barros et al.⁶ registraram valor máximo mais alto, $5,0 \times 10^3$ UFC/g.

A atividade de água apresentou distribuição normal, com os seguintes resultados: média de $0,578 + 0,027$, valor mínimo de 0,489 e máximo de 0,661; ressalta-se que 5 amostras apresentaram Aa acima de 0,61 que é, segundo Franco e Landgraf², o limite mínimo para a multiplicação dos agentes mais resistentes à alta pressão osmótica (leveduras osmofílicas). Os resultados se assemelham aos de Salamanca et al.⁴, que tiveram média de 0,567 + 0,028, com mínimo de 0,512 e máximo de 0,613.

A Tabela 2 mostra os resultados de contagem obtidos nas cinco amostras que apresentaram Aa $> 0,61$. Nota-se que em apenas em uma amostra houve concomitância de Aa superior a 0,61 (0,613) e contagem de bolores e leveduras > 100 UFC/g (140 e 160 UFC/g nos meios com 2 e 20% dextrose, respectivamente).

Em 98,33 % das amostras (59/60), a Aa estava abaixo de 0,61 e/ou o grau de contaminação foi < 15 UFC/g apresentando baixo risco de fermentação, se mantidas as condições de armazenamento em lugar fresco e seco.

Sugere-se estudar a relação da Aa e umidade com a quantificação e identificação de bolores e leveduras no mel.

CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos, pode-se depreender que 98,33% das amostras analisadas (59/60) tinham pouca probabilidade de sofrer fermentação, se mantidas as condições de armazenamento em ambiente seco e fresco, por apresentarem contagens de bolores e leveduras < 15 UFC/g e/ou Aa $< 0,61$.

Apenas 1,67% das amostras apresentaram uma condição potencial de fermentação, pois a contagem de bolores e leveduras era > 100 UFC/g e a Aa $> 0,61$.

Há necessidade de mais informações sobre a importância da osmolaridade do meio de cultura na quantificação de bolores e leveduras em mel, bem como a identificação da microbiota.

AGRADECIMENTOS

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP

Tabela 1. Distribuição das amostras por intervalo de contagem de bolores e leveduras, segundo o meio empregado. São Paulo, abril – julho de 2003.

| | < 5 UFC/g | 5 — 10UFC/g | 10 — 100UFC/g | > 100 UFC/g |
|-----------------------|-------------|-----------------|-----------------|---------------|
| Meio com 2% dextrose | 35 (58,33%) | 11 (18,33%) | 10 (16,66%) | 4 (6,66%) |
| Meio com 20% dextrose | 27 (45%) | 17 (28,33%) | 11 (18,33%) | 5 (8,33%) |

Tabela 2. Resultado das contagens de bolores e leveduras nas amostras de mel que apresentaram atividade de água (Aa) acima de 0,60. São Paulo, abril – julho de 2003.

| Aa | Bolores e leveduras (meio com 2% dextrose) | Bolores e leveduras (meio com 20% dextrose) |
|-------|--|---|
| 0,611 | < 5 UFC/g | 15 UFC/g |
| 0,613 | 140 UFC/g | 160 UFC/g |
| 0,614 | < 5 UFC/g | < 5 UFC/g |
| 0,642 | 10 UFC/g | < 5 UFC/g |
| 0,661 | 5 UFC/g | 5 UFC/g |

REFERÊNCIAS

1. Brasil. Instrução Normativa n.11, de 20 out. 2000 do Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Regulamento Técnico de identidade e qualidade do mel. Disponível em: <http://oc4j.agricultura.gov.br/agrolegis/do/consultaLei?op=viewTextual&codigo=7797>. Acesso em 9 jun. 2005.
2. Franco BDGM, Landgraf M. Microbiologia dos alimentos, 2. ed. São Paulo: Ed Atheneu; 1996.
3. Schweitzer P. Qualidade do mel. Apacame, Disponível em URRL: <http://www.apacame.org.br/mensagemdoce/61>. Acesso em: 14 set. 2004.
4. Salamanca GG, Pérez FC, Serra BJA. Determinación de la actividad de agua en mieles colombianos de las zonas de Bocayá y Tolima. Beekeeping. Disponível em URRL: www.beekeeping.com/articulos/salamanca/actividad_agua.htm. Acesso em: 14 set. 2004.
5. Montville TJ. Concepts in physiology and metabolism. In: Food Microbiology Vol. I, 1a. ed. Florida CRC Press, 1987. p.11.
6. Barros GC, Mendes ES, Silva LBG, Oliveira LA. Qualidade físico – química e microbiológica de méis comercializados na grande Recife, PE, Hig Alim 2003, 17, 112: 53-8.
7. Garcia-Cruz CH, Hoffmann FL, Sakanaka LS, Vinturim TM. Determinação da qualidade do mel, Rev Alim Nutric 1999, 10: 23-35.
8. Brasil, Ministério da Agricultura e do Abastecimento, Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária, Laboratório Nacional de Referência Animal – LANARA. Métodos analíticos oficiais para controle de produtos de origem animal e seus ingredientes. Métodos microbiológicos, Brasília, 1991/1992.
9. Brasil. Instrução Normativa n.62, de 26 ago. 2003. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Disponível em URRL: <http://oc4j.agricultura.gov.br/agrolegis/do/consultaLei?op=viewTextual&codigo=2851>. Acesso em: 30 jun. 2005.

Composição centesimal e teor de colágeno em carne bovina moída

Proximate composition and collagen content in beef minced meat

RIALA6/1044

Jussara C. M. DELLA TORRE^{1*}; Nelson J. BERAQUET²

* Endereço para correspondência: ¹ Instituto Adolfo Lutz, Serviço de Alimentos da Divisão de Bromatologia e Química, Seção de Óleos, Gorduras e Condimentos, Av. Dr. Arnaldo, 355, São Paulo, SP. CEP: 01246-902. E-mail: jussarat@ial.sp.gov.br

² Centro de Tecnologia de Carnes do Instituto de Tecnologia de Alimentos. Av. Brasil, 2880, Campinas, SP. CEP: 13073-001.

Recebido: 02/12/2003 – Aceito para publicação: 12/12/2005

RESUMO

As fibras de colágeno do tecido conjuntivo são um dos principais componentes dos tecidos musculares animais e apresentam uma reduzida quantidade de aminoácidos essenciais na sua composição. Por conseguinte, os produtos cárneos em que essas fibras de colágeno estiverem presentes em quantidade acima do normal são deficitários quanto ao valor nutricional. O objetivo do presente trabalho foi de caracterizar sensorialmente a aparência, odor e estabelecer valores físico-químicos de composição centesimal, pH, colágeno (COL) e relação percentual de colágeno pela proteína total (COL rel.) de 20 amostras de carne bovina moída crua, que deram entrada no laboratório para análise de rotina, cujos dados foram comparados aos resultados físico-químicos de carnes moídas obtidas de nove diferentes cortes cárneos de traseiro de bovino adquiridos no varejo. As amostras de carne moída de exame de rotina laboratorial mostraram extensas variações nos teores de umidade (61,0%–81,8%), gordura (1,2%–21,9%), proteína (8,1%–21,1%), cinzas (0,5%–1,1%), COL (1,0%–4,9%), COL rel. (5%–31%) e pH (5,34–6,55), enquanto as carnes moídas preparadas com os cortes adquiridos no varejo tiveram intervalos menores para os teores de umidade (64,1%–74,5%), gordura (2,8%–16,3%), proteína (19,3%–21,8%), cinzas (0,8%–1,1%), COL (1,0%–3,7%), COL rel. (5%–17%) e pH (5,52–5,80). As amostras de carne moída da rotina revelaram, em geral, odor e cor aceitáveis; contudo 14 unidades (70%) foram consideradas alteradas na aparência pela elevada proporção de fibras de tecido conjuntivo ou aponevrose.

Palavras-Chave. carne bovina moída, colágeno, composição centesimal, pH, legislação.

ABSTRACT

Collagen fibers of connective tissue are one of the main components of animal muscle tissue, and reduced contents of essential amino-acids are presented in their composition. Thus, the meat products containing collagen fibers amount above the normal rate are regarded as of low nutritional value. The present study aimed to characterize sensory aspects like appearance and odor, and to estimate the proximate composition values, pH, collagen rate (COL), percentage amount of collagen per total protein (rel COL) from 20 raw beef minced meat samples received for routine laboratorial analysis. The data observed from 20 samples were compared to the physical-chemical results from minced meat prepared from nine distinct beef hind-quarters meat cuttings bought at butcher shop. Beef minced meat samples analyzed for routine laboratorial procedures revealed a wide range of moisture content (61.0%–81.8%), fat (1.2%–21.9%), protein (8.1%–21.1%), ash (0.5%–1.1%), COL (1.0%–4.9%), rel COL (5%–31%), and pH (5.34–6.55). On the other hand, minced meat samples prepared from meat bought at butcher shop showed smaller ranges of moisture content (64.1%–74.5%), fat (2.8%–16.3%), protein (19.3%–21.8%), ash (0.8%–1.1%), COL (1.0%–3.7%), rel. COL (5%–17%), and pH (5.52–5.80). Beef minced meat samples assayed for routine laboratorial analysis in general revealed acceptable odor and color, although 14 samples (70%) showed sensory appearance alteration due to variable amounts of connective tissue or aponevrosis, present in the meats.

Key Words. beef minced meat, collagen, proximate composition, pH, legislation

INTRODUÇÃO

O colágeno é a proteína mais abundante do corpo e está presente principalmente nos ossos, pele e tendões. No músculo, presente na forma de rede de fibras do tecido conjuntivo, perfaz de 1 a 9% da matéria seca desengordurada. Três estruturas colagenosas podem ser morfológicamente distinguidas – endomísio, envolvendo cada fibra muscular, perímísio, recobrando feixes destas fibras, e epimísio, circundando o músculo inteiro. A força de contração é transmitida aos tendões através dos feixes de tecido conjuntivo intramusculares que envolvem as fibras musculares individualmente¹.

As fibras colágenas quando fervidas em água por longo tempo formam gelatina e, no estado fresco são brancas, conferindo essa cor aos tecidos nos quais predominam. Os tendões, estruturas cilíndricas alongadas que ligam os músculos esqueléticos aos ossos, devido à sua riqueza em fibras colágenas, são brancos e inextensíveis².

Os aminoácidos glicina (percentual molar 33,0%), prolina (12,2%), hidroxiprolina (9,4%) e alanina (10,7%), perfazem 65% dos aminoácidos do colágeno. O colágeno é uma proteína totalmente carente de cisteína e triptofano. Sua unidade molecular é o tropocolágeno, o fio protéico mais longo que se conhece (PM 300.000) com 15 Å de diâmetro e 2.800 Å de comprimento, onde três hélices esquerdas se entrelaçam formando uma super-hélice direita³.

A cor amarelada é característica da fibra elástica, variedade de tecido conjuntivo que devido à sua cor, são chamadas fibras amarelas do conjuntivo, em comparação com as colágenas, que são as fibras brancas. As fibras elásticas cedem facilmente mesmo às trações mínimas, porém retomam sua forma inicial tão logo cessem as forças deformantes. O componente principal das fibras elásticas é a proteína elastina. O tecido elástico é pouco freqüente, sendo encontrado, por exemplo, nos ligamentos amarelos da coluna vertebral e na parede de alguns vasos sanguíneos de grosso calibre². A elastina é uma proteína muito próxima do colágeno, em constituição e atuação, apresentando ainda muito maior elasticidade e resistência à deformação devido a interligações de lisinonorleucina e desmosina³.

Os tecidos musculares animais, genericamente chamados de carne, são uma importante fonte de proteínas na dieta provendo um ótimo balanço de aminoácidos essenciais para o homem. Verificaram-se correlações negativas de 0,99 e 0,98 entre os valores de colágeno na carne e o conteúdo de aminoácidos essenciais de uma proteína, e também entre o conteúdo de colágeno e os valores de PER (Protein Efficiency Ratio)⁴. A proporção de aminoácidos essenciais em diferentes cortes de vitela, bovino e suíno decresceu linearmente quando o logaritmo do teor de hidroxiprolina aumentou⁵. Um aumento na taxa específica de colágeno em carnes e produtos cárneos reduziu o número absoluto de aminoácidos essenciais e desequilibrou seu balanço, diminuindo a qualidade do sistema protéico^{6, 7, 8}. Estes resultados indicam que a determinação química do teor de colágeno pode ser utilizada para prover uma estimativa rápida e de baixo custo da qualidade protéica⁴.

Pode-se esperar uma redução na qualidade sensorial com o aumento do teor de colágeno⁹. Músculos inteiros contendo elevados teores de colágeno podem ser inaceitavelmente duros¹⁰, sendo que, a carne com elevada proporção de tecido conjuntivo é considerada de baixa qualidade devido à redução da sua maciez e valor nutricional¹¹.

Nos Estados Unidos, Cross et al.¹² observaram que, a presença de tecido conjuntivo foi o maior problema associado com a aceitação da carne bovina moída. A carne da categoria “U.S. Utility” ou de menor qualidade, ou de cortes inferiores, produziu um produto moído que era inaceitavelmente elevado em tecido conjuntivo.

No Brasil¹³ resultados sobre os efeitos da mistura de 0-50% de tecido aponevrótico bovino [63% umidade; 15% gordura; 22% proteína; 0,8% cinzas; 1% hidroxiprolina; 8% colágeno e 37% relação colágeno pela proteína total] obtido da limpeza mecânica (Skyner – Townsend 7600) superficial de cortes cárneos de traseiros de bovinos, nas propriedades sensoriais e físico-químicas de carne moída e hambúrguer, apontaram na carne moída aumento ($p < 0,05$) dos teores de gordura (2%-8%), hidroxiprolina (0,1%-0,5%), colágeno (0,6%-4,2%) e relação colágeno pela proteína total (3%-20%), redução da umidade (76%-70%), cinzas (1,0%-0,9%) e pH (5,8-5,6), sem alteração significativa da proteína total (20-21%). A adição de 20% desse material em hambúrguer reduziu a intensidade da cor vermelha, aumentou a quantidade de aponevrose aparente, elevando a firmeza na mastigação. O teor de adição de 30% aumentou a mastigabilidade (número de mordidas), a quantidade de tecido conjuntivo residual na boca e reduziu o sabor característico. No teste de consumidor, com 57 participantes, a adição de 10% de tecido aponevrótico revelou uma carne moída aceitável na aparência, enquanto que, 20% resultou uma menor aceitação.

A presença da hidroxiprolina no colágeno é um aspecto único porque este aminoácido ocorre somente em poucas proteínas, a saber, elastina (1,6%), e em menor extensão na proteína do complemento do soro (C1q), e em algumas proteínas vegetais¹⁴. A hidroxiprolina é usada para indicar o teor de colágeno porque a mesma, comumente, não está presente em proteínas não colágenas. O método espectrofotométrico é o mais utilizado na quantificação do aminoácido hidroxiprolina pelos laboratórios de análise de rotina devido a sua precisão, simplicidade, baixo custo e rapidez¹.

A legislação da União Européia¹⁵, Directiva 2000/13 estabeleceu o conteúdo máximo de gordura para os ingredientes designados pelo termo “carne ... (nome da espécie animal)” não devendo exceder 15% para a carne de aves e coelhos, 30% para carne de suínos e 25% para carne de outros mamíferos. O conteúdo de tecido conjuntivo, que é calculado com base na relação percentual de colágeno pela proteína total, não deve exceder 10% para as carnes de aves e coelhos e 25% para a carne suína e outros mamíferos.

Segundo o Serviço de Inspeção e Segurança Alimentar Americano (Food Safety and Inspection Service¹⁶ - USDA) a grande diferença entre carne moída e hambúrguer é que a gordura somente pode ser adicionada ao segundo, sendo aceito

um teor máximo de 30% de gordura para ambos. Os produtos podem conter condimentos, mas não devem ser acrescidos de água, fosfatos, aglutinantes, substâncias ligadoras ou extensoras. O teor de carne de bochecha na carne moída deve ser limitado a 25% do total, quando em excesso, a presença deve ser declarada no rótulo, na lista de ingredientes.

Segundo a legislação de carne e produtos cárneos da Austrália¹⁷ a carne moída pode conter quantidades significativas de gordura. Não é necessária a declaração do teor de gordura da carne moída embalada ou não embalada, se não for feita alguma alegação ao teor de gordura. No entanto, o uso da terminologia “magra” ou “limpa” traduz a necessidade da declaração do teor de gordura.

No Brasil, as Normas Técnicas Especiais Relativas a Alimentos e Bebidas (São Paulo, 1978)¹⁸ estabeleceram para a carne bovina moída, segundo a NTA 3, ausência de cartilagens, de ossos e os teores máximos de 3% de aponevrose e 10% de gordura.

Segundo a Instrução Normativa nº83 de 21/11/03¹⁹, que trata do Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Carne Moída de Bovino, entende-se por carne moída o produto obtido a partir da moagem de massas musculares de carcaças de bovinos (aplica-se também ao produto obtido da carne de búfalos), seguido de imediato resfriamento ou congelamento, com teor máximo de 15% de gordura. A matéria-prima a ser utilizada deve estar isenta de tecidos inferiores como ossos, cartilagens, gordura parcial, aponevroses, tendões, coágulos, nodos linfáticos etc. A água no teor máximo de 3% consta como ingrediente opcional. Permite-se a utilização de carne industrial de manança, desde que as mesmas sejam previamente lavadas, escorridas, e submetidas a processo de resfriamento ou congelamento.

A indústria da carne para satisfazer o mercado e atingir públicos de diversas camadas sociais, tem produzido alimentos com características variadas. Com a elevação dos custos dos cortes cárneos, tradicionalmente utilizados na produção de carne bovina moída, algumas indústrias têm passado a incorporar fraudulentamente tecidos inferiores ou matérias-primas cárneas de baixo valor comercial, normalmente ricas em fibras de tecido conjuntivo, com a finalidade de redução de custos.

A influência do tecido conjuntivo colagenoso na qualidade sensorial (aparência, odor, textura e sabor), nutricional e preço, parece ter sido a base para a introdução de regulamentos técnicos em alguns países, estabelecendo limites mínimos para proteína cárnea não colágena e limites máximos para proteínas colágenas do tecido conjuntivo em produtos cárneos²⁰.

O objetivo deste trabalho foi caracterizar sensorialmente a aparência, e estabelecer valores de composição centesimal, pH e colágeno de amostras comerciais de carne bovina moída crua que deram entrada no laboratório do Instituto Adolfo Lutz (São Paulo) para análise, em comparação aos resultados de análise da carne bovina moída de cortes cárneos adquiridos no varejo. Como resultado espera-se a inclusão desses parâmetros físico-químicos no Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Carne Moída Bovina¹⁹.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

Cortes cárneos comerciais de bovino (peça inteira) das categorias patinho (*quadriceps femoris*), coxão mole (*semimembranosus*), coxão duro (*biceps femoris*), contrafilé de lombo (*longissimus dorsi*), músculo traseiro (*gastrocnemius*), lagarto (*semitendinosus*), picanha (*biceps femoris*), coração da alcatra (*gluteus medius*) e maminha da alcatra (*tensor fasciae latae*) foram adquiridos no varejo, na cidade de São Paulo. No período de 2000 a 2003 foram avaliadas 20 amostras comerciais de carne bovina moída crua que deram entrada para análise junto ao laboratório central do Instituto Adolfo Lutz (IAL), sendo 14 delas procedentes de Vigilâncias Sanitárias de Prefeituras Municipais do Estado de São Paulo, em atendimento às demandas de Departamentos de Nutrição de penitenciárias, hospitais e escolas públicas (merenda escolar), para verificação de alterações nas características sensoriais das amostras adquiridas por licitações públicas.

Métodos

As análises físico-químicas foram iniciadas logo após a entrada das amostras de carne moída no laboratório, evitando-se o congelamento das mesmas, ou no mesmo dia da aquisição dos cortes cárneos no mercado varejista. Os cortes cárneos foram repicados com a aponevrose (tecido conjuntivo) e a gordura de cobertura (não houve limpeza interna ou externa), adotando condições industriais de processo, e moídos duas vezes em moedor (CAF 8) utilizando disco de 5mm. Após a incorporação de possíveis exsudatos, as amostras foram homogeneizadas em multiprocessador doméstico (marca Arno). As análises foram realizadas em duplicata, seguindo os métodos preconizados pelo Instituto Adolfo Lutz²¹. A análise das substâncias voláteis (umidade) foi realizada em estufa a 102-105°C, até peso constante; proteínas segundo o método de Kjeldahl utilizando sistema automatizado (Gehardt), gorduras pela extração com éter etílico em extrator tipo Soxhlet, cinzas após incineração em mufla a 550°C e pH pela inserção na massa cárnea de um eletrodo de punção acoplado a um potenciômetro (Hanna Instruments – microprocessador digital HI9321). A determinação do conteúdo de colágeno (hidroxiprolina x 8) foi realizada através da quantificação do aminoácido hidroxiprolina. As amostras foram hidrolisadas com ácido clorídrico 6M a 110°C por 8h, sob refluxo. A hidroxiprolina oxidada a pirrol pela cloramina T em tampão citrato-acetato pH 6,0, converteu-se em um complexo avermelhado (absorção a 559 nm) pela reação com o reagente de Ehrlich (p-dimetilaminobenzaldeído em ácido perclórico/2-propanol). O teor de colágeno relativo foi obtido da relação percentual do tecido conjuntivo pela proteína total.

As amostras de carne bovina moída crua da rotina de análise, foram caracterizadas por consenso no Laboratório de Análise Sensorial quanto aos atributos de aparência e odor, por uma equipe de 3 a 7 julgadores com discriminação para odores básicos, acuidade normal ou superior para cores e experiências

na avaliação de carnes. Na descrição visual da aparência, avaliou-se a cor e teores relativos de aponevrose (fibras de tecido conjuntivo) sendo classificadas quanto a proporção em pequena (P), moderada (M) e elevada (E). O odor foi avaliado como característico de carne crua e sem detecção de odores estranhos (C) ou alterado (A), procurando-se descrever as sensações percebidas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta os resultados das avaliações físico-químicas relativas a composição centesimal, teor de colágeno (COL), relação percentual de colágeno pela proteína total (COL rel.) e valores de pH, de carnes de cortes do traseiro bovino, moídas com a gordura e tecido conjuntivo intramuscular e de cobertura. Os resultados revelaram diferenças ($p < 0,05$) entre os cortes cárneos para todos os parâmetros físico-químicos avaliados. A carne moída de patinho não diferiu da carne moída de lagarto e apresentou o maior teor de umidade (74,5%), enquanto

a carne moída de contrafilé apresentou o menor valor (64,1%). O teor de gordura foi menor para o patinho (2,8%) que não diferiu do coxão duro, e o maior valor ficou para o contrafilé (16,3%), que apresentava moderada proporção de gordura de cobertura. Na quantificação do teor de proteína, o maior valor foi para a carne moída de coxão duro (21,8%) que não diferiu do músculo, lagarto, e alcatra, ficando o menor teor para o contrafilé (19,3%). A porcentagem de cinzas foi maior para o patinho (1,1%) que diferiu somente da carne de contrafilé (0,8%) e este último não diferindo da alcatra, picanha e músculo. As variações nos teores de COL e COL rel. foram amplas, sendo os menores valores para a carne moída de patinho (1,0% e 5%) que não diferiu do coxão mole, lagarto, picanha e maminha, ficando o músculo com os maiores teores (3,7% e 17%). A alcatra revelou o maior valor de pH (5,84) diferindo das demais categorias de cortes cárneos e o coxão duro apresentou o menor valor (5,52), não diferindo do lagarto.

A Tabela 2 apresenta os resultados dos parâmetros físico-químicos e sensoriais de 20 amostras de carne moída recebidas para análise no laboratório (N1-N20), de 13 marcas diferentes, designadas pelas letras do alfabeto (A-M). Os intervalos de

Tabela 1. Composição aproximada, colágeno e pH de cortes cárneos comerciais de bovino*.

| Cortes cárneos | Composição | | | | Colágeno | | Valor de pH |
|-------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|--------------|-------------------------------------|
| | Umidade (%) | Gordura (%) | Proteína (%) | Cinzas (%) | COL (%) | COL rel. (%) | |
| Patinho | 74,5^a (0,2) | 2,8^c (0,1) | 21,1^b (0,0) | 1,1^a (0,02) | 1,0^d (0,01) | 5 | 5,56^c (0,01) |
| Coxão mole | 72,1^c (0,3) | 5,5^c (0,1) | 21,0^b (0,2) | 1,0^a (0,01) | 1,0^d (0,1) | 5 | 5,56^c (0,02) |
| Coxão duro | 73,3^b (0,1) | 3,3^{d,c} (0,3) | 21,8^a (0,3) | 1,0^a (0,01) | 1,8^c (0,03) | 8 | 5,52^f (0,01) |
| Contrafilé | 64,1^d (0,06) | 16,3^a (0,04) | 19,3^d (0,1) | 0,8^b (0,1) | 1,8^c (0,03) | 9 | 5,66^d (0,01) |
| Músculo | 72,9^b (0,1) | 5,2^c (0,1) | 21,3^{a,b} (0,2) | 0,9^{a,b} (0,1) | 3,7^a (0,2) | 17 | 5,78^b (0,01) |
| Lagarto | 74,1^a (0,1) | 3,8^d (0,4) | 21,3^{a,b} (0,1) | 1,0^a (0,03) | 1,2^d (0,1) | 6 | 5,54^{e,f} (0,01) |
| Picanha | 71,9^c (0,4) | 6,3^b (0,01) | 20,5^c (0,1) | 1,0^{a,b} (0,02) | 1,3^{e,d} (0,3) | 6 | 5,80^b (0,01) |
| Alcatra | 72,1^c (0,02) | 5,4^c (0,02) | 21,4^{a,b} (0,1) | 1,0^{a,b} (0,03) | 2,7^b (0,1) | 13 | 5,84^a (0,01) |
| Maminha | 72,0^c (0,1) | 5,6^c (0,04) | 21,1^b (0,03) | 1,0^a (0,01) | 1,3^d (0,1) | 6 | 5,74^c (0,01) |
| Valor min. | 64,1 | 2,8 | 19,3 | 0,8 | 1,0 | 5 | 5,52 |
| Valor max. | 74,5 | 16,3 | 21,8 | 1,1 | 3,7 | 17 | 5,84 |
| Mediana | 72,1 | 5,4 | 21,1 | 1,0 | 1,3 | 6 | 5,66 |
| Média | 71,9 | 6,0 | 21,0 | 1,0 | 1,8 | 8 | 5,67 |
| DP | 3,1 | 4,0 | 0,7 | 0,1 | 0,9 | 4 | 0,13 |
| CV | 4,3 | 66,9 | 3,4 | 8,1 | 51,2 | 49 | 2,22 |

*Cortes cárneos de bovino adquiridos no varejo na cidade de São Paulo.

COL = colágeno. COL rel. = (COL / proteína total) x 100.

Medidas de variabilidade: () DP = desvio padrão. CV = coeficiente de variação (%).

Tabela 2. Parâmetros físico-químicos e sensoriais de carne bovina moída comercial.

| Carne bovina moída | Marca | Parâmetros físico-químicos | | | | | | | Parâmetros sensoriais | | | |
|--------------------|------------------|----------------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|---------------------|-------------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------|-------------------|
| | | Umidade (%) | Gordura (%) | Proteína (%) | Cinzas (%) | COL (%) | COL rel. (%) | Valor pH | Numero julgad. ¹ | Aponev. visual ² | Cor ³ | Odor ⁴ |
| N1* | A | 72,8 (0,1) | 6,7 (0,2) | 19,4 (0,3) | 1,1 (0,1) | 2,2 (0,1) | 11 (0,01) | 5,86 | 3 | M | V | C |
| N2* | A | 69,5 (0,1) | 13,6 (0,2) | 14,6 (0,1) | 0,7 (0,01) | 4,5 (0,1) | 31 (0,02) | 5,34 | 3 | E | V | C |
| N3* | A ^{5**} | 81,8 (0,03) | 7,1 (0,01) | 8,1 (0,2) | 0,5 (0,01) | 2,1 (0,3) | 26 (0,02) | 6,10 | 3 | E | VE | C |
| N4* | A | 73,7 (0,1) | 8,1 (0,5) | 17,3 (0,5) | 0,7 (0,00) | 2,5 (0,2) | 14 (0,02) | 5,53 | 4 | E | R | C |
| N5* | A | 75,2 (0,2) | 6,4 (0,3) | 17,5 (0,4) | 0,7 (0,05) | 3,3 (0,2) | 19 (0,00) | 5,84 | 4 | E | RA | C |
| N6* | B | 74,0 (0,1) | 7,4 (0,2) | 17,1 (0,2) | 0,8 (0,04) | 3,0 (0,1) | 18 (0,01) | 5,92 | 3 | E | VP e V | C |
| N7* | C ^{***} | 76,8 (0,1) | 7,0 (0,1) | 14,6 (1,0) | 0,8 (0,01) | 2,7 (0,5) | 19 (0,03) | 6,55 | 3 | E | V | A |
| N8* | D | 70,6 (0,6) | 7,8 (0,2) | 20,6 (0,6) | 0,9 (0,1) | 4,9 (0,01) | 24 (0,01) | 5,98 | 3 | E | VP e V | C |
| N9* | E | 61,0 (0,2) | 21,9 (0,7) | 16,6 (0,6) | 0,7 (0,03) | 4,9 (0,05) | 30 (0,02) | 6,10 | 3 | E | RA e MA | C |
| N10 | F ⁶ | 71,6 (0,6) | 7,5 (0,8) | 19,5 (0,7) | 1,0 (0,01) | 3,0 (0,03) | 15 (0,00) | 5,79 | 5 | E | V | C |
| N11 | F ⁷ | 71,6 (0,2) | 6,3 (0,8) | 21,1 (1,1) | 1,1 (0,02) | 2,6 (0,1) | 12 (0,01) | 5,64 | 4 | M | V | C |
| N12 | G ⁵ | 76,2 (0,1) | 1,2 (0,1) | 20,9 (0,03) | 1,1 (0,04) | 1,6 (0,03) | 8 (0,02) | 5,50 | 3 | P | V | C |
| N13 | H | 73,1 (0,2) | 6,8 (0,1) | 19,2 (0,2) | 0,9 (0,02) | 2,5 (0,1) | 13 (0,02) | 5,74 | 4 | M | V | C |
| N14 | I | 72,2 (1,6) | 13,8 (0,8) | 13,0 (0,4) | 1,1 (0,01) | 3,3 (0,01) | 25 (0,02) | 5,82 | 3 | E | V | C |
| N15* | J | 70,3 (0,5) | 13,6 (1,2) | 15,9 (0,3) | 0,7 (0,01) | 4,3 (0,7) | 27 (0,01) | 5,80 | 3 | E | V | C |
| N16 | K ⁵ | 74,5 (0,2) | 2,8 (0,1) | 21,1 (0,0) | 1,0 (0,01) | 1,0 (0,01) | 5 (0,00) | 5,59 | 5 | P | V | C |
| N17* | L | 74,7 (0,1) | 6,2 (0,6) | 17,9 (0,6) | 0,9 (0,05) | 3,4 (0,3) | 19 (0,03) | 5,96 | 3 | E | V | C |
| N18* | L ⁸ | 72,2 (0,2) | 8,2 (0,1) | 18,2 (0,03) | 1,1 (0,1) | 1,6 (0,2) | 9 (0,01) | 5,80 | 3 | M | V e MA | C |
| N19* | L | 71,7 (0,5) | 11,0 (0,4) | 16,8 (0,3) | 0,7 (0,05) | 2,8 (0,2) | 17 (0,01) | 6,03 MA | 7 | E | VP e MA | C |
| N20* | M | 70,5 (0,6) | 12,0 (0,1) | 14,8 (0,4) | 0,8 (0,1) | 3,2 (0,1) | 22 (0,01) | 6,15 | 4 | E | RA | C |
| Valor min. | | 61,0 | 1,2 | 8,1 | 0,5 | 1,0 | 5 | 5,34 | | | | |
| Valor max. | | 81,8 | 21,9 | 21,1 | 1,1 | 4,9 | 31 | 6,55 | | | | |
| Mediana | | 72,5 | 7,4 | 17,4 | 0,9 | 2,9 | 18 | 5,83 | | | | |
| Média | | 72,7 | 8,8 | 17,2 | 0,9 | 3,0 | 18 | 5,85 | | | | |
| D.P | | 3,9 | 4,5 | 3,2 | 0,2 | 1,1 | 7 | 0,27 | | | | |
| C.V. | | 5,4 | 51,6 | 18,5 | 20,7 | 36,1 | 41 | 4,62 | | | | |

NI a N20: codificações das amostras que deram entrada para análise junto ao laboratório central do Instituto Adolfo Lutz *Amostras enviadas por Vigilâncias Sanitárias de Prefeituras Municipais do Estado de São Paulo com reclamações referente alterações nas características sensoriais **Pelo exame microscópico revelou cascas de banana ***Revelou 404 ppm de SO2 COL = colágeno COL rel. = (COL / proteína total) x 100 ¹Número de julgadores ²Proporção visual de aponevrose: P = pequena; M = moderada; E = elevada ³Cor: V = vermelha ; VE=vermelha com pontos escuros R= rósea RA = róseo-avermelhada VP= vermelho-pardacenta; MA = marrom-avermelhada ⁴Odor: C = característico de carne crua, não sendo detectado odores estranhos; A= alterado ⁵Patinho ⁶Músculo ⁷Recorte de alcatra (aranha) ⁸Coxão mole Medidas de variabilidade: () ou DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação (%)

variação na composição centesimal foram muito amplos, revelando as seguintes faixas de valores: umidade 61,0%-81,8%; gordura 1,2%-21,9%; proteína 8,1%-21,1%; cinzas 0,5%-1,1%; COL 1,0%-4,9% e COL rel. 5%-31%. Os valores de pH se apresentaram no intervalo de 5,34-6,55. Os extremos superiores apresentaram-se elevados para os teores de umidade (81,8%), gordura (21,9%), COL (4,9%) e COL rel. (31%), e os limites inferiores de proteína (8,1%) e cinzas (0,5%) revelaram-se muito reduzidos, em comparação aos valores correspondentes às medianas de carne moída adquirida no varejo (Tabela 1), respectivamente, umidade (72,1%), gordura (5,4%), proteína (21,1%), cinzas (1,0%), COL (1,3%) e COL rel. (6%). Verificou-se que o produto N3 (marca A), mesmo apresentando elevados teores de umidade (81,8%), COL rel. (26%), pH (6,1) e baixo teor de proteína (8,1%), foi classificado pelo fabricante como carne

moída de patinho (Figura 1). Neste mesmo produto (N3), pela análise microscópica constatou-se a fraude pela presença de cascas de banana.

O teor de gordura acima do limite estabelecido de 10% segundo as Normas Técnicas Especiais Relativas a Alimentos e Bebidas (NTA 3)¹⁸ foi observado em 6 amostras. Somente uma amostra apresentou teor de gordura acima de 15%, limite máximo estabelecido pela Instrução Normativa nº83/03¹⁹. Verificou-se a frequência de 8 amostras de carne bovina moída, no total de 20, com valores de pH acima de 5,9 (valor limite máximo para exportação para a União Européia, segundo Circular nº 192/98/DCI/DIPOA).

Segundo a Tabela 2, a caracterização sensorial da aparência da carne moída revelou elevada (E) proporção de aponevrose para 14 amostras, moderada (M) para 4 e pequena

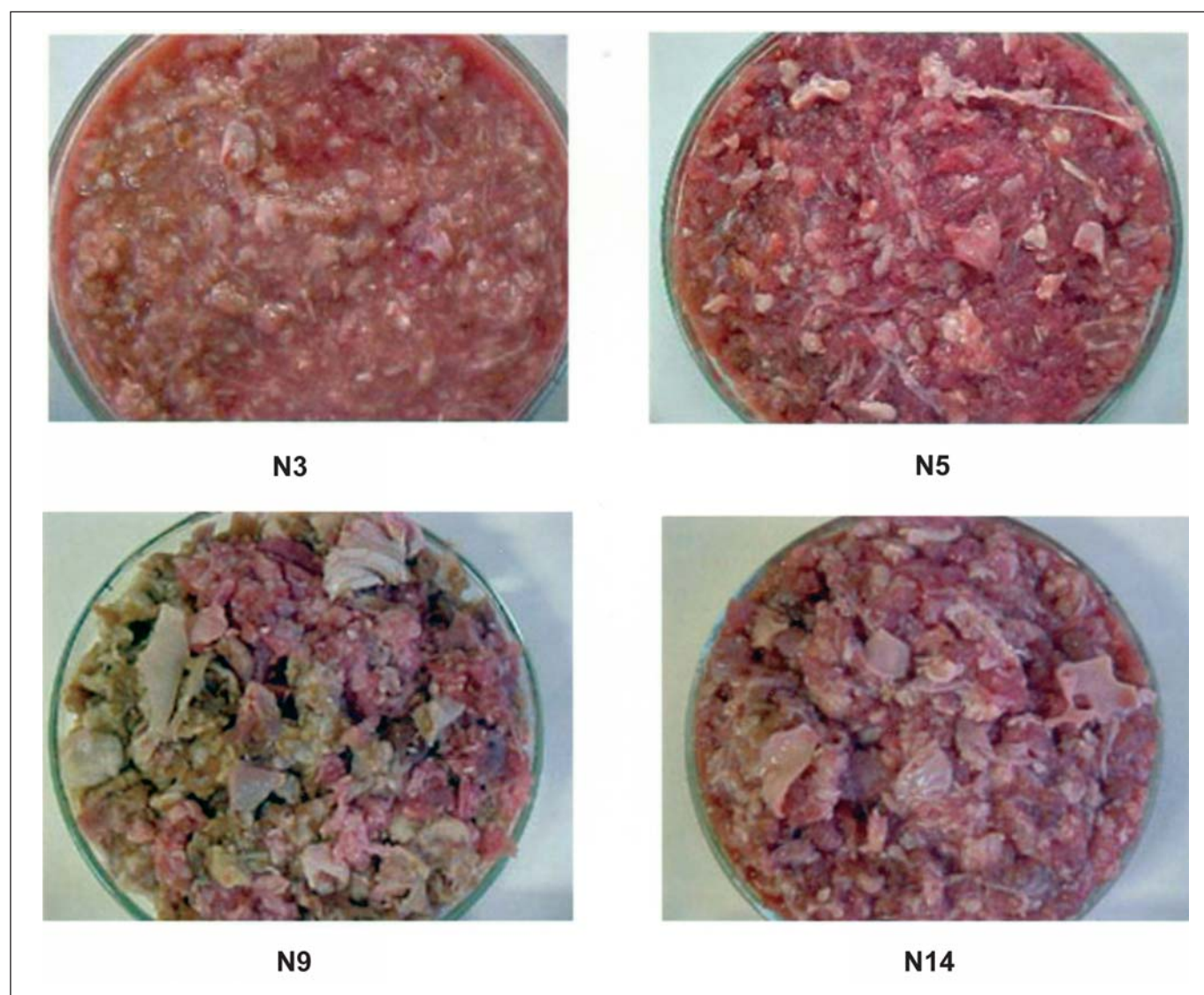


Figura 1. Amostras de carne bovina moída (N3 e N5 marca A; N9, marca E; N14, marca I).

(P) a 2 unidades. A cor variou de rósea (principalmente nas amostras com elevada proporção de aponevrose) a marrom-avermelhada. O odor se apresentou nas amostras característico a carne crua, não sendo detectados odores estranhos, exceto para N7 que apresentou odor alterado, embora ainda revelasse cor vermelha pela adição fraudulenta de dióxido de enxofre (SO₂). A Figura 1 apresenta ilustração de amostras de carne moída bovina (N3 e N5 marca A; N9, marca E; N14, marca I) que na caracterização sensorial revelaram elevada proporção de aponevrose ou tecidos inferiores.

Na comparação dos valores correspondentes às medianas das amostras de carne bovina moída obtida de cortes cárneos do traseiro adquiridos no varejo (Tabela 1) e amostras que deram entrada para análise no laboratório (Tabela 2), nos parâmetros

físico-químicos de umidade (72,1% e 72,5%), gordura (5,4% e 7,4%), proteína (21,1% e 17,4%), cinzas (1,0% e 0,9%), COL (1,3% e 2,9%), COL rel. (6% e 18%) e pH (5,66 e 5,83), ficam estabelecidas as diferenças percentuais, onde foram superiores os teores principalmente de gordura (37%), COL (123%), COL relativo (200%) e valor de pH (3%), revelando-se inferiores os teores de proteína (18%) e cinzas (10%), sem alteração nos valores de umidade.

Na Figura 2 tem-se, respectivamente, a distribuição de freqüência dos teores de COL e COL rel., podendo-se observar elevação dos valores percentuais de colágeno nas amostras que deram entrada no laboratório para análise (N1 a N20) em comparação com a carne moída de cortes cárneos de traseiro bovino adquiridos no varejo, podendo-se estabelecer

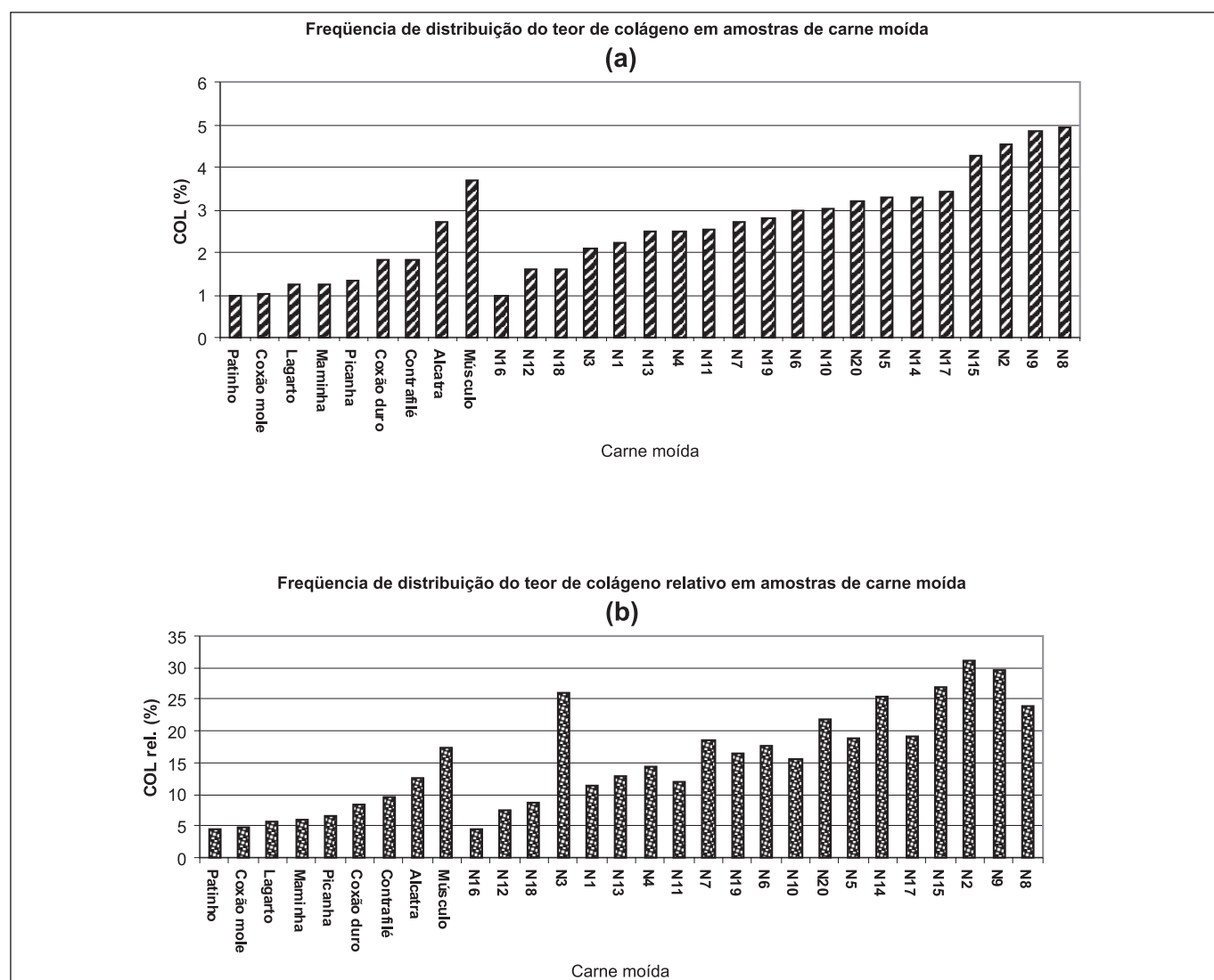


Figura 2. (a) Distribuições de freqüências dos teores de colágeno (COL) e (b) relação percentual de colágeno pela proteína total (COL rel.) de amostras de carne bovina moída adquirida no varejo (patinho, coxão mole, lagarto, maminha, picanha, coxão duro, contrafilé, alcatra e músculo) e da rotina de análise laboratorial (N1 a N20).

neste trabalho, a existência de uma relação direta entre os valores analíticos de colágeno e a presença de aponevrose como percebida pela equipe de julgadores na caracterização sensorial.

No Brasil, desconhecem-se relatos completos referentes à análise quantitativa de composição centesimal e teor de colágeno de carne moída dos diferentes cortes comerciais de traseiro bovino. Os resultados deste trabalho revelaram teores de 9; 5 e 6 % de COL rel., respectivamente para as carnes moídas de contrafilé, coxão mole e lagarto, enquanto que os resultados de Nguyen e Zarkadas⁶ mostraram valores moderadamente inferiores de 3,4% para o contrafilé de touro, 3,04% e 3,31% para o coxão mole e lagarto de vaca de 8 anos, através da análise do aminoácido hidroxilisina. O resultado de colágeno absoluto para a carne moída de lagarto (4,6% base seca) está de acordo com o resultado (4,75% base seca) encontrado por Bailey e Light⁹, contudo o teor de colágeno para a carne de contrafilé (2,76% base seca)⁹ mostrou-se inferior ao obtido nesta pesquisa (5,0% base seca). Estes resultados superiores de colágeno comparado à literatura podem em parte ser explicados, pela adoção da condição de não remover o tecido conjuntivo de cobertura e entremeado aos cortes cárneos.

Na rotina de análise, a proporção máxima de aponevrose de 3% estabelecida pela Norma Técnica de Alimentos e Bebidas (NTA 3)¹⁸, somente poderá ser avaliada, se houver um valor analítico legalmente estabelecido para o teor correspondente de proteínas do colágeno. Della Torre et al.¹³ substituíram na carne moída categoria patinho 0 - 50% de tecido aponevrótico obtido da limpeza superficial mecânica de cortes cárneos de traseiro de bovinos, e obtiveram para o teor de substituição de 3%; 5%; 10%; 15% e 20% resultados analíticos de 0,8%; 1,1%; 1,4%, 1,7% e 2,6% de colágeno e 4%; 5%; 7%; 9% e 13% de colágeno relativo a proteína total.

Os valores máximos estabelecidos pela União Européia¹⁵ para carne bovina, de 25% de gordura e 25% de COL rel, e nos Estados Unidos¹⁶ de 30% de gordura para a carne moída, não traduzem os resultados normalmente obtidos na rotina de análise para a carne bovina moída. Uma vez que a presença de elevados teores de fibras de tecido conjuntivo (aponevrose), cor vermelha clara e aparência exsudativa são os principais fatores associados à menor aceitação da carne moída bovina, este trabalho sugere a inclusão de teor mínimo de proteína total, teores máximos de umidade, colágeno, colágeno relativo à proteína total e valor máximo de pH, junto ao Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Carne Moída Bovina¹⁹.

CONCLUSÕES

Quarenta por cento das amostras de carne bovina moída comercial encaminhadas ao laboratório para análise apresentavam pH maior que 5,9, enquanto todas as amostras de carne moída preparadas a partir de cortes obtidos em açougue apresentaram pH abaixo desse valor.

A avaliação sensorial indicando que 70% das amostras de carne bovina moída comercial apresentavam alteração da aparência pelo excesso de aponevrose e fibras do tecido conjuntivo colagenoso foi confirmada pelo maior teor de colágeno dessas carnes que variaram entre 5 e 31% da proteína total, enquanto os valores das carnes preparadas de cortes adquiridos em açougue ficou entre 5 e 17%. O teor de gordura correspondente à mediana apresentou-se superior em 37% e, conseqüentemente, o nível de proteína ficou reduzido em 18%, como resultado da alteração da composição original característica da carne bovina muscular. O valor de colágeno relativo de 25% preconizado pela União Européia seria demasiado alto em função dos resultados desse estudo.

Os resultados de composição centesimal e colágeno obtidos podem auxiliar o estabelecimento de parâmetros físico-químicos de identidade e qualidade, referentes aos teores mínimos de proteína total e máximos de umidade e colágeno, junto ao regulamento técnico específico, contribuindo para o efetivo controle laboratorial de rotina na verificação de fraudes, assegurando em parte o valor nutritivo e sensorial da carne bovina moída oferecida aos consumidores.

REFERÊNCIAS

1. Etherington DJ, Sims TJ. Detection and estimation of collagen. *J Sci Food Agric* 1981;32:539-46.
2. Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia básica*. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1990. p. 65-100.
3. Farfán JA. *Química de proteínas aplicada à ciência e tecnologia de alimentos*. 2. ed. Campinas: UNICAMP; 1994. 134 p. (Série Manuais).
4. Lee YB, Elliott JG, Rickansrud DA, Hagberg EC. Predicting protein efficiency ratio by the chemical determination of connective tissue content in meat. *J Food Sci* 1978;43:1359-62.
5. Dvorák Z, Vognarová I. Nutritive value of the proteins of veal, beef and pork determined on the basis of available essential amino acids or hydroxyproline analysis. *J Sci Food Agric* 1969;20:146-50.
6. Nguyen Q, Zarkadas CG. Comparison of the amino acid composition and connective tissue protein contents of selected bovine skeletal muscles. *J Agric Fd Chem* 1989;37:1279-86.
7. Rogov IA, Tokaev ES, Kovalev YI. Collagen and its rational content in meat products 2: experiments with growing rats. *Meat Sci* 1992;31:147-53.
8. Zarkadas CG. Assessment of the protein quality of selected meat products based on their amino acid profiles and their myofibrillar and connective tissue protein contents. *J Agric Fd Chem* 1992;40:790-800.
9. Bayley AJ, Light ND. *Connective tissue in meat and meat products*. London: Elsevier; 1989. 355 p.
10. Sadler DHN, Young OA. The effect of preheated tendon as a lean meat replacement on the properties of fine emulsion sausages. *Meat Sci* 1993;35:259-68.
11. Steinhart H, Bosselmann A, Möller C. Determination of pyridinolines in bovine collagenous tissues. *J Agric Fd Chem* 1994; 42:1943-7.
12. Cross HR, Green EC, Stanfield MS, Franks WJ Jr. Effect of quality grade and cut formulation on the palatability of ground beef patties. *J Food Sci* 1976;41:9-11.
13. Della Torre JCM, Rodas MAB, Rodriguez RSM, Silva CR, Beraquet NJ. Effects of connective proteins on chemical composition and sensory properties of ground beef. In: 49th International Congress of Meat Science and Technology; 2nd Brazilian Congress of Meat Science and Technology; 2003; Campinas, BR. Campinas: CTC/ITAL, 2003. p.255-6.

14. Sims TJ, Bailey AJ. Connective tissue. In: Lawrie R. Developments in meat science – 2. London: Applied Science; 1981. p.29-59.
15. União Européia. Parlamento Europeu e Conselho. Directiva 2000/13 de 20 de março de 2000. Relativa à aproximação das legislações do Estados-Membros respeitantes à rotulagem, apresentação e publicidade dos géneros alimentícios. Jornal Oficial 2000 maio 06; n° L 109:0029-0042. [citado 06 ago 2003]. Disponível em: <http://www.europa.eu.int/eur-lex>
16. Estados Unidos. Department of Agriculture. Food Safety and Inspection Service. Code of Federal Regulations: Definitions and standards of identity or composition from the U.S. Government Printing Office via GPO acess. Revised as of January 1, 2001. CITE: 9CFR319, p.294-312. [citado 21 jun 2002]. Disponível em: <http://www.acess.gpo.gov/nara/cfr/index.html>.
17. Austrália. Food Standards Code. User guide to standard 2.2.1 – meat and meat products. July 2001. [citado 23 jun 2003]. Disponível em: <http://www.foodstandards.gov.au/mediarelatespublications/factsheets/industryfactsheetsfsc/meateggssandfish>
18. São Paulo (Estado). Decreto n. 12486 de 20 de outubro 1978. Dispõe sobre as normas técnicas especiais relativas a alimentos e bebidas (NTA). Diário Oficial do Estado de São Paulo, São Paulo 1978 out 21;Sec.1:3-4.
19. Brasil. Instrução Normativa n. 83 de 21 de novembro de 2003. Dispõe sobre os regulamentos técnicos de identidade e qualidade de carne bovina em conserva (Corned Beef) e carne moída de bovino. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília (DF) 2003 dez 03; Sec.1:13.
20. Board PW, Montgomery W, Rutledge PJ. Collagen content of some australian canned meats. J Sci Food Agric 1978;29:569-73.
21. Instituto Adolfo Lutz. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. 4. ed. Brasília: ANVISA; 2005.

Estudo da influência do cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal) sobre a concentração sérica de glicose

Study of cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal) influence on the seric concentration of glucose.

RIALA6/1045

Lucia K. O. YUYAMA^{1*}; Zânia R. F. PEREIRA²; Jaime P. L. AGUIAR¹; Danilo F. SILVA FILHO¹; Risonilce F. S. SOUZA¹; Antonia P. TEIXEIRA²

^{1*} Endereço para correspondência: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, INPA/CPCS. Av. André Araújo 2936, Aleixo, Manaus-AM. CEP- 69.060-001. E mail: yuyama@inpa.gov.br

² Curso de Pós-graduação em Ciência de Alimentos. UA. Alexandre Amorim 330 Aparecida. Aparecida. Manaus-AM. CEP 69010-300.

Recebido: 06/10/2004 – Aceito para publicação: 04/08/2005

RESUMO

Foi avaliada a influência do cubiu sobre a concentração sérica de glicose em ratos diabéticos. Os frutos procedentes da Estação experimental do Ariaú do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia foram despolpados, secos e analisados quanto à composição centesimal, fibra alimentar, elementos minerais e utilizados em ratos diabéticos induzidos artificialmente com estreptozotocina na dose de 40 mg/kg. Após o período de 15 dias, os animais foram selecionados de acordo com a concentração de glicose (valores superiores a 300 mg/dL) e distribuídos em blocos inteiramente casuais de dois grupos com dez ratos cada, tendo como base a ração de caseína - AIN, 93M, variando apenas a fonte de fibra alimentar. Os resultados demonstraram que o cubiu apresentou baixo teor energético (24 kcal/100g) e presença de fibra alimentar (3,6%). Os ratos que receberam a fibra oriunda do cubiu apresentaram uma redução de glicose no sangue ao final da 4ª semana (224,4±85,5 mg/dL) quando comparado com o grupo controle (351,4 ± 139,0 mg/dL). Tais constatações são sugestivas da influência do fruto de cubiu na redução da concentração de glicose em ratos.

Palavras-Chave. cubiu, fibra alimentar, diabetes, ratos.

ABSTRACT

The influence of cubiu on the glucose concentration in diabetic rats blood was evaluated. Diabetes was experimentally induced by injecting streptozotocin (40 mg/kg) into rat tail vein after a 24 hours fast. After 15 days, animals were selected according to their blood glucose concentration (values above 300 mg/dL), and distributed into completely randomized blocks of two groups composed of 10 mice each; the mice were fed with a casein - based diet (AIN, 93M), using two sources of alimentary fiber. The experimental study was done for 28 days, and blood samples were weekly collected from mice for performing glucose dosages. Mice that received the cubiu fiber presented reduced blood glucose value at the end of 4th week (224.4±85.5 mg/dL) when compared with control group (351.4±139.0 mg/dL). Such data suggest the influence of cubiu in reducing the glucose concentration in mice blood.

Key Words. cubiu, alimentary fiber, diabetes, mice

INTRODUÇÃO

A região amazônica, apesar de ser a maior detentora de recursos naturais, apresenta muitas das espécies, como o cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal), sem a sua contribuição nutricional totalmente elucidada. De sabor e aroma agradáveis, o cubiu é um fruto exótico de diferentes tamanhos, formatos e de sabor inigualável, normalmente consumido *in natura* como petisco ou na forma de sucos, doces, geléias e no preparo de pratos à base de carnes e peixes¹. Como medicamento é utilizado popularmente no controle de prurido da pele e redução dos níveis elevados de colesterol, glicose e ácido úrico², necessitando ainda de comprovação científica.

Estudos epidemiológicos têm revelado a existência de uma forte correlação entre a incidência de diabetes e o consumo de alimentos refinados, o que permitiu o estabelecimento de uma associação entre as fibras alimentares e o metabolismo de carboidratos^{3,4,5}. A ingestão média de fibra alimentar pela população brasileira na década de 70 era de 19,3g/dia, caindo para 16,0g/dia na década de 80 e chegando a 12,4 g/dia na década de 90. Esses resultados refletem uma significativa queda global na ingestão de fibra alimentar durante os últimos trinta anos, possivelmente decorrentes da mudança de hábitos alimentares da população, aliados a mudanças no estilo de vida e alterações no perfil sócio-econômico do país⁶.

Considerando que no Brasil o diabetes atinge aproximadamente cinco milhões de pessoas, em torno de 8% da população, no estágio de vida entre 30 a 69 anos⁷ e, sendo a doença cardiovascular a principal responsável pela redução da sobrevida desses pacientes diabéticos⁸, a busca por fontes naturais objetivando a prevenção dessas doenças são estratégias que devem ser intensificadas. Neste contexto, avaliou-se a influência do cubiu sobre a concentração sérica de glicose em ratos diabéticos induzidos artificialmente.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados frutos de cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal) oriundos da Estação Experimental do Ariau, do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia-INPA. Os frutos de uma mesma variedade foram coletados em estágio de amadurecimento comercial, selecionados, lavados, retirados os pedúnculos, cortados em pequenas porções e secos em estufa com circulação de ar forçado a 60° C até peso constante para a determinação da umidade. Em seguida, foram pulverizados, homogeneizados e acondicionados em sacos plásticos devidamente lacrados e armazenados em freezer até o momento da utilização na forma de ração. Considerando que muitas vezes os frutos de cubiu são utilizados pelas populações tradicionais em substituição ao tomate, o presente estudo avaliou o fruto inteiro (incluindo casca, semente e polpa). Para a determinação da fibra alimentar do cubiu seguiu-se a metodologia de Asp et. al.⁹ e os demais componentes (umidade, proteína, lipídios e cinzas) da AOAC¹⁰.

O carboidrato “disponível” foi calculado a partir da diferença das frações anteriores. Para a determinação de energia utilizou-se os fatores de conversão: 4, 4 e 9 para proteína, glicídios e lipídios respectivamente.

Para a composição do delineamento experimental foram utilizados ratos machos da linhagem *Wistar* (*Rattus norvegicus*, var. *albinus*. *Rodentia: Mammalia*), pesando em média 250g, procedentes do Biotério do INPA. A indução do diabetes foi viabilizada por meio da utilização da estreptozotocina dissolvida em solução tampão de citrato de sódio 0,01 M, pH 4,5 na concentração de 32,5 mg/mL e injetada na veia da cauda dos ratos mantidos previamente em jejum de 24 horas na dose de 40 mg/kg. Em seguida, os mesmos foram mantidos em gaiolas individuais e alimentados por 15 dias com ração comercial. Após esta etapa, os ratos, que apresentaram concentração sérica de glicose superior a 300mg/dL foram utilizados para compor o delineamento experimental em blocos inteiramente casualizados de dois grupos com dez repetições cada, variando apenas a fonte de fibra alimentar. As rações foram preparadas segundo as recomendações de Reeves et al.¹¹ (Tabela 1). O período experimental foi de 28 dias, sendo controlado diariamente o consumo e semanalmente o peso e coleta de sangue (cauda) para a determinação da glicose de acordo com a técnica descrita por Trinder¹². A avaliação histopatológica foi viabilizada de acordo com o método de Michelani¹³. Utilizou-se a análise de variância e para efeito de comparação entre as médias dos grupos, o teste de Tukey, com 5% de probabilidade¹⁴.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com as análises da composição química do cubiu, verificou-se alto teor de umidade e presença de fibra

Tabela 1. Composição percentual básica das rações oferecidas aos ratos dos diferentes grupos.

| Ingredientes | Grupo 1 | Grupo 2 |
|---------------------------------|---------|---------|
| Caseína | 14,0% | 14,0% |
| L – cistina | 0,18% | 0,18% |
| Óleo soja | 4,0% | 4,0% |
| Fibra(celulose microcristalina) | 10,0% | - |
| Fibra do cubiu | - | 10,0% |
| Sacarose | 10,0% | 10,0% |
| Mistura salina | 3,5% | 3,5% |
| Mistura vitamínica | 1,0% | 1,0% |
| Bitartrato de colina | 0,25% | 0,25% |
| Amido de milho (qsp 100%) | 57,07% | 36,77% |

*De acordo com as recomendações de Reeves et al, 1993¹¹.

Grupo 1: ratos diabéticos que receberam 10% de fibra sintética; Grupo 2: ratos diabéticos que receberam 10% de fibra oriunda do cubiu.

alimentar, sendo a fração predominante a insolúvel, com 79% e a solúvel com 21% da fibra total (3,59g/100g) (Tabela 2). Considerando que foram aproveitadas todas as partes do fruto (casca, semente e polpa), os valores de fibra alimentar, particularmente a insolúvel, foram superiores aos reportados por Macedo¹⁵, provavelmente pelo fato do aproveitamento do fruto em sua plenitude, envolvendo casca, polpa e semente. Quando comparado com outras Solanáceas constata-se que o fruto de cubiu apresentou concentrações superiores ao do jiló (*S. gilo* Raddi) (1,4%) e a berinjela (*S. melogena*) com 1,2%. As variações do conteúdo da fibra dos frutos podem ser inerentes a diversos fatores, como: parte do fruto utilizado (fruto inteiro ou polpa), métodos analisados, representatividade da amostra, condições de cultivo e grau de maturação. Contudo, salienta-se que o cubiu foi colhido em estágio de amadurecimento comercial, forma em que normalmente é consumido. O cubiu pode ser considerado como um fruto com baixo teor de energia e concentração de fibra alimentar compatível com as solanáceas.

Considerando uma possível alteração no segmento do intestino delgado de cada animal em função do consumo de fibra acima do recomendado, procedeu-se a análise histopatológica, do intestino delgado, cuja descrição microscópica demonstrou que não houve alterações morfológicas em suas estruturas. Dessa forma, a quantidade de fibra alimentar utilizada não induziu o aparecimento de qualquer tipo de lesões no intestino delgado.

Ao final de 15 dias de indução do diabetes verificou-se que a concentração sérica de glicose dos ratos foi significativamente maior ($p < 0,05$) quando comparado com o grupo- controle (Tabela 3), demonstrando a ação diabotogênica da droga. Ressalta-se que, com a concentração de glicose

superior a 300 mg/dL, a recomendação de 5% de fibra alimentar não foi suficiente para manter a sobrevivência dos animais por 28 dias, motivo pelo qual permaneceram apenas os grupos que receberam 10% de fibra alimentar.

Apesar de não ter havido diferença em relação ao consumo de ração entre os dois grupos (Tabela 4), a evolução ponderal dos ratos (Tabela 5), demonstrou uma perda significativa de peso ($p < 0,05$) entre os ratos diabéticos dos grupos caseína e cubiu. A perda de peso pode ser decorrente da descompensação metabólica aguda, ocasionada pelo processo catabólico acelerado de carboidratos, proteínas e lipídios, aumento da lipólise e desidratação.

De acordo com a concentração sérica de glicose (Tabela 6), constatou-se diferença significativa ($p < 0,05$) entre os ratos do grupo controle e os que receberam cubiu ao final da quarta semana (T4). Os mecanismos pelos quais as fibras alimentares influenciam no metabolismo dos glicídios envolvem alterações no trânsito intestinal e morfologia, resultando em menor absorção de carboidratos e outros nutrientes¹⁶. Dentre as inúmeras alterações, uma delas é que as fibras alimentares atuam como barreira física e aceleram os movimentos intestinais ocasionando uma redução na absorção da glicose¹⁷. Cita-se ainda que as fibras solúveis causam uma rarefação das vilosidades da mucosa intestinal, diminuindo a superfície de absorção, com conseqüente aumento da produção de mucina, que auxilia na formação de uma barreira à passagem dos glicídios¹⁸. Uma outra teoria em relação à formação de uma matriz gelatinosa está centrada no maior índice de hidratação das fibras alimentares solúveis como pectinas, mucilagens e hemicelulose, resultando no aumento da viscosidade do conteúdo intestinal e conseqüente retardo na digestão e absorção de nutrientes, dentre eles glicose^{19,20}. Parte

Tabela 2. Composição química do “pool” de cubiu em 100g da parte comestível.

| Fruto (inteiro) | Composição química percentual | | | | | | |
|--------------------|-------------------------------|-----------------|-----------------|--------------|---------------|------------------|-------------------|
| | Umidade (g) | Proteína (g) | Lipídios (g) | Cinza (g) | Fibra* (g) | Glicídios (g) | Energia (kcal) |
| Cubiu | 90,6 ± 1,0 | 0,7 ± 0,0 | 0,7 ± 0,0 | 0,7 ± 0,01 | 3,6 ± 0,02 | 2,8 ± 0,02 | 24,0 |

*Fibra total= 3,59±0,02 g (100%), sendo fibra solúvel=0,76±0,00g (21%), fibra insolúvel= 2,83±0,02 (79%).

Tabela 3. Concentração sérica de glicose dos animais submetidos ao teste piloto após indução com estreptozotocina.

| Grupos | Concentração de glicose (mg/dL) |
|--------------|---------------------------------|
| Experimental | 311,80 ± 34,03 ^(a) |
| Controle | 80,87 ± 20,25 ^(b) |

As mesmas letras no sentido vertical não diferem em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Tabela 4. Consumo de ração pelos ratos dos diferentes grupos ao final do experimento.

| Grupos | Consumo de ração (g) |
|--------|----------------------------|
| 1 | 377,94 ± 58,5 ^a |
| 2 | 418,20 ± 92,9 ^a |

As mesmas letras no sentido vertical não diferem em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. Grupo 1: ratos diabéticos que receberam 10% de fibra sintética; Grupo 2: ratos diabéticos que receberam 10% de fibra oriunda do cubiu.

Tabela 5. Peso médio e desvio padrão (DP) dos animais dos diferentes grupos no tempo zero e ao final de cada semana do experimento (28 dias).

| Grupos | Peso médio (g) | | | | |
|--------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | Tempo zero | 1º semana | 2º semana | 3º semana | 4º semana |
| 1 | 260,7±28,5 ^a | 171,3±11,0 ^a | 154,6±11,7 ^a | 139,8± 12,1 ^a | 129,9± 14,7 ^a |
| 2 | 268,3±27,0 ^a | 185,5±11,6 ^a | 170,7±21,9 ^a | 158,6±24,0 ^a | 152,3± 25,4 ^a |

As mesmas letras no sentido vertical não diferem em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. Grupo 1: ratos diabéticos que receberam 10% de fibra sintética; Grupo 2: ratos diabéticos que receberam 10% de fibra oriunda do cubiu.

Tabela 6. Concentração média de glicose sérica dos animais dos diferentes grupos no tempo inicial e ao final de cada semana do experimento (28 dias).

| Grupos | Concentração de glicose (mg/dL) | | | | |
|--------|---------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | Tempo zero | 1º semana | 2º semana | 3º semana | 4º semana |
| 1 | 383,2±27,5 ^a | 363,0±109,7 ^a | 383,5±62,2 ^a | 346,4±212,0 ^a | 351,4±139 ^a |
| 2 | 379,5±28,3 ^a | 365,6±117,2 ^a | 366,7±133,8 ^a | 277,5±68,0 ^a | 224,4± 85,5 ^b |

As mesmas letras no sentido vertical não diferem em nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. Grupo 1: ratos diabéticos que receberam 10% de fibra sintética; Grupo 2: ratos diabéticos que receberam 10% de fibra oriunda do cubiu.

da glicose pode ainda ser excretada com a fibra²¹. A razão de se estimular o consumo de alimentos com altos teores em fibra alimentar particularmente a solúvel está na evidência da melhora da hiperglicemia pós-prandial²², aumento do controle glicêmico, redução da hiperinsulinemia^{23,24} e redução dos riscos de desenvolvimento da síndrome metabólica²⁵. Em ratos diabéticos, a pectina presente em alimentos e o guar gum têm sido os responsáveis pelo efeito hipoglicêmico^{26,27,28}. Enquanto que o mecanismo de ação das fibras insolúveis está no tempo de trânsito intestinal e na formação do bolo fecal, mas com pouco impacto nos níveis de glicose, insulina e colesterol plasmático²⁹. No presente estudo a constatação da redução da concentração sérica de glicose em ratos diabéticos induzidos artificialmente por meio da utilização do cubiu norteiam novos estudos objetivando a elucidação da ação hipoglicêmica do cubiu para verificar se é devida à presença de fibra alimentar solúvel ou outros constituintes presentes na casca.

CONCLUSÃO

Nas condições em que o presente estudo foi viabilizado conclui-se que o ratos diabéticos que receberam cubiu apresentaram redução da concentração sérica de glicose ao final do estudo.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Luiz Ferreira, do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina do Amazonas, pela viabilização das

análises hispatológicas e ao Dr. Charles R. Clement pela revisão do Abstract. Ao CNPq Proc 476293/03-0 pelo suporte financeiro e bolsa, Proc. 302811/2003-6. Suporte financeiro: FINEP/PPG-7, Proc. 64.99.0477.00.

REFERÊNCIAS

1. Silva Filho DF. Cocona (*Solanum sessiliflorum* Dunal): Cultivo e utilização. Caracas, Venezuela: Secretaria Pro-Tempore. Tratado de Cooperacion Amazônica; 1998.
2. Silva Filho DF, Anunciação Filho CJ, Noda, H, Reis OV. Seleção de caracteres correlacionados em cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal) empregando análise de trilha. *Acta Amazonica* 1997; 27(4): 229-40.
3. Burkit DP. Some diseases characteristic of modern western civilization. *Br Med J* 1973; 1: 274-6.
4. Chandalia M, Abhimanyu G, von Bergenmann K. et al. Beneficial effects of high dietary fiber intake in patients with type II diabetes mellitus. *New Engl J Med* 2000; 42: 1392-8.
5. Trowell H. Definition of dietary fiber and hypothesis that is as a protective factor in certain disease. *Am J Clin Nut* 1976; 29 (4): 417-27.
6. Menezes EW, Giuntini EB, Lajolo FM. Perfil da ingestão de fibra alimentar e amido resistente população nas últimas três décadas. In: Lajolo FM, Saura-Calixto F, Wittig de Penna E, Menezes EW, editores. *Fibra dietética em IberoAmerica: Tecnologia y Salud*. Ed Varela; 2001. p. 433-44.
7. Palitot EB, Anjos GA, Lima FHS. Manifestações Cutâneas do diabetes *Mellitus*: atualizações bibliográficas. *J Bras Med* 2000; 78(6): 136-8.
8. Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD). Diagnóstico e classificação do diabetes mellitus e tratamento do diabetes mellitus tipo 2. *Recomendações da Sociedade Brasileira de Diabetes. Versão Final*. [série online] Disponível em http://www.diabetes.org.br/diabetes/consenso/cons_1.html; 2003.
9. Asp NG, Johansson CG, Hallmer H, Siljeström M. Rapid enzymatic assay of insoluble and soluble dietary fiber. *J Agric Food Chem* 1983; 31: 476-82.

10. A.O.A.C Association of Official Analytical Chemists – Official Methods of Analysis. 12th ed., Manasha; 1995; 937 p.
11. Reeves PG, Nielsen FH, Fahgy GC. AIN-93. Purified for laboratory rodents: Final report of the American Institute of Nutrition at HOC writing committee on the reformulation of the AIN-76. A rodent. Diet. American Institute of Nutrition. J Nutr 1993; 123: 1939-51.
12. Trinder P. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with and alternative oxygen acceptor. Am Clin Biochem 1969; 6: 24-7.
13. Michelani J. Técnicas histológicas em anatomia patológica com instruções para cirurgião, enfermeira e citotécnica. Ed. Pedagógica Universitária LTD, EPU, São Paulo, 1980.
14. Pimentel Gomez F. Curso de Estatística Experimental. 12nd ed. Piracicaba (SP), 1987.
15. Macedo SHM. Caracterização físico-química e nutricional da polpa do cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal) para aproveitamento industrial. [Dissertação de Mestrado]. Manaus, Amazonas: Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Amazonas/UFAM, 1999. 56 pp.
16. Áreas MA, Reyes FGR. Fibras Alimentares: 1 Diabetes Mellitus. Cad Nutr 1996; 12: 1-8.
17. Albrink MJ, Newman T, Davidson PC. Effect of high and low fiber diets on plasma lipids and insulin. Am J Clin Nutr 1978; 32:1486-96.
18. Cassidy MM. *Quantitative and qualitative adaptations in gastrointestinal mucin with dietary fiber feeding*. New York: Plenum Press. 1990.
19. Leeds AR, Bolster NR, Andrewes R. Meal viscosity gastric emptying and glucose absorption intestine rat. Proc Nutr Soc 1979; 38: 44.
20. Schneeman BO, Gallahed D. Effects of dietary fiber on digestive enzymes. In: Spillrt G A. ed. Handbook of Dietary Fiber in Human Nutrition. Boca Raton: CRC Press; 1986. p. 305-12.
21. Trowell H. Dietary fibre, ischaemic heart disease and diabetes mellitus. Proc Nutr Soc 1973; 32 (3): 151-7.
22. Anderson JW, Randles KM, Kendall CWC, Jenkins DJA. Carbohydrate and fiber recommendations for individuals with diabetes: A quantitative assessment and meta-analysis of the evidence. Am College Nutr 2004; 23 (1): 5-17.
23. Bitencourt FPM, Negeli MST, Moreira V, Noronha CS, Celano PA. Influência das fibras da dieta na prevenção e tratamento do diabetes mellitus. Arq Brás Med 1989; 63 (5): 391– 3.
24. McIntosh M, Miller C. A diet containing food rich in soluble and insoluble fiber improves glycemic control and reduces hyperlipidemia among patients with type 2 diabetes mellitus. Nutr Rev 2001; 59 (2): 52-5.
25. McKeown NM, Meigs JB, Liu S, Saltzman E, Wilson PWF, Jacques PF. Carbohydrate nutrition, insulin resistance, and the prevalence of the metabolic syndrome in the Framingham Offspring Cohort. Diabetes Care 2004; 27: 538-46.
26. Derivi SCN, Mendez MHM, Francisconi AD, Silva, CS, Castro AF, Luz DP. Efeito hipoglicêmico de rações à base de berinjela (*Solanum melongena*, L.) em ratos. Ciênc Tecnol Aliment 2002; 22 (2): 164-9.
27. Freitas CK, Derivi SCN, Mendez MHM, Fernandes ML. Produto rico em fibra solúvel (pectinas) e seu efeito sobre os níveis de glicose no soro sanguíneo. Ciênc Tecnol Aliment 1994; 14(12): 46-54.
28. Frias AD, Sgarbieri VC. Guar gum effects on blood serum lipids and glucose concentrations of wistar diabetic rats. Ciênc Tecnol Aliment 1998; 18 (2): 241-5.
29. American Diabetes Association. Nutrition Recommendation and Principles for People With Diabetes mellitus (Position Statement). Diabetes Care 1999; (suppl S): 42 – 545.

Contaminação por matérias estranhas e microrganismos em farináceos comercializados em Ribeirão Preto, SP

Extraneous materials and microorganisms contamination in flours for sale in Ribeirão Preto, SP.

RIALA6/1046

Sonia de Paula Toledo PRADO^{1*}; Antonio Ribeiro FRANCO²; Luiz de SOUZA²; Maria Aparecida de OLIVEIRA¹; Marlene CORREIA³

* Endereço para correspondência: ¹Seção de Bromatologia e Química do Instituto Adolfo Lutz, Laboratório I de Ribeirão Preto, Rua Minas, 877, Campos Elíseos, CEP 14.085-410, Ribeirão Preto, SP, e-mail: sptprado@hotmail.com

² Departamento de Medicina Social da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil.

³ Instituto Adolfo Lutz, Seção de Microscopia de Alimentos.

Recebido: 05/08/2004 – Aceito para publicação: 24/08/2005

RESUMO

Considerando a importância da qualidade dos alimentos, este trabalho teve como objetivo verificar as condições higiênico-sanitárias dos farináceos comercializados no município de Ribeirão Preto-SP, Brasil. Foram avaliados os níveis de contaminação por matérias estranhas e microrganismos, os quais foram comparados segundo os tipos de estabelecimento e de acondicionamento e as estações do ano. Foram analisadas 320 amostras, colhidas de fevereiro de 2001 a janeiro de 2002. Nas análises microscópicas e microbiológicas, 4,4% das amostras estavam em desacordo, respectivamente, com as Resoluções RDC 175/2003 e RDC 12/2001. Os farináceos embalados com maior número de amostras em desacordo com a legislação nas análises microscópicas foram farinha de mandioca e polvilho (10%); nas análises microbiológicas foram farinhas de mandioca a granel (12,5%) e fubás embalados (7,5%). O farináceo a granel com maior número de amostras contendo matérias estranhas foi o polvilho, porém não foi possível concluir se estavam em desacordo com a legislação, uma vez que não há ainda qualquer resolução específica quanto aos parâmetros microscópicos para esta classe de produtos. Quanto às estações do ano, considerando a RDC 175/2003, houve diferença estatisticamente significativa, sendo que o maior percentual de amostras embaladas em desacordo foi observado no verão (15%). Esses dados poderão servir também como subsídios para discussões e ações relacionadas às mudanças nas legislações.

Palavras-Chave. qualidade dos alimentos, farináceos, matérias estranhas, microrganismos, condições higiênico-sanitárias, legislação.

ABSTRACT

Considering the relevance of food quality, the objective of the present paper was to study the sanitary-hygienic conditions of flours on sale in markets in Ribeirão Preto, SP, Brazil. Levels of contamination with extraneous materials and by microorganisms were analyzed and compared among different types of sale sites, storage conditions and during different seasons of the year. Three hundred and twenty samples were examined, which were collected from February 2001 to January 2002. On microscopy and microbiology analyses, 4.4% of samples were not in accordance to RDC 175/2003 and RDC 12/2001 resolutions. On microscopic analysis, raw manioc flour and fermented manioc flour (10%) were the most contaminated samples among the packaged products. On microbiological analysis, the raw manioc flour in bulk (12.5%) and the packaged corn meal (7.5%) were the most contaminated. Among flour in bulk samples, the fermented manioc flour was those with the highest number of samples presenting extraneous materials, though no final conclusion could be estimated in regard to whether it was in accordance or not to legislation as the lack of any specific resolution on microscopic parameters for this product class. Concerning the seasons of year and considering the RDC 175/2003 resolution, a meaningful statistical difference was denoted. The highest amount of contaminated packaged samples was observed at summertime (15%). These data could be used as the basic subsidies for supporting the discussion and actions to introduce some changes in the legislation.

Key Words. food quality, flour, extraneous materials, microorganisms, sanitary-hygienic conditions, legislation.

INTRODUÇÃO

As farinhas de diferentes origens e os grãos de cereais são constituídos basicamente de carboidratos e representam as principais fontes de energia para a maioria da população mundial, sendo considerados alimentos acessíveis e de fácil digestão.

No Brasil, a mandioca e o milho, juntamente com os seus subprodutos, como as farinhas, fazem parte do hábito alimentar de grande parte da população. Segundo a Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF)/2002–2003, realizada pelo (IBGE)¹, o consumo médio nacional de farinhas, féculas e massas é de 23 kg per capita/ano. As maiores aquisições ocorrem nas regiões Norte (44kg) e Nordeste (31kg), principalmente pela farinha de mandioca (34 e 15kg, respectivamente), enquanto no Sul, Sudeste e Centro-Oeste, o consumo chega a 28, 14 e 11kg, respectivamente.

Entretanto, os farináceos são produtos altamente susceptíveis à contaminação por ácaros, roedores e, principalmente, insetos²; os ácaros e insetos também agem como veículos de disseminação de fungos, vírus, bactérias, protozoários e helmintos³. Além destas, outras matérias estranhas podem ser incorporadas em diversos pontos da cadeia de produção e distribuição de alimentos.

De acordo com Scott⁴, a infestação por pragas leva a uma perda nutricional dos grãos, devido a alterações químicas, balanço hídrico e aquecimento, além do prejuízo econômico pela não aceitabilidade dos produtos. Kvenberg⁵ relata que insetos adultos do gênero *Tribolium* secretam quinona e que, ao infestar farinhas, as contaminam causando forte odor, reduzindo a qualidade do produto e tornando-o impróprio para o consumo.

Quanto aos ácaros, nos grandes depósitos de grãos, farinhas e outros produtos, o meio ambiente criado (principalmente com relação à temperatura e umidade) favorece o desenvolvimento de várias espécies, tanto provenientes do solo e da matéria orgânica de áreas adjacentes como carreados por roedores, aves e insetos⁶.

Segundo Olsen⁷, os ácaros das espécies *Dermatophagoides farinae*, *Suidasia* sp, *Thyreophagus entomorphos* e *Tyrophagus putrescentiae* foram identificados como causadores de reações alérgicas e anafilaxia em indivíduos que consumiram alimentos contaminados. Franzolin⁸ demonstrou que esporos de fungos *Aspergillus flavus* quando aderidos ao corpo ou presentes no aparelho intestinal de ácaros da espécie *Tyrophagus putrescentiae* (Acariforme: Acaridae), contribuem para a multiplicação dos mesmos, tornando-se uma simbiose facilitadora da disseminação de esporos viáveis através de grãos armazenados em condições inadequadas.

A estocagem de grãos e farinhas em armazéns seguros contra o ataque roedores é deficiente, segundo Puzzi⁹. Além de serem animais extremamente destruidores, causando enormes prejuízos econômicos e de contaminarem os alimentos com suas fezes, urina e pêlos, também propagam diversas doenças.

Além desses, a contaminação dos farináceos por

microrganismos, como bactérias, fungos e vírus podem levar a alterações em sua composição química, propriedades sensoriais ou ainda em sua estrutura, processo conhecido como deterioração¹⁰. Bolores e leveduras, quando presentes em número elevado, podem provocar a deterioração do alimento ou a redução de sua vida-de-prateleira, pela ação de suas enzimas. Alguns gêneros de bolores ao se multiplicarem podem produzir metabólitos tóxicos (micotoxinas), com importante significado em saúde pública, pelos danos que provocam à saúde animal e humana e também por prejuízos econômicos¹¹. Vários trabalhos evidenciam a importância da pesquisa de fungos em grãos e seus subprodutos.

Quanto à legislação referente aos parâmetros microscópicos, os farináceos embalados seguem a Resolução RDC ANVISA/MS nº 175/2003 (Regulamento Técnico de Avaliação de Matérias Macroscópicas e Microscópicas Prejudiciais à Saúde Humana em Alimentos Embalados)¹², enquanto para os produtos a granel não há, atualmente, legislação específica uma vez que a RDC 175/2003 revogou a Resolução CNNPA nº 12/1978 (ausência de sujidades, parasitos e larvas)¹³ e a Portaria DINAL nº 1/1986 (limite de 30 fragmentos de insetos/100g de amostra)¹⁴.

Com relação aos padrões microbiológicos, está em vigor a Resolução RDC ANVISA/MS nº 12/2001¹⁵, que não contempla a determinação de bolores e leveduras.

Assim, pelos poucos estudos publicados sobre a qualidade higiênica dos farináceos, desenvolveu-se o presente trabalho, cujos objetivos foram não somente verificar as condições higiênico-sanitárias de farinha de milho, fubá, farinha de mandioca crua e polvilho azedo comercializados em Ribeirão Preto-SP, avaliando a influência do acondicionamento, local de comercialização e estações do ano nos níveis de contaminação, como também comparar e discutir os resultados obtidos nos ensaios de microscopia para os farináceos embalados, aplicando-se a legislação revogada e a vigente, tendo em vista as diferenças significativas entre as mesmas.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

Foram analisadas 320 amostras de quatro diferentes tipos de farináceos comercializados no município de Ribeirão Preto, sendo 160 vendidos a granel em feiras-livres e no Mercado Municipal e 160 embalados vendidos em supermercados e mercearias, totalizando 80 produtos para cada local de coleta, sendo 20 de farinha de milho, 20 de fubá, 20 de farinha de mandioca crua e 20 de polvilho azedo. O período de coleta foi de fevereiro de 2001 a janeiro de 2002.

As amostras foram adquiridas mensalmente e a escolha dos locais de comercialização realizada através de sorteio, tendo por base uma listagem das feiras-livres e dos estabelecimentos cadastrados na Prefeitura Municipal de Ribeirão Preto. As amostras foram analisadas em duplicata, quanto aos parâmetros

microscópicos e microbiológicos, de acordo com as normas e técnicas exigidas pela legislação em vigor. Todos os procedimentos analíticos foram realizados nos Setores de Microscopia e de Microbiologia de Alimentos da Seção de Bromatologia e Química do Instituto Adolfo Lutz de Ribeirão Preto - SP.

Métodos

Análises microscópicas

A pesquisa de matérias estranhas nas amostras de farinha de milho, farinha de mandioca e fubá de milho foram realizadas segundo o método 16.5.15/965.39B da A.O.A.C.(2000)¹⁶, com as seguintes modificações: lavagem do percolador com álcool etílico ou absoluto e água filtrada, alternadamente; filtração em funil de Buchner; lavagem interna do béquer após filtração do líquido extrator, com álcool etílico ou absoluto e água filtrada, alternadamente e filtração no papel de filtro.

As amostras de polvilho foram analisadas segundo o método 16.5.18/972.35¹⁶.

Para as amostras que apresentaram, no papel de filtro, quantidade de vegetais que interferiria no reconhecimento das matérias estranhas, foi adotado o procedimento de clareamento das estruturas vegetais com solução de hipoclorito de sódio 2%, conforme o método 16.2.01/965.38B(d) da A.O.A.C(2000)¹⁶, podendo ser aplicado à vários produtos, pois os vegetais apresentam o mesmo comportamento quando em solução de hipoclorito de sódio.

Após a filtração do líquido extrator, as matérias estranhas presentes no papel de filtro foram identificadas e quantificadas ao microscópio estereoscópico com aumento de 30x e, quando necessário, ao microscópio óptico com aumento de 250x.

Análises microbiológicas

Nas análises microbiológicas foram empregadas as seguintes metodologias preconizadas pela American Public Health Association¹⁷: determinação do Número Mais Provável (NMP) de bactérias do grupo coliforme a 45°C; pesquisa de *Bacillus cereus* e de *Salmonella* spp, de acordo com os parâmetros estabelecidos pela legislação em vigor¹⁵. Para a pesquisa de *Salmonella* spp foram feitas adaptações referentes a substituição do caldo de pré-enriquecimento por água peptonada 1% tamponada e do meio de identificação presuntiva IAL (Rugai modificado)¹⁸, além da introdução do caldo de enriquecimento seletivo Rappaport Vassiliadis e de isolamento ágar verde brilhante.

Realizou-se também a enumeração de bolores e leveduras para verificar as condições higiênicas dos produtos, apesar de não ser contemplada pela legislação atual.

Análise Estatística

Utilizando-se o software Stata, aplicou-se o teste de Fisher¹⁹, para inferir sobre diferenças populacionais nas proporções de produtos em desacordo. O nível de significância adotado foi de $\alpha = 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tendo em vista a alteração, em 2003, da legislação referente aos parâmetros microscópicos para alimentos embalados (a Resolução RDC 175/2003 revogou a Portaria 1/1986 e o item características microscópicas da Resolução 12/1978) e, apesar das análises desta pesquisa terem sido realizadas em data anterior, os resultados apresentados nas tabelas seguem a Resolução vigente. Apesar de não haver, atualmente, legislação específica para os farináceos a granel, são apresentadas as matérias estranhas identificadas (Tabela 3) independentemente do número e tipo.

Compararam-se, ainda, para os produtos embalados, as porcentagens de amostras que estariam em desacordo com a legislação atual e a revogada, além de verificar quais matérias estranhas presentes tornaram os farináceos aprovados pela Resolução 175/2003.

Na Tabela 1 são apresentados os resultados obtidos nas análises das 160 amostras de farináceos embalados, quanto ao exame microscópico e das 320 para os microbiológicos, não considerando as estratificações (tipos de estabelecimentos e de acondicionamento e estações do ano). Observa-se que a frequência total de amostras em desacordo com a legislação em vigor foi de 4,4% para as análises microscópicas e microbiológicas.

Comparando-se os resultados das análises microscópicas das 160 amostras de farináceos embalados (Tabela 2) aplicando-se a Resolução RDC 175/2003 (atual) e a Resolução 12/1978 com a Portaria 1/1986 (revogadas), o percentual de amostras em desacordo aumentaria de 4,4% para 29,4%, principalmente para as amostras de polvilho (de 7,5% para 57,5%). As amostras embaladas que estavam em desacordo com a RDC 175/2003 foram condenadas, exclusivamente, pela presença de pêlos de roedor.

A diferença nas porcentagens ocorreu porque passaram a serem consideradas como matérias estranhas prejudiciais à saúde humana somente os insetos e outros animais reconhecidos, pela legislação, como vetores mecânicos, os parasitos, excrementos de insetos ou de outros animais e objetos rígidos, pontiagudos e/ou cortantes. Dessa forma, foram excluídos os insetos considerados como pragas de armazenamento e os ácaros, apesar destes poderem veicular bactérias, leveduras e fungos toxigênicos capazes de causar intoxicações no homem e animais.

Pela Tabela 3 nota-se que os insetos e seus fragmentos, assim como os ovos, larvas e pupas de insetos foram as matérias estranhas que apareceram em maior número em todos os farináceos. Os insetos isolados pertenciam, na sua maioria, às ordens Coleoptera, Lepidoptera, Psocoptera, Trichoptera e Thysanoptera. Essas contaminações sugerem má qualidade da matéria prima, condições higiênicas precárias e/ou ausência de boas práticas de processamento.

Ácaros pertencentes às ordens Parasitiforme: Mesostigmata e Acariforme: Oribatidae foram encontrados nas

amostras de farinhas de milho e de mandioca e no polvilho (Tabela 3).

Pêlo de roedor foi identificado em todos os tipos de farináceos, sendo o polvilho e a farinha de mandioca os mais contaminados. O fato da extração da fécula de mandioca ser uma atividade predominantemente artesanal, sendo a maior parte

realizada nas chamadas “casas de farinha”, favorece o acesso e a presença de roedores nos locais de fabricação e, conseqüentemente, o aparecimento de pêlos, ou até mesmo urina e fezes, no produto final²⁰.

Outras matérias estranhas como pêlos de animais diversos, partículas carbonizadas e metálicas, fios de cabelo,

Tabela 1. Distribuição de freqüências das amostras de farináceos, para as análises microscópicas e microbiológicas, segundo a legislação em vigor.

| Produtos | Condições higiênico-sanitárias | Análises | | | |
|---------------------|--------------------------------|-------------------|-------|-----------------|-------|
| | | Microscópicas (*) | | Microbiológicas | |
| | | n | % | n | % |
| Farinha de milho | A | 40 | 100,0 | 80 | 100,0 |
| | D | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 |
| Fubá | A | 39 | 97,5 | 74 | 92,5 |
| | D | 1 | 2,5 | 6 | 7,5 |
| Farinha de mandioca | A | 37 | 92,5 | 74 | 92,5 |
| | D | 3 | 7,5 | 6 | 7,5 |
| Polvilho | A | 37 | 92,5 | 78 | 97,5 |
| | D | 3 | 7,5 | 2 | 2,5 |
| Total | A | 153 | 97,8 | 306 | 95,6 |
| | D | 7 | 4,4 | 14 | 4,4 |

A = “de acordo” e D = “em desacordo” com a legislação.

(*) para os produtos embalados (RDC 175/2003).

Tabela 2. Distribuição de freqüências das 160 amostras de farináceos embalados das análises microscópicas, segundo a legislação atual e a revogada.

| Produtos | Condições higiênico-sanitárias | Análises Microscópicas | | | |
|---------------------|--------------------------------|------------------------|-------|-------------------------------------|------|
| | | RDC 175/2003 | | Resolução 12/1978 e Portaria 1/1986 | |
| | | n | % | n | % |
| Farinha de milho | A | 40 | 100,0 | 32 | 80,0 |
| | D | 0 | 0,0 | 8 | 20,0 |
| Fubá | A | 39 | 97,5 | 33 | 82,5 |
| | D | 1 | 2,5 | 7 | 17,5 |
| Farinha de mandioca | A | 37 | 92,5 | 31 | 77,5 |
| | D | 3 | 7,5 | 9 | 22,5 |
| Polvilho | A | 37 | 92,5 | 17 | 42,5 |
| | D | 3 | 7,5 | 23 | 57,5 |
| Total | A | 153 | 97,8 | 113 | 70,6 |
| | D | 7 | 4,4 | 47 | 29,4 |

A = “de acordo” e D = “em desacordo” com a legislação citada na tabela.

fibras plásticas, teias de larvas e areia foram detectadas, em menor número de amostras, nos quatro tipos de farináceos, entretanto, atualmente todos esses farináceos estariam de acordo com a RDC 175/2003 caso contivessem essas matérias estranhas, por não representarem um risco potencial.

As comparações realizadas sob a aplicação da atual e da antiga legislação mostram o impacto dos novos parâmetros na aprovação dos farináceos.

Atualmente, a política para alimentos da ANVISA sustenta-se nos seguintes pilares: - “A ação deve ser no processo produtivo e não no produto final; - O produto final deve ser o termômetro para a adoção de medidas de intervenção; - O setor produtivo é o responsável pela garantia sanitária dos alimentos que fabricam”²¹.

Portanto, a qualidade total do alimento deve ser assegurada pelo setor produtivo, porém acredita-se que nem todos têm acompanhado as mudanças que vem ocorrendo, assim

como implantado as “ferramentas” de garantia da qualidade, a fim de atender tal política e garantir produtos isentos de qualquer matéria macroscópica ou microscópica, seja ela prejudicial ou não.

Quanto aos parâmetros microbiológicos, na Tabela 1 são apresentados os resultados obtidos nas análises das 320 amostras de farináceos não considerando as estratificações (tipos de estabelecimentos e de acondicionamento e estações do ano). Observa-se que a frequência total de amostras em desacordo com a legislação em vigor foi de 4,4%.

Observa-se na Tabela 4 que, coliformes à 45°C acima do limite tolerado pela legislação em vigor (NMP > 10²/g) foram encontrados somente nas amostras de fubá. A presença dessas bactérias revela uma possível contaminação fecal do alimento e, conseqüentemente, risco da introdução de microrganismos patogênicos, que têm no trato intestinal de animais o seu habitat exclusivo ou preferencial²².

Tabela 3. Número de amostras e tipos de matérias estranhas isoladas dos farináceos.

| Matérias estranhas | | Nº de amostras | | | |
|-----------------------|------|------------------|--------------|---------------------|----------|
| | | Farinha de milho | Fubá demilho | Farinha de mandioca | Polvilho |
| Inseto | 0 | 74 | 71 | 73 | 58 |
| | 1-15 | 6 | 7 | 7 | 21 |
| | > 15 | 0 | 2 | 0 | 1 |
| Ovo e pupa de inseto | 0 | 78 | 79 | 79 | 77 |
| | 1-5 | 2 | 1 | 1 | 3 |
| Fragmento de inseto | 0 | 50 | 62 | 54 | 45 |
| | 1-15 | 30 | 17 | 26 | 34 |
| | > 15 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| Larva | 0 | 75 | 68 | 78 | 72 |
| | 1-15 | 5 | 7 | 2 | 6 |
| | > 15 | 0 | 5 | 0 | 2 |
| Ácaro | 0 | 78 | 80 | 78 | 79 |
| | 1-5 | 2 | 0 | 2 | 1 |
| Pêlo de roedor | 0 | 77 | 77 | 75 | 74 |
| | 1-5 | 3 | 3 | 5 | 6 |
| Outros: | | | | | |
| Pêlo animal | | 1 | 2 | 3 | 4 |
| Partícula carbonizada | | 1 | 0 | 2 | 3 |
| Fio de cabelo | | 1 | 0 | 1 | 1 |
| Fragmento de madeira | | 0 | 0 | 0 | 2 |
| Fibra plástica/areia | | 0 | 0 | 1 | 2 |
| Teia de larva | | 0 | 2 | 0 | 0 |
| Partícula metálica | | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Bárbulas de pena | | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Total de amostras | | 80 | 80 | 80 | 80 |

Quanto à contaminação por *Bacillus cereus* (máximo tolerado de 3×10^5 UFC/g), verifica-se que foram isolados principalmente em amostras de farinha de mandioca. O controle dessa bactéria visa prevenir o seu desenvolvimento, uma vez que é difícil impedir a sua presença nas matérias-primas, em função da sua grande disseminação no meio ambiente, sendo o solo o seu reservatório natural e principal habitat.

Com relação à *Salmonella* spp, constatou-se ausência em 100% das amostras, indicando que os farináceos não são propícios ao seu desenvolvimento.

Apesar da resolução RDC 12/2001 não possuir limites de tolerância para bolores e leveduras em farináceos, a realização das contagens desses microrganismos forneceu informações sobre a qualidade desses produtos, uma vez que as mesmas indicam as condições higiênicas tanto das matérias-primas como do processamento e armazenamento.

Das amostras a granel, 7,5% dos fubás e 5% das farinhas de milho e polvilhos apresentaram bolores em número igual ou superior ao limite de 10^4 UFC/g, enquanto nos produtos embalados estavam ausentes. Leveduras foram isoladas em 2,5%

Tabela 4. Distribuição de freqüências das amostras de farináceos em desacordo (d) com os parâmetros microbiológicos estabelecidos na legislação em vigor.

| Produtos | Tipos de acondicionamento | Microrganismos | | | | | |
|---------------------|---------------------------|-------------------|---|-----|------------------------|------|------------------------------|
| | | Coliformes a 45°C | | | <i>Bacillus cereus</i> | | <i>Salmonella</i> spp em 25g |
| | | n | d | % | d | % | |
| Farinha de milho | a granel | 40 | 0 | 0 | 0 | 0 | Ausente |
| | embalado | 40 | 0 | 0 | 0 | 0 | Ausente |
| Fubá | a granel | 40 | 1 | 2,5 | 1 | 2,5 | Ausente |
| | embalado | 40 | 3 | 7,5 | 1 | 2,5 | Ausente |
| Farinha de mandioca | a granel | 40 | 0 | 0 | 5 | 12,5 | Ausente |
| | embalado | 40 | 0 | 0 | 1 | 2,5 | Ausente |
| Polvilho | a granel | 40 | 0 | 0 | 0 | 0 | Ausente |
| | embalado | 40 | 0 | 0 | 2 | 5,0 | Ausente |

Tabela 5. Distribuição de freqüências das amostras de farináceos em desacordo com a legislação em vigor para os parâmetros microscópicos (*) e microbiológicos, segundo o local de comercialização e tipo de acondicionamento.

| Produtos n=20 | Tipos de análises | Feira livre (a granel) | | Merc. Mun. (a granel) | | Mercearia (embalado) | | Supermercado (embalado) | |
|---------------------|-------------------|------------------------|------|-----------------------|------|----------------------|------|-------------------------|------|
| | | n | % | n | % | n | % | n | % |
| Farinha de milho | Microscopia | - | - | - | - | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 |
| | Microbiologia | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 |
| Fubá | Microscopia | - | - | - | - | 0 | 0,0 | 1 | 5,0 |
| | Microbiologia | 2 | 10,0 | 1 | 5,0 | 3 | 15,0 | 0 | 0,0 |
| Farinha de mandioca | Microscopia | - | - | - | - | 2 | 10,0 | 1 | 5,0 |
| | Microbiologia | 2 | 10,0 | 3 | 15,0 | 1 | 5,0 | 0 | 0,0 |
| Polvilho | Microscopia | - | - | - | - | 2 | 10,0 | 1 | 5,0 |
| | Microbiologia | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 0 | 0,0 | 2 | 10,0 |
| Total | Microscopia | - | - | - | - | 4 | 5,0 | 3 | 3,75 |
| | Microbiologia | 4 | 5,0 | 4 | 5,0 | 4 | 5,0 | 2 | 2,5 |

(*) Para os produtos embalados (RDC 175/2003).

(-) Produtos sem legislação específica.

das amostras de farinha de mandioca embaladas e com valores acima de 10^4 UFC/g (limite estabelecido pela Portaria nº 451 utilizada até 12 de janeiro de 2001)²³.

Atuí e colaboradores¹¹, em estudo de monitoramento de fungos em milho, grits e fubá encontraram 96,3% das amostras de fubá contendo *Penicillium* spp, 95,1% *Aspergillus* spp e 79% *Fusarium* spp, fato preocupante em virtude do grande potencial toxicogênico dos mesmos.

Quanto ao local de comercialização e tipo de acondicionamento, a distribuição das porcentagens de amostras dos farináceos em desacordo está apresentada na Tabela 5.

Considerando os farináceos comercializados embalados, as maiores porcentagens de amostras em desacordo com a legislação em vigor ocorreram para o polvilho e a farinha de mandioca (10,0%) comercializados nas mercearias.

A alta porcentagem de amostras de polvilho em desacordo na análise microscópica justifica-se pelo processo rudimentar e empírico da fermentação da fécula que, segundo Albuquerque apud Nakamura²⁴ pode ser feita em qualquer recipiente, desde o cocho de madeira a tanques de alvenaria, revestidos ou não de azulejos, em recintos abertos, muitas vezes deficiente para a proteção contra intempéries ou material estranho.

Quanto ao parâmetro estações do ano, para as análises microscópicas e considerando a RDC 175/2003, houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$), sendo que o maior percentual de amostras embaladas em desacordo foi observado no verão (15,0%).

Para os produtos a granel foi observada maior contaminação nas amostras colhidas no inverno (41,7%), e o menor na primavera (22,5%), não havendo diferença estatisticamente significativa na proporção de contaminação nas estações do ano ($p = 0,31$).

Os resultados das análises microbiológicas mostraram diferença estatisticamente significativa somente para as amostras de fubá que apresentou 22,2% das amostras colhidas no verão fora dos padrões estabelecidos pela legislação, contra 9,5% no inverno e nenhuma na primavera e outono.

Segundo Roitman e colaboradores²², a temperatura é, provavelmente, o mais importante fator ambiental que afeta o crescimento microbiano, juntamente com a umidade relativa do ambiente que possui estreita relação com a atividade de água do alimento. Em função desses dois fatores apresentarem valores mais elevados na época do verão, justifica-se a maior porcentagem no total de produtos em desacordo nas análises microbiológicas nessa estação do ano.

Quanto ao total, a maior porcentagem de amostras em desacordo ocorreu no verão (6,9%), enquanto a estação com menor número de amostras em desacordo com a legislação em vigor foi a primavera (1,2%), sendo a farinha de mandioca o único produto que apresentou amostras em condições higiênico-sanitárias insatisfatórias nesse período.

CONCLUSÕES

- A farinha de mandioca e o polvilho foram os farináceos embalados que apresentaram as maiores porcentagens de amostras em desacordo com a legislação em vigor, na análise microscópica, pela presença de pêlos de roedor.
- Nas análises microbiológicas foram encontrados coliformes em fubá e *Bacillus cereus* em fubá, farinha de mandioca e polvilho.
- Os farináceos a granel apresentaram matérias estranhas, principalmente insetos e seus fragmentos, larvas e pêlos de roedor, o que evidencia a necessidade de legislação que contemple os parâmetros microscópicos para essa classe de produtos.
- Em relação às estações do ano, houve diferença estatisticamente significativa para as amostras coletadas no verão, referentes às análises microscópicas dos farináceos embalados e nas análises microbiológicas, apenas para as amostras de fubá.
- Quanto às análises microscópicas dos produtos embalados, 25% das amostras que estavam em desacordo com a legislação revogada, passaram a ser consideradas aprovadas pela RDC 175/2003, apesar de conterem insetos, ácaros e outra matérias estranhas não reconhecidas atualmente como prejudiciais à saúde humana.

A fim de acompanhar a evolução da contaminação e avaliar a médio e longo prazo o impacto da RDC nº 175/2003 na aprovação dos inúmeros produtos alimentícios, torna-se necessário que sejam empreendidas pesquisas relacionadas aos aspectos sanitários desses alimentos e que sejam fornecidos subsídios para posteriores discussões e ações ligadas ao tema.

Com relação aos aspectos microbiológicos, a determinação de fungos em farináceos é importante, principalmente porque algumas espécies têm grande potencial toxicogênico e a exposição humana a estas micotoxinas, através de alimentos contaminados, é questão de saúde pública, o que reforça a necessidade da ANVISA rever a legislação atual (RDC nº 12/2001).

REFERÊNCIAS

1. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Pesquisa de Orçamentos Familiares - POF 2002-2003, [http://www.ibge.gov.br]. Consulta em: 10 janeiro 2005.
2. Eisenberg WV. Source of food contaminants. In: Gorham Jr, editor. Principles of food analyses for filth, decomposition and foreign matter. 2nd ed. Washington, DC: FDA; 1981. 11-25. (FDA Technical Bulletin, 1).
3. Gorham JR. Filth in foods: implications for health. In: Gorham Jr, editor. Principles of food analyses for filth, decomposition and foreign matter. 2nd ed. Washington, DC: FDA; 1981. 27-31. (FDA technical Bulletin, 1).
4. Scott HG. Nutrition changes caused by pests in food. In: Gorham Jr. Ecology and management of food - industry pests. Washington, DC: FDA; 1991. 463-67. (FDA Technical Bulletin, 4).

5. Kvenberg JE. Insects. In: Gorham Jr. Principles of food analyses for filth, decomposition and foreign matter. 2nd ed. Washington, DC: FD; 1981. 83-125. (FDA technical Bulletin, 1).
6. Flechtmann CHW. Ácaros em produtos armazenados e na poeira domiciliar. Piracicaba: USP/ESALQ/Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz; 1986. 97p.
7. Olsen AR. Regulatory action criteria for filth and other extraneous materials. II. Allergenic mites: an emerging food safety issue. *Regulatory Toxicology and pharmacology*, 1998; 28: 190- 98.
8. Franzolin MR. Interação entre *Aspergillus flavus* Link toxigênico e ácaro (*Tyrophagus putrescentiae* Schrank), em amostras de grão de milho. [Tese de doutorado]. Instituto de Ciências Biomédicas, São Paulo: Universidade de São Paulo, 1998. 130 p.
9. Puzzi D. Abastecimento e armazenamento de grãos. Campinas: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola; 1986.
10. Franco BDGM, Landgraf M. Microbiologia dos Alimentos. 2nd. São Paulo: Ed. Atheneu; 1996.
11. Atuí MB, Lázari FA. Monitoramento de fungos em milho em grão, grits e fubá. *Ciênc Tecnol. Aliment* 1998; 18 (4): 363-67.
12. Resolução RDC nº 175, de 08 de jul. 2003. Aprova o Regulamento Técnico de Avaliação de Matérias Macroscópicas e Microscópicas Prejudiciais à Saúde Humana em Alimentos Embalados. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, [http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/rdc/175_03rdc.htm]. Consulta em: 14 abril 2004.
13. Resolução Normativa da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos nº 12, de 23 de jul. 1978. Aprova as seguintes normas técnicas especiais do Estado de São Paulo, revisadas pela CNNPA, relativas a alimentos (e bebidas) para efeito em todo o território brasileiro. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 24 jul. 1978. Seção 1, p. 1.
14. Portaria DINAL/MS nº 1, de 4 de abr. 1986. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 08 abr. 1986. Seção 1, p. 5039.
15. Resolução RDC nº 12, de 02 de jan.e 2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Aprova o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 10 jan. 2001. Seção 1, p. 45-53.
16. Association of Official Analytical Chemists (AOAC). Official Methods of Analysis of AOAC International. 17. ed. Gaithersburg, 2000. cap. 16. (1 CD-Rom).
17. Vanderzant C, Splittstoesser DF, editors. Compendium of methods for microbiological examination of foods. 3rd. Washington, DC: APHA, 1992.
18. Pessôa GVA, Silva EAM. Miliee pour la identification presomptive rapide des enterobactéries, des aeromonas et des vibriions. *Ann. Microbiol.* 1974; 125A: 341-7.
19. Mehta CR, Patel NR. A network algorithm for performing Fisher's exact test in r x c contingency tables. *Jasa.* 1983; 78: 427-34.
20. Carvalho EP, Canhos VP, Ribeiro VE, Carvalho HP. Polvilho azedo: aspectos físicos, químicos e microbiológicos. *Pesq Agropec Bras* 1996; 31 (2): 129-37.
21. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Programa Nacional de Monitoramento da Qualidade Sanitária de Alimentos, [<http://www.anvisa.gov.br/alimentos/programa/objetivos.htm>]. Consulta em:13 janeiro 2005.
22. Roitmam I, Travassos LR, Azevedo JL. Tratado de microbiologia. São Paulo: Manole; 1988.
23. Portaria nº 451, de 19 de setembro de 1997 da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Aprova o Regulamento Técnico - Princípios Gerais para o Estabelecimento de Critérios e Padrões Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 2 jul. 1998. Seção 1, p. 4.
24. Nakamura IM, Moraes IO, Martucci ET. Considerações sobre a tecnologia da fécula de mandioca fermentada: produção, propriedades físico-químicas e aplicações. *Científica* 1976; 4(2): 196-202.

Isolamento, caracterização e resistência a antimicrobianos de bactérias Gram-negativas aeróbias e anaeróbias facultativas de amostras de solo

Isolation, characterization, and antimicrobial resistance of Gram-negative aerobic and facultative anaerobic bacteria from soil samples.

RIALA6/1047

Paulo da SILVA^{1*}; Ana Maria Machado CARNEIRO; Maria Claudia CARLONI; Marta Inês Cazentini MEDEIROS; Jaqueline Otero SILVA; Silvia Helena Chinarelli RECHE; Maria Clarice ERRERA; Suzel Nogueira NEME

* Endereço para correspondência: Laboratório I do Instituto Adolfo Lutz de Ribeirão Preto, Rua Minas 877 – CEP 14 085 – 410 , e-mail pdsilva@ial.sp.gov.br

¹ Divisão dos Laboratórios Regionais do Instituto Adolfo Lutz, Lab. I de Ribeirão Preto.

Recebido: 21/09/2005 – Aceito para publicação: 19/12/2005

RESUMO

Cerca de 7% da população bacteriana do solo está representado por bactérias Gram-negativas aeróbias/ anaeróbias facultativas. Muitas espécies são patogênicas e estão envolvidas em casos de infecções hospitalares. O potencial de patogenicidade dessas bactérias pode ser avaliado através da investigação da sua resistência a antimicrobianos. Além deste propósito, o objetivo do trabalho foi também identificar bacilos gram-negativos (BGN) isolados do solo. Para isso, 18 amostras de solo foram semeadas em caldo de Hajna. A obtenção de colônias isoladas seguiu-se em Mc Conkey ágar e Mueller Hinton ágar com 5% de sangue de carneiro. Foram repicadas 283 colônias com diferentes características morfológicas, em meio de IAL. Na triagem, obteve-se BGN fermentadores e não fermentadores, cuja identificação se fez pela metodologia convencional. Identificou-se 94,35% de enterobactérias e 5,65% BGN não fermentadores. A resistência bacteriana foi mais expressiva aos antibióticos ampicilina, cefalotina, cefoxitina, amoxicilina com ácido clavulânico e tetraciclina, variando entre 49,82% a 87,28%. Todos os isolados bacterianos foram resistentes a pelo menos um antibiótico, o que demonstra considerável potencial patogênico por constituírem um reservatório de resistência. A associação entre solo e resistência antimicrobiana precisa ser mais estudada. Observações e experimentos adicionais possibilitarão conhecer melhor essa relação e os processos que possam contribuir para a emergência de bactérias resistentes.

Palavras-Chave. bacilos gram-negativos, solo, resistência a antimicrobianos.

ABSTRACT

Gram-negative aerobic bacteria are found in nearly 7% of soil resident-bacteria population. Many bacteria species are pathogenic, and they are responsible for nosocomial infections. Antimicrobial drugs resistance is relevant for assessing the potential pathogenic features of circulating bacteria strains. The aim of the present study was to identify Gram-negative bacilli (GNB) isolated from soil, and to test the antimicrobial resistance. Eighteen soil samples were inoculated into Hajna's broth for enrichment. Bacterial isolation was done on Mc Conkey agar and Müeller Hinton blood agar. Isolated bacteria colonies (283) were inoculated onto modified Rugai medium for screening the fermentative GNB and non-fermentative GNB, and followed by identification by means of conventional methodology. Most of them (94.35%) belonged to *Enterobacteriaceae*, and 5.65% were non-fermentative GNB. High rates of bacterial resistance were evidenced to ampicillin, cefalotin, cefoxitin, amoxicillin+clavulanic acid, and tetracycline, varying from 49.82% to 87.28%. All of the isolated bacteria showed resistance to at least one antibiotic. These results provide remarkable data on pathogenic potential as a constituent of a resistance reservoir. Further studies on the relationship between soil and antimicrobial resistance needs to be performed. Then the advanced experiments and observations will provide best understanding on the mechanism and the process associated with the emergence of environmental drug-resistant bacteria.

Key Words. Gram-negative bacilli , soil, antimicrobial resistance.

INTRODUÇÃO

A população de bactérias aeróbias e anaeróbias facultativas do solo é formada na sua maioria por bactérias heterotróficas, pertencentes à ordem *Eubacteriales*¹. Cerca de 93% é representada pelas bactérias Gram-positivas e o restante pelas Gram-negativas² que são classificadas como bacilos e cocos Gram-negativos, aeróbios/microaerófilos, não fermentadores e bacilos Gram-negativos anaeróbios facultativos, fermentadores.

Com relação à morfologia e fisiologia, as bactérias Gram-negativas encontradas no solo são muito heterogêneas. São reconhecidos como bacilos Gram-negativos não fermentadores os gêneros *Acetobacter*; *Acidovorax*; *Achromobacter*; *Acinetobacter*; *Agrobacterium*; *Alcaligenes*; *Brevundimonas*; *Azotobacter*; *Beijerinckia*; *Burkholderia*; *Chryseomonas*; *Comamonas*; *Cupriavidus*; *Derxia*; *Ensifer*; *Flavimonas*; *Flavobacterium*; *Janthylobacterium*; *Methylobacterium*; *Methylovorus*; *Paracoccus*; *Pedobacter*; *Pseudomonas*; *Ralstonia*; *Rhizobacter*; *Sphingobacterium*; *Sphingomonas* e *Stenotrophomonas*,^{3,4,5,6} enquanto que, entre os bacilos Gram-negativos fermentadores são consideradas, principalmente, as espécies da família *Enterobacteriaceae*.

Estas bactérias estão largamente dispersas na natureza, ocupando vários nichos ecológicos distribuídos pelo solo, água, frutas, vegetais, grãos, plantas, flores e trato intestinal dos animais e dos seres humanos. Muitas espécies estão associadas com abscessos, pneumonia, meningite, septicemia, feridas, infecções urinárias e intestinais, além de estarem envolvidas em casos de infecções hospitalares^{4,7,8}.

A ocorrência de bactérias Gram-negativas no solo é pouco estudada e geralmente, são investigadas quanto a sua habilidade em realizar alterações químicas específicas como a decomposição da celulose, proteínas e herbicidas, assimilação do nitrogênio e resistência a antimicrobianos⁹.

O estudo da resistência de bactérias isoladas do meio ambiente é de fundamental importância em saúde pública, para avaliar as cepas circulantes quanto ao potencial de patogenicidade, devido à pressão seletiva exercida pelo uso de antibióticos¹.

A utilização de maneira indiscriminada dos agentes antimicrobianos nas práticas médicas, veterinárias e agrícolas é um dos fatores que leva a emergência de bactérias multirresistentes que são selecionadas e lançadas no meio ambiente¹¹. Este fato, associado à transferência genética de fatores de resistência entre microrganismos representa um grande problema no tratamento de doenças infecciosas, especialmente, em pacientes hospitalizados¹⁰.

O objetivo deste trabalho foi identificar bactérias Gram-negativas aeróbias e anaeróbias facultativas isoladas de solo e investigar sua resistência a antimicrobianos.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção e preparo das amostras de solo: as amostras foram obtidas de solo do tipo cerrado, na região de Barretos, São Paulo, Brasil. O solo encontrava-se arado, adubado, adicionado de cal e cultivado com leguminosas e gramíneas. Foram colhidas 18 amostras da camada superior do solo em uma profundidade de até 20cm, que levadas ao laboratório foram peneiradas e acondicionadas em sacos plásticos sem uso, selados e estocados a -20° C, até o momento dos procedimentos laboratoriais. Para enriquecimento de bactérias Gram-negativas semeou-se 10g de cada amostra em 90mL de caldo de Hajna⁵. Essas amostras assim preparadas foram incubadas a $35 - 37^{\circ}$ C por até 48 horas para a seguir serem inoculadas em meios sólidos, obedecendo à técnica de semeadura quantitativa⁸.

Isolamento bacteriano: partiu-se de diluições seriadas do caldo de Hajna¹² (10^{-1} a 10^{-6}) em solução tampão. Tendo identificado a diluição ideal como sendo 10^{-6} , utilizou-se o volume de 10 μ L, com alça bacteriológica calibrada, para inoculação em placas de ágar Mc Conkey e ágar Muller Hinton (Difco), este último foi adicionado de 5% de sangue desfibrinado de carneiro. As placas inoculadas foram incubadas a $35 - 37^{\circ}$ C por até 48 horas⁸. Foram selecionadas várias colônias de diferentes tipos morfológicos e inoculadas no meio de Rugai modificado por Pessoa e Silva (IAL)¹³. Após incubação a $35 - 37^{\circ}$ C, por até 24 horas identificou-se bacilos Gram-negativos fermentadores e não fermentadores, no total de 283 amostras. Cada isolado foi conservado em Ágar Nutriente inclinado, para os demais procedimentos.

Identificação dos isolados bacterianos: foi realizada por testes bioquímicos padronizados e adotados pelo Instituto Adolfo Lutz, com a utilização de esquemas de classificação bacteriana descritos em manuais de sistemática e microbiologia clínica^{4,8,10}. A identificação dos bacilos Gram-negativos com características de serem fermentadores da glicose foi direcionada como para enterobactérias⁷ e aqueles com características de não fermentadores foram submetidos a testes reconhecidos para a sua identificação^{3,4,5,6,8,14}.

Análise numérica comparativa: criou-se um banco de dados reunindo em uma tabela as características fenotípicas das bactérias, cujos resultados das reações foram registrados como positivo (P) ou negativo (N). Uma outra tabela com as características fenotípicas, definidas para cada provável suspeito, também foi elaborada, de acordo com Sneath (1984)¹⁵. A análise dos dados foi realizada através de comparações entre as tabelas, estabelecendo a similaridade entre as características fenotípicas apresentadas pelas bactérias estudadas com as das bactérias determinadas na literatura. Determinou-se a espécie bacteriana quando a similaridade entre os registros das tabelas foi $\geq 90\%$.

Testes de sensibilidade a antimicrobianos

Foram utilizados grupos de drogas antimicrobianas sugeridas para bactérias Gram-negativas, fermentadoras e não fermentadoras, com os respectivos limites de sensibilidade estabelecidos pelo National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) para o teste de disco-difusão^{16,17}. O inóculo bacteriano foi preparado em solução fisiológica esterilizada equivalente à concentração de 0,5 da escala de Mac Farland (1×10^8 UFC/mL), a partir de um crescimento de 18 horas em placa de ágar Mac Conkey. Com auxílio de um "swab", fez-se a inoculação da amostra bacteriana em placa de ágar Mueller Hinton, onde posteriormente foram colocados os discos dos antibióticos: amicacina (AMI), amoxicilina+ácido clavulânico (AMC), ampicilina (AP), ácido nalidíxico (AN), cefalotina (CF), cefoxitina (CFO), cefotaxima (CTX), ciprofloxacina (CIP), cloranfenicol (CO), gentamicina (GN), imipenem (IPM), levofloxacina (LVX), polimixina B (PLB), sulfametoxazol+trimetoprim (SUT), tetraciclina (TT), ticarcilina+ácido clavulânico (TIM) e tobramicina (TB)¹⁸. A leitura do antibiograma foi realizada após 24 horas de incubação a 37°C. Os halos de inibição foram medidos e os resultados avaliados de acordo com NCCLS. Foram utilizadas as cepas padrões de *Staphylococcus aureus*

ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Escherichia coli* ATCC 25922 para o controle de qualidade^{16,17}.

RESULTADOS

Na tabela 1 estão listadas as 283 bactérias convencionalmente identificadas, sendo a grande maioria (94,35%) formada por membros da família *Enterobacteriaceae*, pertencentes principalmente ao gênero *Enterobacter* (62,19%). Os restantes dos isolados (5,65%) foram classificados como bacilos Gram-negativos não fermentadores.

Na figura 1 é demonstrada a frequência da resistência aos 17 agentes antimicrobianos testados, podendo-se observar a ocorrência de níveis de resistência bacteriana acima de 40% para ampicilina, cefalotina, cefoxitina, amoxicilina+ácido clavulânico e tetraciclina.

Na Tabela 2 são apresentadas as diferentes espécies bacterianas isoladas e as porcentagens individuais das resistências aos antimicrobianos testados. Observou-se entre as 28 espécies de bactérias identificadas, que 24 (85,71%) apresentaram multirresistência (resistência a quatro antibióticos

Tabela 1. Porcentagens das diferentes espécies de bacilos Gram-negativos isolados de solo.

| Fermentadores | BACILOS GRAM-NEGATIVOS ISOLADOS DE SOLO | | Não Fermentadores | Isolados | |
|----------------------------------|---|--------------|-------------------------------------|-----------|-------------|
| | Isolados | | | Nº | % |
| | Nº | % | | Nº | % |
| <i>Citrobacter amalonaticus</i> | 6 | 2,12 | <i>Acinetobacter</i> sp. | 3 | 1,06 |
| <i>Citrobacter braakii</i> | 2 | 0,71 | <i>Achromobacter</i> sp. | 5 | 1,77 |
| <i>Citrobacter freundii</i> | 2 | 0,71 | <i>Ralstonia pickettii</i> | 6 | 2,12 |
| <i>Citrobacter intermedius</i> | 3 | 1,06 | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> | 2 | 0,71 |
| <i>Citrobacter koseri</i> | 3 | 1,06 | | | |
| <i>Citrobacter sedlakii</i> | 8 | 2,83 | | | |
| <i>Citrobacter youngae</i> | 2 | 0,71 | | | |
| <i>Enterobacter aerogenes</i> | 21 | 7,42 | | | |
| <i>Enterobacter amnigenus</i> | 1 | 0,35 | | | |
| <i>Enterobacter cancerogenus</i> | 3 | 1,06 | | | |
| <i>Enterobacter cloacae</i> | 94 | 33,22 | | | |
| <i>Enterobacter gergoviae</i> | 6 | 2,12 | | | |
| <i>Enterobacter intermedius</i> | 2 | 0,71 | | | |
| <i>Enterobacter</i> sp. | 49 | 17,31 | | | |
| <i>Erwinia rhapontici</i> | 1 | 0,35 | | | |
| <i>Escherichia coli</i> | 10 | 3,53 | | | |
| <i>Hafnia alvei</i> | 3 | 1,06 | | | |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 12 | 4,24 | | | |
| <i>Klebsiella</i> sp. | 1 | 0,35 | | | |
| <i>Raoultella terrigena</i> | 3 | 1,06 | | | |
| <i>Serratia liquefaciens</i> | 7 | 2,47 | | | |
| <i>Serratia marcescens</i> | 18 | 6,36 | | | |
| <i>Serratia odorifera</i> | 9 | 3,18 | | | |
| <i>Serratia rubidae</i> | 1 | 0,35 | | | |
| TOTAL | 267 | 94,35 | TOTAL | 16 | 5,65 |

ou mais), principalmente nos gêneros *Enterobacter*, *Serratia* e em bacilos gram-negativos não fermentadores.

Enterobacter cloacae foi a enterobactéria que apresentou maior porcentagem de resistência aos antimicrobianos, principalmente a amicacina, amoxicilina com ácido clavulânico, ampicilina, cefalotina e cefoxitina, enquanto a maioria das enterobactérias foi totalmente sensível a ciprofloxacina, gentamicina, imipenem, levofloxacina, com exceção da *Serratia marcescens* que demonstrou 5,6% de resistência a gentamicina e levofloxacina.

Citrobacter koseri, *Enterobacter amnigenus*, *Klebsiella* sp e *Serratia rubidae* foram sensíveis a cefoxitina, sendo que os outros isolados apresentaram resistência a este agente variando de 16,7% a 100%.

A resistência aos aminoglicosídeos foi menos prevalente entre os isolados, enquanto que aos betalactâmicos foi a que mais prevaleceu. Todas as espécies de *Enterobacteriaceae* identificadas apresentaram resistência no mínimo a três dos cinco betalactâmicos testados, exceto *E. amnigenus*, *Klebsiella* sp, *Raoutella terrigena* e *Serratia rubidae*. A maioria das cepas apresentou resistência às cefalosporinas de primeira (CF) e segunda geração (CFO) e sensibilidade à cefalosporina de terceira geração (CTX).

Foram utilizados os antimicrobianos amoxicilina e ticarcilina com ácido clavulânico como associações de betalactâmicos e inibidores de betalactamases. Dezenove espécies de BGN fermentadores no total foram resistentes para

amoxicilina+ácido clavulânico, já com ticarcilina+ácido clavulânico houve resistência em oito espécies de enterobactérias.

Os isolados de bacilos Gram-negativos não fermentadores apresentaram um alto índice de resistência aos betalactâmicos testados, mesmo com associação de inibidores. Podemos observar que *Achromobacter* sp e *Stenotrophomonas maltophilia* foram 100% resistentes a ticarcilina+ácido clavulânico e amoxicilina+ácido clavulânico. Ainda neste grupo bacteriano nota-se que levofloxacina foi a quinolona mais ativa, seguida por ciprofloxacina e ácido nalidixico. Resistência aos aminoglicosídeos só não foi observada em *Acinetobacter* sp, que mostrou 100% de sensibilidade a estes antibióticos, enquanto que a resistência foi de 100% ao sulfametoxazol+trimetoprim.

Stenotrophomonas maltophilia exibiu seu padrão de resistência típica, incluindo susceptibilidade às quinolonas, sulfametoxazol+trimetoprim e alto índice de resistência ao imipenem, sendo o único bacilo Gram negativo não fermentador que apresentou 100% de sensibilidade ao cloranfenicol. Todos os isolados de não fermentadores apresentaram resistência à ampicilina, cefalotina, cefoxitina, cefotaxima e polimixina B.

DISCUSSÃO

O uso extensivo de antibióticos é considerado um importante fator na emergência de bactérias resistentes aos

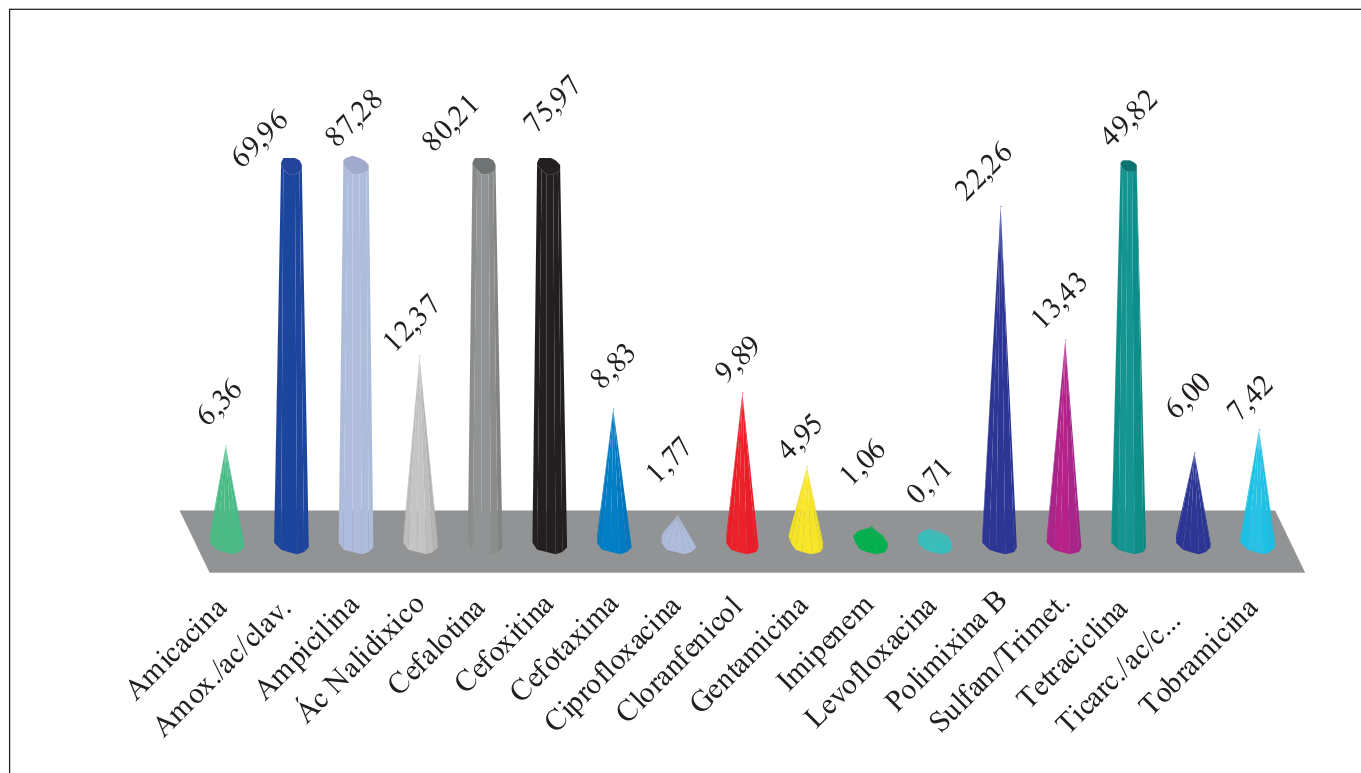


Figura 1. Porcentual da resistência aos agentes antimicrobianos testados, encontrada entre as 283 amostras de bacilos Gram-negativos isolados do solo.

Tabela 2. Porcentagem da resistência dos bacilos Gram-negativos isolados de solo aos agentes antimicrobianos testados.

| ISOLADOS | Agentes antimicrobianos testados em bacilos gram-negativos, de acordo com NCCLS 2003, tabelas M100-S13 | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|--|------|------|------|-----|------|------------------|------|-----|------|------------|------|-----|------|----------|------|------|
| | Betalactâmicos | | | | | | Aminoglicosídeos | | | | Quinolonas | | | | Diversos | | |
| | AP | CF | CFO | CTX | IPM | AMC | TIM | AMI | GN | TB | AN | CIP | LVX | TT | SUT | PLB | CO |
| FERMENTADORES | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Citrobacter amalonaticus</i> (6) | 100 | 83,4 | 16,7 | 0 | 0 | 50 | 16,7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 33,4 | 16,7 | 0 | 0 |
| <i>Citrobacter brakii</i> (2) | 50 | 100 | 100 | 0 | 0 | 50 | 50 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Citrobacter freundii</i> (2) | 100 | 50 | 50 | 0 | 0 | 50 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 50 | 0 | 0 | 50 |
| <i>Citrobacter intermedius</i> (3) | 100 | 66,7 | 66,7 | 0 | 0 | 66,7 | 0 | 0 | 0 | 33,4 | 0 | 0 | 0 | 33,3 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Citrobacter koseri</i> (3) | 100 | 33,3 | 0 | 0 | 0 | 33,3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 33,3 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Citrobacter sedlakii</i> (8) | 100 | 100 | 100 | 0 | 0 | 100 | 0 | 12,5 | 0 | 2,5 | 0 | 0 | 0 | 50 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Citrobacter youngae</i> (2) | 0 | 50 | 100 | 0 | 0 | 50 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 50 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Enterobacter aerogenes</i> (21) | 81 | 81 | 76,2 | 4,76 | 0 | 66,7 | 14,3 | 0 | 0 | 14,3 | 0 | 0 | 0 | 28,6 | 19,0 | 14,3 | 14,3 |
| <i>Enterobacter amnigenus</i> (1) | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Enterobacter cancerogenus</i> (3) | 100 | 66,7 | 100 | 0 | 0 | 66,7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 66,7 | 33,3 | 33,3 | 0 |
| <i>Enterobacter cloacae</i> (94) | 96,8 | 86,2 | 87,2 | 4,3 | 1,1 | 85,1 | 3,2 | 96,8 | 1,1 | 2,12 | 8,51 | 2,12 | 1,1 | 44,7 | 14,9 | 12,8 | 8,5 |
| <i>Enterobacter gergoviae</i> (6) | 66,8 | 100 | 66,7 | 0 | 0 | 83,3 | 0 | 0 | 0 | 16,7 | 0 | 0 | 0 | 50 | 0 | 16,7 | 16,7 |
| <i>Enterobacter intermedius</i> (2) | 100 | 50 | 50 | 0 | 0 | 50 | 50 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Enterobacter sp</i> (49) | 81,6 | 84,7 | 89,8 | 6,1 | 0 | 79,6 | 8,2 | 2 | 0 | 8,2 | 0 | 0 | 0 | 40,8 | 12,2 | 6,1 | 2 |
| <i>Erwinia rhapontici</i> (1) | 100 | 100 | 100 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Escherichia coli</i> (10) | 60 | 60 | 30 | 0 | 0 | 20 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 0 | 50 | 0 | 20 | 0 |
| <i>Hafnia alvei</i> (3) | 100 | 100 | 100 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> (12) | 41,7 | 8,3 | 58,3 | 0 | 0 | 16,7 | 0 | 8,3 | 0 | 16,7 | 0 | 0 | 0 | 58,3 | 8,3 | 33,3 | 0 |
| <i>Klebsiella sp</i> (1) | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Raoultella terrigena</i> (3) | 100 | 0 | 66,7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 66,7 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Serratia liquefaciens</i> (7) | 100 | 71,4 | 57,1 | 0 | 0 | 71,4 | 14,3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 57,1 | 0 | 57,1 | 0 |
| <i>Serratia marcescens</i> (18) | 88,9 | 100 | 38,9 | 0 | 0 | 88,9 | 0 | 0 | 5,6 | 27,8 | 0 | 0 | 5,6 | 100 | 33,3 | 100 | 16,7 |
| <i>Serratia odorifera</i> (9) | 77,8 | 100 | 77,8 | 11,1 | 0 | 88,9 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 | 88,9 | 11,1 |
| <i>Serratia rubidaea</i> (1) | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 | 0 |
| NÃO FERMENTADORES | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Achromobacter sp</i> (5) | 100 | 100 | 100 | 100 | 0 | 0 | 100 | 100 | 80 | 100 | 40 | 0 | 0 | 40 | 0 | 40 | 60 |
| <i>Acinetobacter sp</i> (3) | 100 | 100 | 100 | 100 | 0 | 66,7 | 66,7 | 0 | 0 | 66,7 | 0 | 0 | 0 | 100 | 66,7 | 66,7 | 66,7 |
| <i>Ralstonia pickettii</i> (6) | 100 | 100 | 100 | 100 | 0 | 0 | 0 | 100 | 100 | 100 | 16,7 | 0 | 0 | 33,4 | 0 | 16,7 | 83,3 |
| <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (2) | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 0 | 50 | 50 | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 | 50 | 100 | 0 |

AMI: amicacina, AMC: amoxicilina com ácido clavulânico, AN: ácido nalidíxico, AP: ampicilina, CF: cefalotina, CFO: cefoxitina, CTX: cefotaxima, CIP: ciprofloxacina, CO: cloranfenicol, GN: gentamicina, IPM: imipenem, LVX: levofloxacina, PLB: polimixina B, SUT: sulfametoxazol com trimetoprim, TT: tetraciclina, TIM: ticarcilina com ácido clavulânico e TB: tobramicina.^{15,17}

antimicrobianos, principalmente para as enterobactérias, que fazem parte de diferentes nichos ecológicos, conduzindo à expansão de grupos de genes de resistência na natureza^{19,20}.

Todos os bacilos Gram-negativos investigados apresentaram resistência a um ou mais dos 17 agentes antimicrobianos testados. Existe escassez de dados na literatura sobre o assunto, dificultando a comparação de nossos resultados. No entanto, as porcentagens de resistência encontradas podem ser comparadas com aquelas relatadas para bacilos Gram-negativos isolados de ambientes aquáticos, esgotos^{11,21}, vegetais²², microbiota intestinal de animais²³ e humana²⁴ e de pacientes hospitalizados²⁵.

De modo geral observou-se boa sensibilidade das cepas ao imipenem. Os isolados de *Enterobacter* sp foram mais resistentes a cefotaxima do que qualquer outra enterobactéria, coincidindo com dados encontrados em cepas isoladas de pacientes hospitalizados^{23, 25}.

Outros autores relataram a resistência antimicrobiana de bactérias de diversas fontes ambientais, principalmente, aquelas que recebem dejetos humanos ou de animais^{20,26}. Os estudos mostram que as bactérias encontradas nas fezes humanas podem ser isoladas do ambiente aquático^{11,21,27,28}, lixo de instalações hospitalares e farmacêuticas²¹, solo¹⁹, rações e outros produtos para animais²⁰, fezes de aves²³ e mamíferos^{27,20}.

Comparando isolados de *Escherichia coli* do solo, avaliados neste estudo, com isolados de amostras fecais de aves²³, observamos maior sensibilidade a cefotaxima, ciprofloxacina e levofloxacina do que naqueles isolados hospitalares^{10,23}, o que ocorreu também para *Serratia marcescens* frente à ciprofloxacina²⁵. Esse fato pode estar relacionado à pressão seletiva do uso de antibióticos no ambiente hospitalar.

A resistência das enterobactérias ao ácido nalidíxico variou de 8,2 a 33,4% e a tetraciclina de 28,6 a 100%. Resistência a estas drogas assim como aos betalactâmicos foram observadas também em isolados de água doce de afluentes urbanos¹¹ e de amostras de vegetais, onde *Enterobacter* sp também foi o isolado mais frequente, apresentando menor resistência aos antimicrobianos testados²².

Muitas espécies de bacilos Gram-negativos podem produzir betalactamases. Para restabelecer a atividade dos betalactâmicos, foram introduzidos compostos que inibem algumas destas enzimas. Desde meados dos anos 1980 têm sido usados ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam em combinação com amoxicilina e ticarcilina, ampicilina e piperacilina, respectivamente. No entanto, semelhante a outros relatos da literatura^{29,30} encontramos espécies de *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Acinetobacter*, *Serratia* e *E. coli* resistentes a amoxicilina/ácido clavulânico, sugerindo a presença de betalactamases induzidas.

A resistência intrínseca a determinados antibióticos como cefalotina, polimixina, ampicilina e tetraciclina é uma propriedade genética de algumas espécies de bacilos Gram-negativos, especialmente, enterobactérias. Este tipo de resistência foi também observado entre os isolados bacterianos, corroborando com os resultados encontrados por Tinko e Kmeč²³, em trabalho realizado com fezes de aves.

Os padrões de resistência de bacilos gram-negativos não fermentadores são diferentes daqueles dos membros da família *Enterobacteriaceae*. Estes apresentaram maiores níveis de resistência para certos antibióticos, como amicacina, ácido nalidíxico e cefotaxima. Embora o método de disco difusão não seja recomendado para bacilos gram-negativos não fermentadores, foram aplicados os padrões interpretativos para *P. aeruginosa*. No entanto, o NCCLS aconselha que seja reportado para *Stenotrophomonas maltophilia*, somente levofloxacina, sulfametoxazol+trimetoprim e ciprofloxacina^{3,17,31}.

Os bacilos Gram-negativos não fermentadores apresentaram resistência no mínimo a 58,82% dos antimicrobianos testados. Levando-se em conta o potencial de patogenicidade destas bactérias, elas representam uma preocupação na área de saúde, pois assim como as enterobactérias, os gêneros *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Ralstonia* e *Stenotrophomonas* estão dispersos no meio ambiente. São reconhecidos como fitopatógenos, com habilidade para sobreviver em superfícies secas ou úmidas, podendo estar presentes na pele de pessoas saudáveis. Devido a isto, eles podem tornar-se importantes agentes de infecções hospitalares, principalmente em pacientes imunocomprometidos ou debilitados, que se submetem a procedimentos invasivos^{6,21,25}.

CONCLUSÕES

A população bacteriana estudada apresenta considerável potencial patogênico por constituir um reservatório de resistência antimicrobiana, que poderia ser transmitido para outras bactérias, inclusive aquelas de ambiente hospitalar.

A importância deste estudo reside no fato de que pouco se conhece a respeito da conexão entre solo e resistência antimicrobiana. Somente através de experimentos e observações estaremos hábeis para entender a relação e os processos que contribuem para a emergência deste problema.

Existem várias questões com relação à origem, disseminação e controle da resistência bacteriana. Para as duas primeiras já se detém razoável conhecimento, mas com relação ao controle é que se encontram as maiores dificuldades, dependendo, sobretudo, de ações educativas e políticas.

É preciso investir na conscientização das classes médica, veterinária, farmacêutica e autoridades sanitárias, para que haja a colaboração da comunidade em geral contra o uso abusivo dos antimicrobianos, pois observa-se a preocupação cada vez maior com a falta de opção terapêutica para o tratamento das infecções hospitalares.

REFERÊNCIAS

1. Sagardoy MA, Salerno C M. Number, distribution, and characterization of heterotrophic bacteria in some Argentine soils. *An Edafol Agrobiol* 1983; 42: 269-81.

2. Cuppels D, Kelman A. Evaluation of selective media for isolation of soft-rot bacteria from soil and plant tissue. *Phytopathology* 1973; 64:468-75.
3. Gilligan PH, Whittier S. *Burkholderia*, *Stenotrophomonas*, *Ralstonia*, *Brevudimonas*, *Comamonas*, and *Acidovorax*. In: Murray PR et al. *Manual of Clinical Microbiology*. 7^a ed. Washington: ASM Press, 1999. p. 526-38.
4. Holt JG et al. Gram-negative aerobic/microaerophilic rods and cocci. In: Krieg NR, Holt JG, Berget DH, Sneath PHA. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9^a ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. p. 71-174.
5. Kiska DL, Gilligan PH *Pseudomonas*. In: Murray PR et al. *Manual of Clinical Microbiology*. 7^a ed. Washington: ASM Press, 1999. p. 517-25.
6. Schreckenberger PC, von Graevenitz A. *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Moraxella*, *Methylobacterium*, and Other Nonfermentative Gram-Negative Rods. In: Murray PR et al. *Manual of Clinical Microbiology*. 7^a ed. Washington: ASM Press, 1999. p. 539-60.
7. Farmer III J J. *Enterobacteriaceae*: Introduction and identification. In: Murray PR et al. *Manual of Clinical Microbiology*. 7^a ed. Washington: ASM Press, 1999. p. 442-58.
8. Koneman EW et al. *Enterobacteriaceae*. In Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC. *Diagnóstico Microbiológico: Texto e Atlas Colorido*. 2^a ed. S. Paulo: Panamericana, 1993. p.61 - 132.
9. Holding AJ. The properties and classification of the predominant Gram-negative bacteria occurring in soil. *J Appl Bacteriol* 1960; 23 (3):515-25.
10. Abbott S. *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, and *Serratia*. In: Murray PR et al. *Manual of Clinical Microbiology*. 7^a ed. Washington: ASM Press; 1999. p. 475-82.
11. Goñi-Urriza M et al. Impact of an Urban Effluent on Antibiotic Resistance of Riverine *Enterobacteriaceae* and *Aeromonas* spp. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66 (1):125-32.
12. Difco: DifcoManual - Medios de cultivo deshidratados y reactivos para microbiología. 10^a ed. Madrid: Graficas letra, S. A., 1984. 1166 pp.
13. Pessoa GVA, Silva EAM. Meios de Rugai e Lisina-Motilidade combinados em um só tubo para identificação presuntiva de enterobactérias. *Rev Inst Adolfo Lutz* 1972; 32: 97-100.
14. Koneman EW et al. Bacilos Gram negativos não fermentadores. In: Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC. *Diagnóstico Microbiológico: Texto e Atlas Colorido*. 2^a ed. S. Paulo: Panamericana, 1993. p. 133 - 97.
15. Sneath PHA. Bacterial classification. II. Numerical taxonomy. In: Krieg NR et al. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. vol. 1. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984. p. 5-7.
16. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standard M2-A6. NCCLS, Wayne, Pa. 1997.
17. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing; Fourteenth Informational Supplement. Approved standard M 100-S14. NCCLS, Wayne, Pa. 2004.
18. Jorgensen JH et al. Antibacterial susceptibility tests: dilution and disk diffusion methods. In: Murray PR et al. *Manual of Clinical Microbiology*. 7^a ed. Washington: ASM Press, 1999. p. 1526-43.
19. Khachatourians GG et al. Agricultural use of antibiotics and the evolution and transfer of antibiotic-resistant bacteria. *Can Med Assoc J* 1998; 59: 1129-36.
20. Meng J et al. Antibiotic resistance of *Escherichia coli* O157:H7 and O157:NM isolated from animals, food, and humans. *J Food Prot* 1998; 61: 1511-4.
21. Guardabassi L et al. Antibiotic resistance in *Acinetobacter* spp. isolated from sewers receiving waste effluent from a hospital and a pharmaceutical plant. *Appl Environ Microbiol* 1998; 64:3499-502.
22. Österblad M et al. Antimicrobial susceptibility of *Enterobacteriaceae* isolated from vegetables. *J Antimicrob Chemother* 1999; 43: 503-9.
23. Timko J, Kmeč V. Susceptibility of *Enterobacteriaceae* from the Alpine Accentor *Prunella collaris*. *Acta Vet. Brno* 2003; 72: 285-8.
24. Calva JJ, Sufuentes-Osonio J, Ceren C. Antimicrobial resistance in fecal flora: longitudinal community-based surveillance of children from urban México. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40:1699-702.
25. Wenzel RP et al. In Vitro Susceptibilities of Gram-Negative Bacteria Isolated from Hospitalized Patients in Four European Countries, Canada, and the United States in 2000-2001 to Expanded-Spectrum Cephalosporins and Comparator Antimicrobials: Implications for Therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 3089-98.
26. Schmidt AS et al. Occurrence of antimicrobial resistance in fish-pathogenic and environmental bacteria associated with four Danish rainbow trout farms. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66: 4908-15.
27. Arvanitidou M, Katsouyannopoulos V, Tsakris A. Antibiotic resistance patterns of enterococci isolated from coastal bathing waters. *J Med Microbiol* 2001; 50:1001-5.
28. Lobova TI et al. Geographical and seasonal distribution of multiple antibiotic resistance of heterotrophic bacteria of Lake Shira. *Aquatic Ecology* 2002; 36: 299-307.
29. Martínez JL et al. Resistance to betalactam/clavulanate. *Lancet* 1987; 2: 147-53.
30. Page JWJ, Farmer TH, Elson SW. Hyperproduction of TEM-1 beta-lactamase by *Escherichia coli* strains. *J Antimicrob Chemother* 1989; 23: 160-1.
31. Visalli MA, Jacobs MR, Appelbaum PC. Susceptibilities of non-*Pseudomonas aeruginosa* Gram-negative nonfermentative rods to ciprofloxacin, ofloxacin, levofloxacin, D-ofloxacin, sparfloxacin, ceftazidime, piperacillin, piperacillin-tazobactam, trimethoprim-sulfamethoxazole, and imipenem. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 772-5.

Biological response of rats to resistant starch

Resposta biológica de ratos ao amido resistente

RIALA6/1048

Melissa WALTER^{1*}; Leila P. da SILVA²; Daiana M. X. PERDOMO

* Endereço para correspondência: Núcleo Integrado de Desenvolvimento em Análises Laboratoriais, Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria – USFM – CEP 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil. E-mail: melmelissaw@yahoo.com.br

¹ Núcleo Integrado de Desenvolvimento em Análises Laboratoriais, Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

² ProDoc, beneficiária de auxílio financeiro CAPES, Brasil
Recebido: 07/06/2005 – Aceito para publicação: 13/12/2005

ABSTRACT

Several investigations have been done on resistant starch (RS) due to its beneficial effects, such as reduction of dietary energy, increased fecal production and growth of beneficial microorganisms in intestinal tract, among others. The present study aimed at evaluating the influence of RS on some biological response parameters. Male Wistar rats (97.1±5.3g) were fed diets supplemented with 0, 3, 9 and 18% of RS. Animals were submitted to an adaptation period of five days. During the experimental period (15 days), data and samples were obtained to assess the following parameters: feed intake, body weight gain, apparent dry matter digestibility, apparent starch digestibility, wet and dry fecal production, fecal water content, pH and nitrogen. Addition of RS to the diets did not influence the feed intake, but it significantly reduced the animals body weight. Wet and dry fecal productions were significantly higher at adding 9 and 18% of RS. The consumption of RS also significantly increased the water content and nitrogen excretion in feces, and decreased the fecal pH. The effects observed in the present study might essentially resulted from reduced apparent starch digestibility, and from its fermentation by intestinal microflora, demonstrating the beneficial effects of RS on health maintenance.

Key Words. starch, undigestible carbohydrates, dietary fiber, intestinal function, fecal production, nitrogen excretion.

RESUMO

O amido resistente (AR) vem sendo intensamente pesquisado nos últimos anos em função de seus efeitos benéficos, como redução da energia da dieta, aumento da produção de fezes e desenvolvimento de microrganismos benéficos no trato intestinal, entre outros. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência do AR da dieta sobre alguns parâmetros de resposta biológica. Foram utilizados ratos machos Wistar (97,1±5,3g) alimentados com rações experimentais suplementadas com 0, 3, 9 e 18% de AR. Os animais foram submetidos a um período de adaptação de 5 dias e, durante o período experimental (15 dias), foram obtidos dados e amostras para a determinação do consumo, ganho de peso, digestibilidade aparente da matéria seca e do amido, produção de fezes úmidas e secas, umidade, pH e nitrogênio nas fezes. A adição de AR às rações não influenciou o consumo, mas diminuiu significativamente o peso dos animais. A produção de fezes úmidas e secas foi significativamente maior em níveis de 9 e 18% de AR. O consumo de AR também aumentou significativamente o teor de umidade e de nitrogênio nas fezes, bem como diminuiu o pH fecal. Os efeitos observados neste trabalho podem ser essencialmente atribuídos à menor digestibilidade aparente do amido e a sua fermentação pela microflora intestinal, o que demonstra seu efeito benéfico no auxílio à manutenção da saúde.

Palavras-Chave. amido, carboidratos indigestíveis, fibra dietética, função intestinal, produção de fezes, excreção de nitrogênio.

INTRODUCTION

Several modern diseases result from inadequate feeding, and some may be related to insufficient fiber intake. Although this fraction exerts important biological effects on health balance, its consumption is restricted, especially due to its sensorial properties, since the addition of traditional fiber sources causes pronounced organoleptic alterations (e.g. bread enriched with wheat bran)¹.

In this context, there is the option of using another indigestible carbohydrate, resistant starch (RS), defined as the sum of starch and products of starch degradation not absorbed in the small intestine of healthy individuals². It has properties similar to fiber, but with less pronounced organoleptic alterations.

RS, not being digested by the enzymes in the human gastrointestinal tract, is considered a reductor of dietary energy, and may have significant effects on body weight³. It also increases fecal mass, helps prevent constipation and hemorrhoids, and dilutes toxic compounds¹. This fraction has also been associated with reduced post-prandial glycemic and insulinemic responses, which may have beneficial implications for the management of diabetes⁴; and reduced blood levels of both cholesterol and triacylglycerols^{5,6}.

Behaving as a substrate for growth of beneficial microorganisms, RS may act as a potential prebiotic agent⁷. Besides, the products of starch fermentation reduce cecal and fecal pH^{8,9}, and help in the prevention of inflammatory intestinal diseases and certain types of cancer¹⁰.

Considering this, the present research aimed at evaluating RS effects on feed intake, body weight gain, apparent dry matter digestibility, apparent starch digestibility, wet and dry fecal

excretion, fecal water content, fecal pH and fecal nitrogen excretion in rats.

MATERIALS AND METHODS

Diets and treatments

Four diets (AIN 93G) were formulated (Table 1), according to the recommendations of the American Institute of Nutrition (AIN)¹¹, all of them containing equivalent contents of protein, fat, vitamins, minerals and total carbohydrates, but differing in RS content. The starch source was cornstarch containing less than 0.1% of RS. The RS source was a high amylose corn starch (Novelose 260[®]), containing 53.5% of RS type 2, obtained from National Starch & Chemical Industrial Ltda (Sao Paulo, Brazil). These diets formed the treatments:

- **Control:** diet not supplemented with RS;
- **3% RS:** diet where Novelose 260[®] substituted for part of the cornstarch in order to obtain 3% of RS in the total composition;
- **9% RS:** diet where Novelose 260[®] substituted for part of the cornstarch in order to obtain 9% of RS in the total composition;
- **18% RS:** diet where Novelose 260[®] substituted for part of the cornstarch in order to obtain 18% of RS in the total composition.

Animals and experiment

Thirty-two male rats (*Rattus norvegicus*, Wistar albino F1, Biotério Central/Universidade Federal de Santa Maria, age 30 days, initial body weight 97.1±5.3g) were randomly

Table 1. Composition (g/kg) of the experimental diets (AIN 93G).

| | Control | 3% RS | 9% RS | 18% RS |
|--|---------|---------|---------|---------|
| Cornstarch | 620.692 | 564.622 | 452.472 | 284.242 |
| Casein | 140 | 140 | 140 | 140 |
| Sucrose | 100 | 100 | 100 | 100 |
| Soybean oil | 40 | 40 | 40 | 40 |
| Purified cellulose | 50 | 50 | 50 | 50 |
| Novelose 260 [®] | 0 | 56.07 | 168.22 | 336.45 |
| Mineral and vitamin mix ⁽¹⁾ | 20 | 20 | 20 | 20 |
| Sodium chloride | 2.60 | 2.60 | 2.60 | 2.60 |
| Bicalcium phosphate | 15 | 15 | 15 | 15 |
| Calcium carbonate | 6 | 6 | 6 | 6 |
| L-Cystine | 1.8 | 1.8 | 1.8 | 1.8 |
| Choline bitartrate | 2.5 | 2.5 | 2.5 | 2.5 |
| TBHQ ⁽²⁾ | 8 | 8 | 8 | 8 |

⁽¹⁾ Mineral and vitamin mix (g or mg/kg mix): K 102.86g; S 8.57g; Mg 14.48g; Fe 1.00g; Zn 0.86g; Si 0.14g; Mn 0.30g; Cu 0.17g; Cr 0.028g; B 14.26mg; F 28.73mg; Ni 14.31mg; Li 2.85mg; Se 4.28mg; I 5.93mg; Mo 4.32mg; V 2.87mg; nicotinic acid 3.00g; Ca pantothenate 1.60g; pyridoxine-HCl 0.70g; thiamin-HCl 0.60g; riboflavin 0.60g; folic acid 0.20g; biotin 0.02g; vitamin B12 2.50g; vitamin E 15.00g; vitamin A 0.80g; vitamin D3 0.25g; vitamin K1 0.075g.

⁽²⁾ TBHQ: tert-butylhydroquinone.

distributed among the treatments (8 animals/treatment), and individually housed in metabolic cages, with free access to diet and water. The period of adaptation was 5 days, during which the animals were consuming the experimental diets. After that, the experimental period (15 days) began, when the determination of feed intake and the collection of the feces were made daily. The body weight of the animals was obtained every three days.

During adaptation and experimental period, temperature was maintained at $21 \pm 2^\circ\text{C}$, and lighting was controlled by alternating periods of 12 hours of light and dark.

Analytical Methods

The determination of fecal water content ($105^\circ\text{C}/12\text{h}$) and fecal nitrogen (Micro-Kjeldahl) were carried out according to methods mentioned in AOAC¹². Fecal pH was obtained from a solution of 1g of partly dried feces ($50^\circ\text{C}/48\text{h}$) in 10ml of distilled water (method developed by the Núcleo Integrado de Desenvolvimento em Análises Laboratoriais, by orientation of Dr. Leila Picolli da Silva).

Starch content of the starch and RS sources and feces was determined by the AOAC¹² method 996.11, modified by Walter¹³. The samples (300mg) were incubated with thermostable α -amylase (100 μl) in phosphate buffer pH 6.8 (3ml) at 95°C for 5 minutes, protease (100 μl) at 60°C for 30 minutes, and amyloglucosidase (100 μl) in acetate buffer 200mM pH 4.5 (4ml) at 50°C for 30 minutes. After centrifugation, the supernatants were used to the quantification of digestible starch (DS). The residues were treated with dimethylsulfoxide (DMSO) (2ml) at 95°C for 5 minutes, and then incubated with α -amylase (100 μl) in phosphate buffer pH 6.8 (3ml) at 95°C for 5 minutes, and amyloglucosidase (100 μl) in acetate buffer 200mM pH 4.5 (4ml) at 50°C for 30 minutes. After centrifugation, the supernatants were used to the quantification of RS. Glucose from DS and RS degradation was quantified by reaction with glucose oxidase-peroxidase reagent.

Apparent dry matter digestibility (ADMD) was calculated as the proportion of ingested dry matter that was

not later recovered in the feces¹⁴. Apparent starch digestibility (ASD) was calculated as the proportion of starch ingested that was not later recovered in the feces¹⁴.

Experimental design and statistical analysis

The experiment was carried out in a completely random design. The results obtained were submitted to analysis of variance, with the means compared by Duncan's test at 5% of significance. The results were also submitted to correlation analysis at 5% of significance. Statistical analysis was performed using SPSS for Windows 8.0 (1997).

RESULTS AND DISCUSSION

Feed intake, body weight gain, apparent dry matter digestibility and apparent starch digestibility

The addition of RS to the experimental diets did not influence feed intake, but reflected significantly on body weight (Table 2). Some researches have demonstrated that increases in diluting compounds, even though they reduce digestible energy in the diet, do not cause significant effect on feed intake and, many times, on body weight gain of the animals¹⁵. Schulz et al.¹⁶ and Younes et al.¹⁷, using 24% of RS in the diet of young rats, also did not observe significant effects on feed intake and body weight of the animals. In studies with humans, the inclusion of 30g of RS per day in the diet did not affect the body weight, although the subjects reported increased satiety¹⁸. These results may be explained by the fact that, although the energy value of starch that was excreted intact in the feces is zero, fermented starch has a positive energy value, although significantly lower than that of starch which had been digested and absorbed in the form of glucose¹⁹.

The addition of 18% of RS in the diet did not affect feed intake, but significantly reduced the body weight gain of the animals (Table 2). This was also observed in the results by Morand et al.³, using the same level of RS in the diet of adult rats, demonstrating that this effect is independent of the

Table 2. Effect of increasing levels of resistant starch (RS) on animals' performance.

| | Control | 3% RS | 9% RS | 18% RS |
|-------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| Feed intake (g) ⁽¹⁾ | 104.06 \pm 11.15 ^a | 101.91 \pm 10.27 ^a | 103.91 \pm 3.31 ^a | 99.95 \pm 9.18 ^a |
| Body weight gain (g) ⁽²⁾ | 1.34 \pm 4.89 ^a | 1.01 \pm 2.93 ^a | -0.75 \pm 2.23 ^a | -6.76 \pm 4.22 ^b |
| ADMD (%) ⁽³⁾ | 91.91 \pm 0.53 ^a | 91.35 \pm 0.61 ^a | 88.95 \pm 0.99 ^b | 86.83 \pm 1.27 ^c |
| ASD (%) ⁽⁴⁾ | 99.29 \pm 0.11 ^a | 98.82 \pm 0.37 ^b | 98.26 \pm 0.35 ^c | 97.86 \pm 0.31 ^d |

⁽¹⁾ Feed consumed during the experimental period.

⁽²⁾ Body weight gained during the experimental period.

⁽³⁾ Apparent dry matter digestibility.

⁽⁴⁾ Apparent starch digestibility.

Results expressed as mean value \pm standard deviation.

Mean values followed by the same letter on the same line are not significantly different (Duncan's test at a level of 5% of significance).

development stage of the animal. Researches show that diets rich in RS reduce epididymal fat pads^{5,20}, probably due to the reduction of dietary energy caused by the substitution of DS by RS. Thus, it may reduce body fat and, consequently, body weight, just like the results obtained in the present research.

The dilution effect of RS is evidenced by the lower values of apparent dry matter digestibility (ADMD) in the present study, ascribed essentially to the lower apparent starch digestibility (ASD) (Table 2). However, it was expected a more pronounced reduction in the ASD, in accordance with the RS levels of the experimental diets. This fact was not observed, because part of the RS that escapes digestion in the small intestine is fermented by the colonic bacteria, reducing the amount of starch excreted in the feces. Andrieux e Sacquet²¹ reported ASD values of 98% for conventional rats, compared to only 68% in germ free rats, demonstrating the effect of the microflora on RS fermentation. This increased bacterial activity may reflect significantly on quantitative and qualitative fecal characteristics, such as production and water content.

Wet and dry fecal production, and fecal water content

Wet and dry fecal production, although not affected by the addition of 3% of RS to the diet, was significantly increased with 9 and 18% of RS (Table 3). Fecal water content was significantly increased by RS addition, regardless of the level used (Table 3).

De Schirjver et al.²², including 6% of RS to the diet of rats and pigs, also reported a significant increase in fecal production. Similarly, Faulks et al.²³, De Deckere et al.⁵ and Verbeek et al.²⁴ observed increased wet and dry fecal production adding 10, 14 and 14% of RS to the diet of rats, respectively. In studies with humans, the consumption of 30 to 39g of RS per day, besides increasing fecal production, also facilitated defecation, but caused increased flatulence^{18,25}.

Other studies with humans also demonstrated that higher consumption of RS increases fecal production. Shetty e Kurpad²⁶, providing 100g per day of cornstarch rich in RS, reported an increase of 30% in fecal mass, without modifying the transit time. Scheppach et al.²⁷, by inhibiting starch digestion in the small intestine with acarbose, observed an increase of 68% in this parameter.

This increase of fecal production cannot be attributed only to the resistance of starch to digestion, since its apparent digestibility was higher than expected (Table 3), but also to its effects on bacteria present in the ceccum and large intestine, and on water retention. Eastwood²⁸ and Wenk²⁹ reported that the increased bacterial activity in the gastrointestinal tract, promoted by the higher content of indigestible carbohydrates, increases the excretion of bacterial constituents, which may represent a significant part of the fecal mass.

Regarding the higher fecal water content, De Schirjver et al.²² and Gee et al.¹⁹ reported results similar to those obtained in the present study, adding, respectively, 6 and 10% of RS to the diet of rats.

Stephen e Cummings³⁰ and Jeraci e Horvath³¹ explain that the increase in fecal water content of animals fed diets rich in indigestible compounds may not be related only to its hydration capacity, but also to a higher production and excretion of bacterial mass (demonstrated by the increased fecal nitrogen excretion and the reduced fecal pH – Table 4), which also has a high water-holding capacity.

The increased fecal production is important to prevent constipation and hemorrhoids, as well as to provide a substrate for increased bacterial growth, which increases production and concentration of potentially protective by-products while diluting production and concentration of potentially toxic compounds⁹.

Fecal pH and nitrogen excretion

The increase of RS levels in the experimental diets significantly influenced fecal pH ($r = -0.90$; $p < 0.01$) and fecal nitrogen excretion ($r = 0.84$; $p < 0.01$) (Figure 1, Table 4).

The decreased pH with RS consumption as well as the increased fecal concentration of short chain fatty acids was also observed in studies with humans^{8,25}. Similarly, Hillman et al.³² reported a reduction in fecal pH with increasing levels of cellulose in diets for humans. This effect may be explained by the increase of indigestible carbohydrates available for fermentation, which, reaching the colon, are fermented by the microflora, resulting in the production of organic acids. Part of these acids is used by the organism, and part is excreted in the

Table 3. Effect of increasing levels of resistant starch (RS) on fecal production and water content.

| | Control | 3% RS | 9% RS | 18% RS |
|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| WFP (g) ⁽¹⁾ | 10.68±1.07 ^c | 11.97±2.50 ^c | 15.64±1.18 ^b | 18.72±2.85 ^a |
| DFP (g) ⁽²⁾ | 8.70±0.83 ^c | 8.82±1.10 ^c | 11.48±1.00 ^b | 12.70±1.62 ^a |
| Fecal water content (%) | 18.47±1.22 ^b | 25.21±6.33 ^a | 26.42±6.27 ^a | 30.06±7.86 ^a |

⁽¹⁾ Wet fecal production during the experimental period.

⁽²⁾ Dry fecal production during the experimental period.

Results expressed as mean value ± standard deviation.

Mean values followed by the same letter on the same line are not significantly different (Duncan's test at a level of 5% of significance).

feces, resulting in lower pH, which is desirable for the maintenance of a healthy intestinal microflora.

The increase in fecal nitrogen excretion is also an indication of increased fermentative activity in the cecocolic region of animals submitted to diets with higher levels of RS (Table 4). De Schrijver et al.²² and Younes et al.¹⁷ reported that the addition of 6 and 25% of RS to the diet of rats, respectively, significantly increased fecal nitrogen excretion. Likewise, the consumption of diets rich in fiber also increases fecal nitrogen excretion, which is normally associated with considerable development of ceccum microflora³³.

Probably, the results obtained in these studies, as those obtained in the present study, are due to the accelerated growth of cecocolic microorganisms, since the breakdown of high amounts of carbohydrates increases nitrogen incorporation in bacterial proteins^{34,17}.

The nitrogen required for optimal bacterial growth is provided by proteins escaping small intestine breakdown, endogenous proteins (pancreatic and intestinal secretions, sloughed epithelial cells), or blood urea diffusing into digestive contents¹⁷. Therefore, the increase in fecal nitrogen excretion could correspond to an increased fecal excretion of bacterial proteins and to a shift of nitrogen excretion from urine to the feces³⁵.

Several sources of nitrogen used for rapid bacterial growth are metabolites of protein (phenol, cresol, indoles, amines and ammonia) that may have deleterious effects on the

organism, such as development of skin, bladder and bowel cancer. So the presence of fermentable carbohydrates in the colon, neutralizing these metabolites, reduces the risk of certain kinds of cancer¹⁰. Besides, the shift of nitrogen excretion from urine to feces may help the management of chronic renal disease¹⁷.

Through the results obtained in the present study, we may conclude that, except for feed intake, RS type 2 significantly affected all other evaluated parameters. These effects are essentially attributed to the lower apparent starch digestibility and its fermentation by the intestinal microflora, which demonstrate its beneficial effect on health maintenance.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors acknowledge the financial support granted by “Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)”, National Starch & Chemical Industrial Ltda for the donation of Novolose 260[®], and Novozymes Latin American Limited for the donation of the enzymes used in starch determination.

REFERENCES

1. Yue P, Waring S. Resistant starch in food applications. *Cereal Food World* 1998; 43:690-5.
2. Faisant N, Champ M, Colonna P, Buléon A. Structural discrepancies in resistant starch obtained *in vivo* in humans and *in vitro*. *Carbohydr Polym* 1993; 21:205-9.
3. Morand C, Rémésy C, Levrat MA, Demigné C. Replacement of digestible wheat starch by resistant cornstarch alters splanchnic metabolism in rats. *J Nutr* 1992; 122:345-54.
4. Kabir M, Rizkalla SW, Champ M, Luo J, Boillot J, Bruzzo F et al. Dietary amylose-amylopectin starch content affects glucose and lipid metabolism in adipocytes of normal and diabetic rats. *J Nutr* 1998; 128:35-43.
5. De Deckere EAM, Kloots WJ, Van Amelsvoort JMM. Both raw and retrograded starch decrease serum triacylglycerol concentration and fat accretion in the rat. *Br J Nutr* 1995; 73:287-98.
6. Jenkins DJA, Wolever TM, Jenkins AL. Starchy foods and glycemic index. *Diabetes Care* 1988; 11:149-59.
7. Haralampu SG. Resistant starch – a review of the physical properties and biological impact of RS₃. *Carbohydr Polym* 2000; 41:285-92.
8. Ahmed R, Segal I, Hassan H. Fermentation of dietary starch in humans. *Am J Gastroenterol* 2000; 95:1017-20.
9. Bianchini F, Caderni G, Magno C, Testolin G, Dolara P. Profile of short-chain fatty acids and rectal proliferation in rats fed sucrose or cornstarch diets. *J Nutr* 1992; 122:254-61.

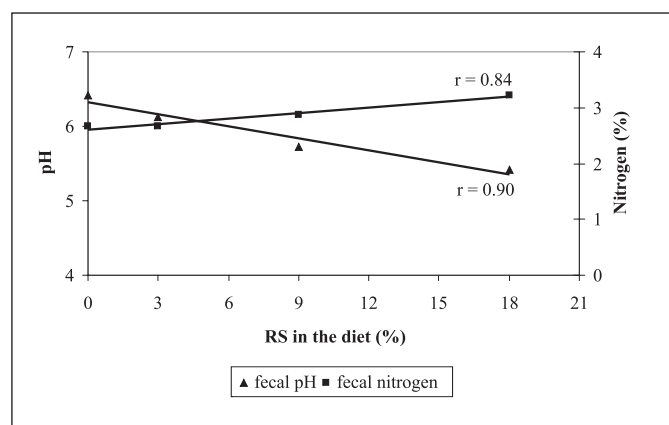


Figure 1. Effect of different levels of resistant starch (RS) in the diet on fecal pH and nitrogen excretion in rats.

Table 4. Resistant starch (RS) effects on fecal pH and nitrogen excretion.

| | Control | 3% RS | 9% RS | 18% RS |
|------------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| Fecal pH | 6.42±0.08 ^a | 6.12±0.15 ^b | 5.73±0.21 ^c | 5.41±0.22 ^d |
| Fecal nitrogen excretion (%) | 2.66±0.12 ^c | 2.66±0.12 ^c | 2.88±0.04 ^b | 3.22±0.22 ^a |

Results expressed as mean value ± standard deviation.

Mean values followed by the same letter on the same line are not significantly different (Duncan’s test at a level of 5% of significance).

10. Tharanathan RN. Food-derived carbohydrates – Structural complexity and functional diversity. *Crit Rev Biotechnol* 2002; 22:65-84.
11. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey Jr GC. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 1993; 23:1939-51.
12. AOAC – Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis of the AOAC International. 16th ed., supplement 1998. Washington: AOAC, 1995.
13. Walter, M. Amido resistente: metodologias de quantificação e resposta biológica em ratos [Dissertação de mestrado]. Santa Maria, Rio Grande do Sul: Universidade Federal de Santa Maria, 2005, 96 pp.
14. Brunsgaard G, Bach Knudsen KE, Eggum BO. The influence of the period of adaptation on the digestibility of diets containing different types of indigestible polysaccharides in rats. *Br J Nutr* 1995; 74:833-848.
15. NRC - National Research Council. Nutrient Requirement of Laboratory Animals – Nutrient Requirement of Domestic Animals. Washington: National Academy Press; 1995.
16. Schulz AGM, Van Amelsvoort JMM, Beynen AC. Dietary native resistant starch but not retrograded resistant starch raises magnesium and calcium absorption in rats. *J Nutr* 1993; 123:1724-31.
17. Younes H, Demigné C, Behr S, Rémésy C. Resistant starch exerts a lowering effect on plasma urea by enhancing urea N transfer into the large intestine. *Nutr Res* 1995; 15:1199-210.
18. Jenkins DJA, Vuksan V, Kendall CWC, Würsch P, Jeffcoat R, Waring S et al. Physiological effects of resistant starches on fecal bulk, short chain fatty acids, blood lipids and glycemic index. *J Am Coll Nutr* 1998; 17:609-16.
19. Gee JM, Faulks RM, Johnson IT. Physiological effects of retrograded, a-amylase-resistant cornstarch in rats. *J Nutr* 1991; 121:44-9.
20. De Deckere EAM, Kloots WJ, Van Amelsvoort JMM. Resistant starch decreases serum total cholesterol and triacylglycerol concentrations in rats. *J Nutr* 1993; 123:2142-51.
21. Andrieux C, Sacquet E. Effects of amylo maize starch on mineral metabolism in the adult rat: role of the microflora. *J Nutr* 1986; 116:991-8.
22. De Schrijver R, Vanhoof K, Vande Ginste J. Nutrient utilization in rats and pigs fed enzyme resistant starch. *Nutr Res* 1999; 19:1349-61.
23. Faulks RM, Southon S, Livesey G. Utilization of a-amylase (EC 3.2.1.1) resistant maize and pea (*Pisum sativum*) starch in the rat. *Br J Nutr* 1989; 61:291-300.
24. Verbeek MJF, De Deckere EAM, Tijburg LBM, Van Amelsvoort JMM, Beynen AC. Influence of dietary retrograded starch on the metabolism of neutral steroids and bile acids in rats. *Br J Nutr* 1995; 74:807-20.
25. Phillips J, Muir JG, Birkett A, Lu ZX, Jones GP, O'Dea K et al. Effect of resistant starch on fecal bulk and fermentation-dependent events in humans. *Am J Clin Nutr* 1995; 62:121-30.
26. Shetty PS, Kurpad AV. Increasing starch intake in the human diet increases fecal bulking. *Am J Clin Nutr* 1986; 43:210-2.
27. Scheppach W, Fabian C, Ahrens F, Spengler M, Kasper H. Effect of starch malabsorption on colonic function and metabolism in humans. *Gastroenterology* 1988; 95:1549-55.
28. Eastwood MA. The physiological effect of dietary fiber: an update. *Annu Rev Nutr* 1992; 12:19-35.
29. Wenk C. The role of dietary fibre in the digestive physiology of the pig. *Anim Feed Sci Tech* 2001; 90:21-33.
30. Stephen AM, Cummings JH. Water-holding by dietary fibre in vitro and its relationship to faecal output in man. *Gut* 1979; 20:722-9.
31. Jeraci JL, Horvath PS. In vitro fermentation of dietary fiber by human fecal organisms. *Anim Feed Sci Tech* 1989; 23:121-40.
32. Hillman L, Peters S, Fischer A, Pomare EW. Differing effects of pectin, cellulose and lignin on stool pH, transit time and weight. *Br J Nutr* 1983; 50:189-95.
33. Eggum BO, Beames RM, Wolstrup J, Bach Knudsen KE. The effect of protein quality and fibre level in the diet and microbial activity in the digestive tract on protein utilization and energy digestibility in rats. *Br J Nutr* 1984; 51:305-14.
34. Demigné C, Rémésy C, Rayssiguier Y. Effect of fermentable carbohydrates in volatile fatty acids, ammonia and mineral absorption in the rat caecum. *Reprod Nutr Dev* 1980; 20:1351-59.
35. Demigné C, Rémésy C. Influence of unrefined potato starch on cecal fermentations and volatile fatty acid absorption in rats. *J Nutr* 1982; 112:2227-34.

Importância do diagnóstico laboratorial na busca de casos de tuberculose em um hospital psiquiátrico

Searching tuberculosis cases in a psychiatric hospital: importance of laboratory diagnosis

RIALA6/1049

Hindenburg C. G. da COSTA^{1,2}; Ana Carolina MALASPINA¹; Fernando F. de MELLO³; Clarice Q. F. LEITE^{1*}

* Endereço para correspondência: Rodovia Araraquara-Jaú Km 01 CEP 14801-902 Araraquara-SP e-mail leitecqf@fcar.unesp.br

¹ Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara-SP

² Laboratório Hormonal, Rio Verde-GO.

³ Ambulatório Clemente Ferreira, São Paulo-SP

Recebido: 19/08/2004 – Aceito para publicação: 09/09/2005

RESUMO

Durante o período de fevereiro a agosto de 2002, a pesquisa de *M. tuberculosis* foi realizada entre 74 internos de um Hospital Psiquiátrico no interior do Estado de Goiás - Brasil. Micobactérias foram isoladas de cinco (6,8 %) dos pacientes analisados, sendo identificados quatro *Mycobacterium tuberculosis* e um *Mycobacterium chelonae*. A baciloscopia foi positiva apenas para a amostra de escarro contendo *M. chelonae*. O cultivo possibilitou o isolamento de *M. tuberculosis* a partir de espécimes clínicos de quatro pacientes com baciloscopia negativa. As micobactérias foram identificadas por meio de metodologia clássica, análise de ácidos micólicos e biologia molecular (PCR). A técnica de PCR, por tratar-se de um método mais sensível e específico, detectou *M. tuberculosis* em uma cultura em que apenas *M. chelonae* foi identificado por meio de técnicas convencionais. Os quatro isolados de *M. tuberculosis* foram sensíveis a isoniazida e rifampicina no método das proporções de sensibilidade as drogas, empregado neste trabalho.

Palavras-Chave. hospital psiquiátrico, reação da polimerase em cadeia, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium chelonae*, ácidos micólicos, sensibilidade a drogas.

ABSTRACT

From February to August of 2002, the search for *M. tuberculosis* was performed among 74 inpatients from the Psychiatric Hospital of Goiás - Brazil. Mycobacteria were isolated from five (6.8%) patients, being four *M. tuberculosis* isolates and one *M. chelonae*. *M. chelonae* positive result on bacilloscopy was observed in a sputum sample only. *M. tuberculosis* was isolated culture of clinical specimens from four smear-negative patients. Mycobacteria species were identified by means of conventional methods, mycolic acids analysis, and PCR technique. The most specific and sensitive method - PCR detected *M. tuberculosis* on a culture and *M. chelonae* was only identified by means of conventional methods. According to drug susceptibility profiles, all of four *M. tuberculosis* isolates were susceptible to isoniazid and riphampicin.

Key Words. psychiatric hospital, polymerase chain reaction technique, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium chelonae*, mycolic acids, drug sensibility.

INTRODUÇÃO

A tuberculose é a causa mais comum de morte infecciosa em adultos no mundo¹. No Brasil são registrados cerca de 129.000 casos novos e aproximadamente 7.000 óbitos por ano². O alto índice de tuberculose no Brasil decorre das deficiências da rede de saúde pública, das dificuldades para diagnosticar a doença ou até mesmo de identificar os enfermos que não procuram ou estão impossibilitados de procurar os postos de saúde. Dentre estes últimos, de acordo com Voahangy et al.³, a prevalência da tuberculose em pacientes enclausurados é 16 vezes maior do que na população em geral, sugerindo que a taxa de transmissão é alta nesses ambientes. Lourenço et al.⁴ verificaram alta taxa de resistência a drogas (17,2 %) entre 58 amostras de *M. tuberculosis* isolados do Sanatório Penal Masculino do Rio de Janeiro.

A confirmação do diagnóstico da tuberculose faz-se através da visualização do bacilo álcool-ácido resistente na baciloscopia e do cultivo do microrganismo em meios seletivos a partir de materiais biológicos. A técnica de cultura é uma metodologia mais sensível do que a baciloscopia, fornecendo resultados positivos com apenas 10 a 100 bacilos por mL de escarro. Para o cultivo através do método de Petroff⁵, inicialmente é feita a descontaminação do escarro empregando solução de hidróxido de sódio a 4% e o material descontaminado é cultivado em meio Lowestein-Jensen (LJ). Kudoh e Kudoh⁶ propuseram uma técnica simplificada que permite a descontaminação da amostra de escarro em *swab* de algodão apenas com sua imersão em solução de hidróxido de sódio a 4%, seguido de semeadura em meio de cultura de Ogawa.

A identificação das espécies de micobactérias é então realizada através da verificação da capacidade do microrganismo em crescer no meio LJ contendo inibidores como o ácido *p*-nitrobenzóico (PNB) e tiocemicarbazona (THC) e através de provas bioquímicas como a produção das enzimas catalase, nitrato redutase e niacina⁵. A identificação clássica é demorada, levando cerca de duas semanas, uma vez que vários destes testes requerem a visualização do aparecimento de colônias, sendo também fastidiosa, exigindo a preparação de meios complexos⁵. Com o objetivo de agilizar a identificação das micobactérias, diversos métodos alternativos para detecção do bacilo da tuberculose ou parte de seus componentes têm sido propostos, tais como: métodos químicos e de biologia molecular.

Dentre os métodos químicos, a análise de ácidos micólicos usando a técnica de cromatografia em camada delgada tem sido empregada com bastante sucesso na identificação das micobactérias⁷. A cromatografia em camada delgada e outros sistemas para cromatografia de lipídeos da parede celular são técnicas rápidas de identificação das espécies de micobactérias. Leite et al.⁷ recomendam a sua utilização principalmente na identificação de culturas mistas.

Como método de biologia molecular, a técnica de PCR tem sido amplamente utilizada para identificação de micobactérias⁸. Esta técnica amplifica seqüências específicas

do DNA cromossômico denominadas de seqüência alvo. As seqüências repetitivas, denominadas de segmentos de inserção (IS), têm sido pesquisadas e o segmento IS6110 é uma das seqüências mais exploradas para o diagnóstico de doenças causadas por *M. tuberculosis*⁹.

Em relação ao tratamento da tuberculose, desde o final da década de 70, o arsenal terapêutico disponível passou a ser constituído por cinco drogas principais: estreptomicina (S), isoniazida (I), rifampicina (R), etambutol (E) e pirazinamida (P)⁴. Para se determinar o perfil de sensibilidade do *M. tuberculosis* frente a estas drogas, o método das proporções é considerado o método de eleição em toda a América Latina. Este método consiste em se estabelecer a proporção de mutantes resistentes às diferentes drogas em uma cepa de *M. tuberculosis*⁵.

Em vista do exposto, este trabalho teve como objetivo diagnosticar entre os pacientes internos de um hospital psiquiátrico casos de tuberculose e de outras micobacterioses através de métodos clássicos, análise de ácidos micólicos e técnica de PCR.

MATERIAL E MÉTODOS

Material analisado

Durante o período de fevereiro a agosto de 2002, três amostras de escarro matinais obtidos espontaneamente foram coletadas de cada um dos 74 pacientes internos (39 mulheres e 35 homens), totalizando 222 amostras. O estudo foi acompanhado por um corpo clínico especializado em clínica geral, sendo todos os pacientes submetidos a exames clínicos e radiológicos.

Quanto ao aspecto ético, o estudo teve aprovação do Comitê de Ética do referido hospital no ano de 2002.

Baciloscopia e cultivo

Para a baciloscopia, foram coletados porções purulentas de escarro e preparado dois esfregaços corados pela técnica de Ziehl-Neelsen⁵.

O volume restante dos materiais foi destinado ao cultivo pela técnica de Kudoh e Kudoh⁶. Para tal, com o auxílio de *swabs*, retirou-se parte da porção mais densa ou purulenta do material, que foi mergulhada em um tubo contendo solução de hidróxido de sódio a 4% e deixado em contato por 2 a 3 minutos. Em seguida, o material descontaminado foi semeado sobre a superfície do meio sólido inclinado de Ogawa. Os tubos inclinados foram acondicionados em estufa a 37°C e mantidos por 60 dias, fazendo-se observações no 2°, 7°, 12°, 24°, 30°, 40° e 60° dia de incubação. As colônias com características compatíveis com a de micobactérias foram cultivadas em novos tubos de Ogawa para identificação posterior.

Identificação

As bactérias foram analisadas quanto às propriedades de álcool-ácido-resistência, aspectos fisiológicos (temperatura e velocidade de crescimento) e bioquímicos (nitrato, aril-

sulfatase e urease)⁵. A identificação química foi realizada através da análise de ácidos micólicos⁷. Paralelamente, foi feita a confirmação do complexo *M. tuberculosis* através da técnica de PCR segundo Eisenach et al.⁹.

Em linhas gerais, para a análise de ácidos micólicos, uma a seis alçadas de bactérias foram emulsionadas em dois mililitros de metoxietano com KOH a 40%, e a suspensão foi aquecida a 110°C por duas horas. Após a extração em 10 mL de éter etílico, os ácidos micólicos foram submetidos à secagem em banho-maria e metilados com diazometano. Para a realização do cromatograma, pequenas alíquotas dos ácidos micólicos foram depositadas sobre duas placas de sílica gel G60 e desenvolvidas em uma mistura de éter etílico-éter de petróleo (1:9) e outra de diclorometano. As placas foram então reveladas com solução de rodamina B a 0,01%.

Para identificação do *M. tuberculosis* usando a técnica de PCR empregou-se os *primers* INS1 (5' - CGT GAG GGC ATC GAG GTG GC - 3') e INS2 (5' - GCG TAG GCG TCG GTG ACA AA - 3') que originam um produto de amplificação de 245 pares de bases⁹. Para um volume final de 25 µL, foram empregadas as seguintes concentrações de reagentes: 14,97 µL de água milli Q, 2,5 µL de tampão para PCR 10X, 4,0 µL da mistura de dNTPs, 0,6 µL de cada *primer* na concentração de 5 µM, 1,0 µL de DNA proveniente de lisado bacteriano e 0,125 µL da enzima Taq polimerase. A amplificação ocorreu nas seguintes condições: 95°C por 5 min, 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 58°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos e 72°C por 10 minutos. Após a eletroforese em gel de agarose a 1 %, o produto amplificado foi visualizado com o auxílio de transiluminador ultravioleta e foto-documentado.

Prova de sensibilidade as drogas

Os perfis de sensibilidade a rifampicina (R) e isoniazida (I) foram determinados através do Método das Proporções⁵. Para tal, 200 µL das suspensões bacilares (10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵ e 10⁻⁶) foram semeadas nos meios LJ com e sem antibióticos. Os tubos foram incubados a 37°C por 28 dias e determinou-se a porcentagem de resistência através da contagem de colônias nos tubos controles e nos tubos testes.

RESULTADOS

As micobactérias foram isoladas de cinco (6,8 %) pacientes, sendo identificados quatro *M. tuberculosis* e um *M. chelonae*. De todos os pacientes foi possível obter escarros com piócitos, entretanto, nenhum deles apresentou exame radiológico e quadro clínico compatíveis com tuberculose (emagrecimento, tosse por mais de três semanas ou hemoptise).

Em relação ao diagnóstico laboratorial, a baciloscopia foi positiva para um único paciente (do qual isolou-se *M. chelonae*) e cinco pacientes apresentaram cultura positiva. Espécimes clínicos de quatro pacientes com baciloscopia negativa forneceram culturas positivas para *M. tuberculosis*. A

única micobactéria atípica encontrada, *M. chelonae*, foi isolada de uma mulher. Apesar da ocorrência de maior número de pacientes femininos na instituição, todos os casos de tuberculose observados foram em pacientes do sexo masculino. Na identificação, os cinco isolados apresentaram resultados compatíveis com as cepas de referência *M. tuberculosis* H37Rv e *M. chelonae* NCTC 946. As quatro amostras de *M. tuberculosis* não cresceram em meio LJ com ácido *p*-nitrobenzóico (PNB), sendo inibidos por esta droga. A cepa de *M. chelonae* cresceu amplamente no referido meio, em menos de 12 dias de incubação. Na prova para determinar o tempo de crescimento, foram verificadas colônias visíveis de *M. chelonae* em sete dias e colônias de *M. tuberculosis* em 36 dias. Todos os isolados de *M. tuberculosis* foram positivos para as provas bioquímicas de nitrato-redutase e urease, sendo negativos para arilsulfatase. O isolado de *M. chelonae* apresentou resultado negativo para as duas primeiras provas, no entanto foi positivo para a prova da arilsulfatase.

Em relação à análise de ácidos micólicos, todos os isolados apresentaram perfis de ácidos micólicos compatíveis com os das cepas de referência sendo I, III e IV para *M. tuberculosis* e I e II para *M. chelonae*.

Os resultados da reação de PCR são apresentados na Figura 1. O produto de amplificação de 245 pb, compatível com a cepa de referência *M. tuberculosis* H₃₇Rv, foi verificado em todos os quatro isolados (amostras 1, 2, 3 e 5) identificados como *M. tuberculosis*. Uma amplificação tênue correspondente a fragmentos de 245 pb também foi detectada na amostra previamente identificada como de *M. chelonae* através da metodologia clássica e análise de ácidos micólicos. Com relação à sensibilidade das amostras, todas as micobactérias do

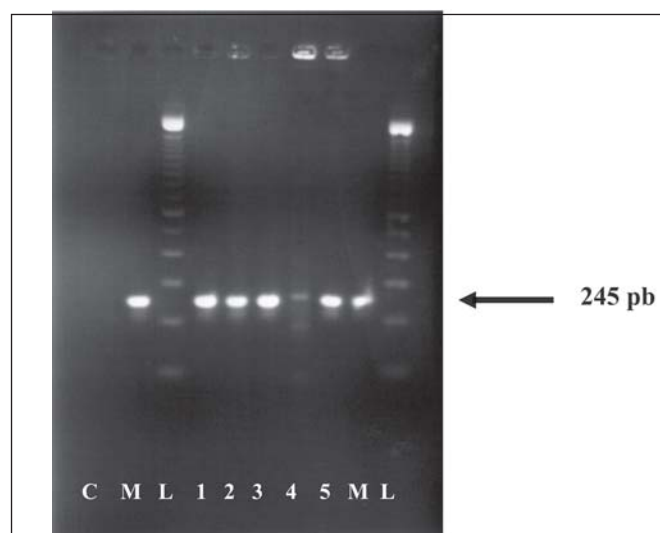


Figura 1. Eletroforese em gel de agarose para *M. tuberculosis*. Linhas: C - controle negativo; M - *M. tuberculosis* H37Rv; L - marcador de peso molecular 100 pb; 1, 2, 3 e 5 - *M. tuberculosis* proveniente de pacientes, 4 - *M. chelonae* de paciente.

complexo *M. tuberculosis* foram sensíveis às drogas testadas (I e R), enquanto que o isolado de *M. chelonae* foi resistente.

DISCUSSÃO

De acordo com as fichas de notificações, dos 74 internos no Hospital Psiquiátrico, 51,3% eram do sexo feminino e 47,2% do sexo masculino, não sendo constatado nenhum caso de uso de drogas ilícitas ou de imunodebilidade por AIDS.

Nossos estudos mostraram que a espécie de micobactéria mais freqüente no hospital psiquiátrico foi o *M. tuberculosis*, com quatro isolados, sendo encontrada apenas uma cepa de *M. chelonae*. O isolamento de *M. chelonae* ocorreu em uma paciente que fazia tratamento para alcoolismo.

A incidência de isolamento de MOTT tem aumentado no mundo desde o advento da epidemia da AIDS^{10,11}, sendo detectadas também como agentes oportunistas em indivíduos não aidéticos³. Neste sentido, uma micobacteriose poderia ser justificável devido à dependência ao álcool. Entretanto em culturas realizadas posteriormente, *M. chelonae* não foi mais isolada desta paciente.

Com relação ao *M. tuberculosis*, esta foi recuperada por cultivo a partir dos espécimes clínicos negativos na microscopia, indicando maior sensibilidade da primeira técnica em relação a baciloscopia. Devido à complexidade do manuseio do espécime clínico e da necessidade de centrifugação, o cultivo tradicional é realizado apenas nos laboratórios de referência⁵. Por outro lado, o método proposto por Kudoh e Kudoh⁶, que é de fácil execução, possibilitou, neste trabalho, a detecção de casos paucibacilares. O cultivo possibilitou ainda a identificação das espécies através de métodos bioquímicos, análise de ácidos micólicos e PCR, assim como permitiu a avaliação do perfil de sensibilidade às drogas das cepas isoladas.

Em relação à identificação das espécies, os resultados mostraram que as metodologias foram compatíveis entre si. As quatro amostras que foram identificadas como sendo de *M. tuberculosis* pelas provas bioquímicas obtiveram resultados confirmatórios com a análise de ácidos micólicos (I, III e IV) e a amplificação do fragmento de 245 pb (Figura 1) pela técnica molecular. A cepa de *M. chelonae* identificada bioquimicamente apresentou, na análise de ácidos micólicos, perfil I e II, compatível com a cepa de referência. Entretanto na técnica de PCR, a amostra de *M. chelonae* apresentou um fragmento vestigial de 245 pb (Figura 1), sugerindo uma cultura mista de *M. chelonae* e *M. tuberculosis*. Tanaka et al.⁸ também detectaram, através de técnicas moleculares, uma cultura mista de *M. chelonae* e *M. tuberculosis* em um paciente de 71 anos que foi a óbito. A técnica de PCR, por se tratar de um método mais sensível e específico, detectou a presença de *M. tuberculosis* mesmo na cultura onde o crescimento de *M. chelonae* sobrepujou o crescimento desta micobactéria, uma vez que *M. chelonae* apresenta crescimento rápido. Alguns autores constataram que a técnica de PCR detecta um fentograma de DNA purificado, equivalente à quinta parte

do microrganismo. Entretanto, em espécimes clínicos como o escarro o limite de detecção tem variado de 100 a 1000 bactérias¹².

Em relação à transmissão intra-hospitalar da tuberculose, segundo Reicheler et al.¹³, fatores como escarros com baciloscopia positiva e radiografia de tuberculose cavitária são importantes na infecciosidade dos pacientes. Neste sentido, os resultados de baciloscopia negativa entre os pacientes com tuberculose, associado ao resultado do exame radiológico indicativo de um pulmão normal, sugere que os pacientes, no momento estudado, tinham pouco comprometimento pulmonar e que eram paucibacilares, com pouca probabilidade de serem transmissores. Entretanto, foi verificado, no hospital, alta incidência de doentes (04 em 74 internos) enquanto a incidência no Brasil é de 47,2/100.000 habitantes¹⁴ e na cidade de Rio Verde de 26/100.000 habitantes¹⁵. Este fato poderia ser justificado pelas condições especiais a que estão sujeitos os pacientes, como a existência de doenças associadas e o confinamento¹⁶, que podem predispor a reativação de uma tuberculose latente e sua disseminação. Por outro lado, dados de literatura mostram que bacilos resistentes a drogas múltiplas (TBMR) freqüentemente estão envolvidos em surtos de tuberculose institucional¹⁷. Taxas elevadas de TBMR primária foram identificadas em hospitais de Buenos Aires (25%), Rio de Janeiro (7%) e Florianópolis (20%)¹⁸. Neste sentido, a sensibilidade das cepas de *M. tuberculosis* aos antimicrobianos testados (I e R) sugere a sua origem na reativação de uma infecção latente, e não em infecção exógena recente.

Os resultados deste estudo indicam a necessidade de um monitoramento constante dos pacientes internos, possibilitando a detecção precoce dos casos de tuberculose e o tratamento adequado, evitando assim a transmissão da doença. Neste sentido, o cultivo das amostras de escarro através da técnica de Kudoh e Kudoh é de grande interesse pela simplicidade da metodologia, sendo o seu emprego recomendável nas instituições com características semelhantes à instituição estudada.

Como fruto deste estudo, os pacientes com tuberculose (inclusive a paciente da qual se isolou *M. chelonae*) foram tratados e todos os demais submetidos ao teste tuberculínico. A direção da instituição também estuda a possibilidade de realizar teste tuberculínico na admissão dos pacientes.

REFERÊNCIAS

1. Raviglione MC, Snider DE, Kochi A. Global Epidemiology of Tuberculosis: Morbidity and Mortality of a Worldwide Epidemic. *JAMA* 1995; 273: 220-6.
2. CNPq. Cientistas declaram guerra à tuberculose. CNPq notícias [citado em 2 out 2002]. Disponível em: URL: <http://www.cnpq.br/noticias/130902.htm>
3. Rasolofo-Razanamparany V, Menard D, Ratsitorahina M, Auregan G, Gicquel B, Chanteau S. Transmission of tuberculosis in the prison of Antananarivo (Madagascar), *Res Microbiol* 2000, 151: 785-95.
4. Lourenço MCS, Silva MO, Fonseca LS Multidrug-resistant tuberculosis among inmates in Rio de Janeiro, Brazil. *J Microbiol* 2000, 31: 17-9.

5. Brasil. Manual de Bacteriologia da Tuberculose. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde; 2nd ed., 1994.
6. Kudoh S, Kudoh M. A simple technique for culturing tubercle bacilli. *Bull WHO* 1974, 52: 71-82.
7. Leite CQF, Souza CWO, Leite SRA. Identification of mycobacteria by thin layer chromatographic analysis of mycolic acids and conventional biochemical method: four years of experience. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1998, 93: 801-5.
8. Tanaka II, Anno IS, Leite SRA, Cooksey RC, Leite CQF. Comparison of a multiplex-PCR with mycolic acids analysis and conventional methods for identification of mycobacteria. *Microbiol Immunol* 2003, 47: 307-12.
9. Eisenach KD. PCR amplification of a repetitive DNA sequence specific for *M. tuberculosis*. *J Clin Dis* 1990, 161: 977-81.
10. Shih JY, Hsueh PR, Lee LN, Wang HC, Yang PC, Kuo SH et al. Non tuberculous mycobacteria isolates, clinical significance and disease spectrum. *J Formos Med Assoc* 1997, 96: 621-7.
11. Tartaglione T. Treatment of nontuberculous mycobacterial infections: role of clarithromycin and azithromycin. *Clin Ther* 1997, 19: 626-38.
12. Jonas V, Alden MJ, Curry JI, Kamisango K, Knott CA, Lankford R et al. Detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* directly from sputum sediments by amplification of rRNA. *J Clin Microbiol* 1993, 31: 2410-16.
13. Reichler MR, Reves R, Bur S, Thompson V, Mangura BT, Ford J et al. Evaluation of investigations conducted to detect and prevent transmission of tuberculosis. *JAMA* 2002, 27: 992-5.
14. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Divisão de Vigilância Epidemiológica. Coordenação de Doenças Endêmicas. Área Técnica de Pneumologia Sanitária. Documento de indicadores e metas para o Programa Nacional de Controle da Tuberculose, 2004.
15. Secretaria Municipal de Saúde de Rio Verde, GO. Informações fornecidas referentes ao ano de 2002.
16. Aydin IO, Ulusain A. Depression, anxiety comorbidity, and disability in tuberculosis and chronic obstructive pulmonary disease patients: applicability of GHQ-12. *Gen Hosp Psychiatry* 2001, 23: 77-83.
17. Rabahi MF, Almeida Neto JC. Tuberculose: Risco ocupacional em profissionais de saúde. *Rev Patol Trop* 2001, 30: 1-8.
18. Kritski AL, Marques MJ, Rabahi MF, Vieira MA, Werneck-Barroso E, Carvalho CE et al. Transmission of tuberculosis to close contacts of patients with multidrug-resistant tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1996, 153: 331-5.

Cultura primária de fibrocondrócitos de menisco de coelho

Primary culture of fibrocondrocytes from rabbit knee joint meniscus.

RIALA6/1050

Cristina Adelaide FIGUEIREDO^{1*}; Paulo Pinto JOAZEIRO²

* Endereço par correspondência: ¹Instituto Adolfo Lutz, Seção de Vírus Produtores de Exantema, Av. Dr. Arnaldo, 355, Cep- 02067-060, São Paulo/ SP, email: figueiredocris@uol.com.br

² Universidade Estadual de Campinas - Instituto de Biologia, Departamento de Histologia e Embriologia

Recebido: 26/07/2005 – Aceito para publicação: 29/12/2005

RESUMO

Estudos envolvendo a obtenção de fibrocondrócitos em cultura no Brasil são escassos. Este trabalho descreve a cultura primária de fibrocondrócitos de menisco cultivados em alta densidade com algumas modificações nos métodos de extração já descritos na literatura, com o intuito de obter um maior número de células viáveis para cultivo celular. Foram utilizados meniscos de coelhos New Zealand com 120 dias. Os meniscos foram cortados e tratados com 2mg/ml de colagenase diluída em meio DMEM (meio de Eagle modificado por Dulbeccos) contendo 10% de SFB sob agitação durante três horas a 37°C. Os fibrocondrócitos foram cultivados em alta densidade ($1 \times 10^5/\text{cm}^2$) em frascos de cultura T25 em meio DMEM suplementado com 10% de SFB. As células atingiram a confluência celular após o 15º dia de cultivo e sintetizaram sua matrix extracelular evidenciada pela coloração com azul de toluidina. A curva de crescimento mostrou que os fibrocondrócitos duplicaram 2,5 vezes. A cinética de incorporação de sulfato radioativo nos glicosaminoglicanos sintetizados pelos fibrocondrócitos “in vitro” foi constante. Os fibrocondrócitos cultivados em alta densidade celular apresentaram aspectos ultra-estruturais semelhante as células “in vivo”.

Palavra-Chave. cultura de célula, menisco, fibrocondrócitos.

ABSTRACT

The present study describes a primary culture of meniscus fibrocartilaginous tissue cultivated in high density technique. Cells were isolated from menisci fibrocartilaginous from 120 days-old New Zealand white rabbits. Menisci were finely minced, and treated with 2mg/mL collagenase in DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) containing 10% FCS (fetal calf serum) in a shaker for three hours at 37°C. Fibrochondrocyte cells were seeded at high density (1×10^5 cells / cm^2) in T25 flasks containing DMEM supplemented with 10% FCS. Nearly 80% of cells attached to the flask, and after culturing for five days the cells were uniformly displayed as an elongated, fibroblastic-like morphology. The cells showed confluence after approximately 15 days of culture, and produced sufficient extracellular matrix which could be evidenced by the appearance of toluidine blue metachromasia. No morphological changes were observed in fibrochondrocytes during cells growing. The fibrochondrocytes cells growth rate increased 2.5 fold, and attained to the stationary phase. During seven days, the newly glycosaminoglycans synthesizing cells, the rate of total synthesis of glycosaminoglycan was high, and it remained stable after monolayer cells confluency. Ultrastructural morphology of monolayer cells after culturing for eight days was identical to typical fibrochondrocyte *in vivo*.

Key Words. cell culture, menisci, fibrochondrocytes.

INTRODUÇÃO

A fibrocartilagem é um tecido conjuntivo avascular, formado por poucas células e uma grande quantidade de matriz extracelular constituída principalmente de colágeno e proteoglicanos¹. As células que formam a fibrocartilagem são chamadas de fibrocondrócitos, similares aos condrócitos das cartilagens hialina e elástica^{2,3}. Os fibrocondrócitos da região superficial (próximos à superfície articular) são ovais ou ligeiramente fusiformes, com poucos processos celulares, enquanto que os fibrocondrócitos da região central (imersos na matriz extracelular) são mais ovais, situados dentro de lacunas, com intensos processos celulares liberados dentro da zona pericelular amorfa. Ambos contêm retículo endoplasmático e complexo de Golgi bem desenvolvidos, enquanto as mitocôndrias são ocasionalmente observadas, sugerindo assim que, como os condrócitos das cartilagens articulares, os fibrocondrócitos obtêm sua energia por glicólise anaeróbica. A sua matriz extracelular é formada principalmente de colágeno e proteoglicanos. O colágeno do tipo I é o principal colágeno encontrado na matriz⁴ e em menor quantidade dos outros tipos de colágeno (III, V, VI) Além do colágeno, existe uma grande quantidade de proteoglicanos do tipo agregam e decorim^{5,6,7}.

Os fibrocondrócitos mantêm o equilíbrio da matriz extracelular através dos mecanismos de síntese e degradação. Quando o equilíbrio é alterado, a função da fibrocartilagem é prejudicada possibilitando o surgimento de osteoartrite precoce⁸. Com o desenvolvimento das técnicas da cultura de tecidos de mamíferos abriu-se uma nova fronteira nas pesquisas científicas. Em 1994, Brittberg et al.⁹ utilizando cultura de células de cartilagem realizou o primeiro transplante autólogo de células em pacientes com lesão na cartilagem. Na última década com o desenvolvimento de técnicas de engenharia de tecidos onde a regeneração de órgãos e tecidos vivos é realizada pela dissociação e cultivo de tecido do próprio paciente sobre suportes biológicos ou sintéticos, conhecidos como *scaffolds* (suportes, matrizes tridimensionais, arcabouços, estruturas, etc), para posteriormente serem reinseridos no paciente. Recentemente, resultados promissores foram obtidos utilizando o colágeno e polímeros como matriz extracelular para o crescimento de fibrocondrócitos^{10,11}.

Entretanto, para a realização dos estudos acima citados é necessário a obtenção de fibrocondrócitos viáveis para o crescimento celular “in vitro” e que sintetizem uma matriz extracelular semelhante aos fibrocondrócitos “in vivo”. Os fibrocondrócitos têm sido cultivados utilizando-se duas metodologias: a descrita por Green et al.¹² que utiliza a digestão enzimática em série: hialuronidase, tripsina, colagenase e a descrita por Benya et al.¹³ na qual a digestão enzimática é realizada usando uma solução de colagenase em baixa concentração de CO₂, que resulta na obtenção de 90% de condrócitos do tecido articular. O objetivo deste estudo foi a

padronização de uma metodologia para a obtenção de fibrocondrócitos em cultura e sua utilização para diversos estudos metabólicos e terapêuticos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Meniscos de Coelhos

Os meniscos (lateral e medial) de três coelhos New Zealand com 120 dias foram removidos da articulação dos joelhos. Após a remoção, os meniscos foram lavados em solução salina tamponada, pH 7,5 com gentamicina (40mg/L) para completa remoção do líquido sinovial. O tecido foi cuidadosamente dissecado para assegurar a completa remoção de toda a sinóvia e tecido capsular aderente. A remoção dos meniscos foi realizada dentro das normas preconizadas pelo Comitê de Ética de Manipulação de Animais.

Cultura Primária

Meniscos de coelhos foram colocados em meio mínimo de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Gibco, USA) em solução salina balanceada de Earle, livre de sulfato, suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (SFB) (Gibco, USA).

Os meniscos foram picados em pedaços de aproximadamente (0,3x0,3) cm e lavados duas vezes no próprio meio de cultura contendo 40mg/ml de gentamicina (Sigma, USA). Os fragmentos do tecido foram incubados a 37°C sob agitação numa solução de 2mg/mL de colagenase tipo I (Gibco, USA) em meio DMEM com 10% SFB pH 7,2 durante três horas. Após este período, o meio contendo os fibrocondrócitos liberados da matriz foram colhidos e ao tecido não digerido foi adicionada nova solução de colagenase. A amostra foi incubada novamente a 37°C durante três horas. Os fibrocondrócitos, obtidos de cada extração, foram filtrados em tela de nylon para remover os fragmentos não dissolvidos e mantidos em banho de gelo até a completa extração da amostra.

As células foram lavadas duas vezes em meio de cultura a 1000 x g por 10 minutos. Após a lavagem, as células foram gentilmente ressuspendidas em DMEM com 10% de SFB sem antibiótico e semeadas em garrafas de cultura de células de 25cm² (Costar, Falcon) na concentração de 1x10⁵ células/cm². A viabilidade celular foi quantificada com o corante vital azul de tripan (0,5% em solução fisiológica) em câmara hemocitométrica. As culturas celulares foram mantidas a 37° C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. O crescimento celular foi acompanhado por observação diária em microscópio invertido.

Estudos Morfológicos

Microscopia de Fase

As culturas de células em semi-confluência e confluentes foram examinadas e fotografadas rotineiramente no microscópio Zeiss em microscopia de fase utilizando um filtro verde como contraste.

Microscopia de Luz

As células da Cultura de fibrocondrócitos após o 3º e o 15º dia de cultivo foram coradas pelo corante azul de toluidina. Antes da fixação, o meio de cultura foi cuidadosamente retirado e as células foram fixadas em 2,0% de glutaraldeído em tampão fosfato de sódio e potássio 0,15M, pH 7,2. A fixação ocorreu por 10 minutos, à temperatura ambiente. A seguir o material foi lavado em uma solução de lavagem contendo tampão fosfato de sódio e potássio 0,15M, pH 7,2 durante 15 minutos e corados durante 10 minutos numa solução aquosa de azul de toluidina 0,5%, pH 3,5. Em seguida, o corante foi removido. As culturas foram lavadas em solução de lavagem e imediatamente observadas e fotografadas em microscópio Olympus no aumento de 100X.

Análise ultra-estrutural

As culturas celulares em monocamada e cultivadas durante 07 dias em alta densidade (10^5 células/cm²) foram fixadas para a análise ultra-estrutural. Antes da fixação, o meio de cultura foi cuidadosamente retirado da monocamada celular e as células foram lavadas em uma solução contendo tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,2 e sacarose 0,2M durante 5 minutos à temperatura ambiente. Após a lavagem, as células foram fixadas em solução de glutaraldeído 2,0% com ou sem ácido tânico 0,1% em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,2, durante 1 hora, a 4°C. A seguir o material foi lavado novamente na solução de cacodilato e pós-fixado em tetróxido de ósmio a 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,2, durante 1 hora a 4°C. As culturas fixadas foram novamente lavadas em solução de cacodilato e novamente incubadas durante 20 minutos em acetato de uranila 1% em etanol 70% a 4°C. Em seguida, o material foi desidratado em gradiente de etanol (do etanol 30% ao etanol absoluto) durante 1 hora e pré-embebido em misturas de etanol e resina (araldite) durante três horas. Após este período, o material foi embebido em resina pura durante 24 horas em estufa a 58°C.

Os blocos foram cortados em ultramicrótomo LKB (Modelo 8800 Ultratome III), para obtenção dos cortes semifinos (1µm). Para a localização da região a ser estudada e micrografada, os cortes semifinos foram corados a quente (aproximadamente 70°C) em solução de azul de toluidina 1% em carbonato de sódio 0,23M para posterior análise em microscópio óptico.

Cortes ultrafinos, prateados, com aproximadamente 70nm de espessura, foram obtidos no mesmo ultramicrótomo e contrastados por acetato de uranila a 2,0%, durante 30 minutos¹⁵ e por citrato de chumbo a 0,5% durante 10 minutos¹⁶.

Os cortes ultrafinos foram estudados e fotografados em um microscópio eletrônico Philips (modelo EM 400).

Curva de Crescimento

A curva de crescimento foi realizada segundo Freshney¹⁴. A cultura primária de fibrocondrócitos na primeira passagem foram cultivadas em tubos de cultura celular numa concentração

de 1×10^5 células/mL em meio DMEM contendo 10% de SFB. Após 24 horas de cultivo, o meio foi descartado e as células foram tratadas com uma solução de ATV (tripsina 0,2% e versene 0,02%). Após o descolamento das células do tubo de cultura foi feita a contagem de células utilizando-se a câmara hemocitométrica. As contagens celulares foram realizadas durante o período de sete dias consecutivos, com intervalos de 24 horas. Diariamente foram contados três tubos, sendo calculado a média diária que foi utilizada para a elaboração da curva de crescimento.

Cálculo da eficiência de plaqueamento em substrato sólido

A metodologia realizada para o cálculo da eficiência de plaqueamento em substrato sólido foi descrita por Freshney¹⁴. Culturas primárias cultivadas em garrafas de cultura de células de 25cm² (Costar, Falcon) na concentração de 1×10^5 células/cm² após a confluência celular foram tratadas com uma solução de ATV (tripsina 0,2% e versene 0,02%). Após o descolamento das células da garrafa de cultura foi feita a contagem de células utilizando-se a câmara hemocitométrica. As células foram semeadas em duplicata, em placas de Petri de 20cm² de área, nas concentrações de 25, 50, 125 e 250 células/cm² e incubadas a 37°C em ambiente de 5% de CO₂ por oito dias em meio de cultura DMEM contendo 10% SFB e meio condicionado, que foi obtido do crescimento de células diploides de pulmão de feto humano filtrado em membranas de 0,45µM (Millipore Ind.Com) diluído 1:1 em DMEM contendo 10% SFB. Após este período, o meio de cultura foi desprezado e as células foram fixadas e coradas com solução de violeta de genciana. A eficiência do plaqueamento foi calculada, como razão percentual, entre o número de colônias de diâmetro maior ou igual a 50µm e as concentrações das células plaqueadas. O cálculo foi realizado utilizando a seguinte fórmula:

$$E(\%) = \frac{n^\circ \text{ de colônias formadas}}{n^\circ \text{ de células plaqueadas}} \times 100$$

Cinética da síntese de glicosaminoglicanos

Os fibrocondrócitos foram cultivados em placas de Petri numa concentração de 1×10^5 células/cm² em meio DMEM com 10% soro fetal bovino. Após a confluência celular o meio de cultura foi descartado e as células foram realimentadas com meio de cultura contendo 50 µCi (³⁵S)/mL e incubadas por 24 horas a 37°C em 5% de CO₂. A síntese dos glicosaminoglicanos foi medida através da taxa de incorporação de sulfato nas moléculas sintetizadas e agregadas nos compartimentos intracelulares dos fibrocondrócito em triplicata. O meio de cultura foi descartado e a taxa de incorporação de ³⁵S nos glicosaminoglicanos foi monitorada no período compreendido entre o primeiro e o sétimo dia após o pulso. A quantidade de radioatividade foi feita pela contagem em líquido de cintilação : tolueno contendo 0,5% PPO (2,5 difeniloxazol, Merck, Alemanha) no espectrometro Beckman LS100.

Congelamento Celular

Visando futuros estudos, as culturas primárias foram preservadas em nitrogênio líquido a -196°C . O meio de preservação foi constituído de DMEM com 10% de SFB, contendo 10% de dimetil-sulfóxido (DMSO, Sigma, USA).

RESULTADOS

Os fibrocondrócitos recém isolados a partir de meniscos do joelho de coelhos, pela extração enzimática utilizando colagenase diluída em meio DMEM com 10% SFB, apresentaram formas arredondadas em suspensão. O teste de viabilidade destas células, realizado com base na incorporação do corante vital azul de tripan, mostrou que 90-95% das células permaneceram viáveis após o tratamento enzimático, às lavagens e filtrações necessárias ao estabelecimento de uma cultura primária. Os resultados mostram que o método de extração foi eficiente e que 90% destas células aderiram ao frasco de cultura formando colônias celulares.

O cultivo primário dos fibrocondrócitos foi iniciado com a incubação de 10^5 células/cm² suspensas em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, isento de antibióticos e mantidas a 37°C em atmosfera úmida em 5% de CO₂. Após 24 horas de cultivo, foram verificadas colônias de células arredondadas que aderiam ao frasco de cultura. A adesão celular monitorada por microscopia óptica, mostrou que após 48 horas, a partir das colônias de células arredondadas, houve o surgimento de células elipsóides e estreladas que aderiam ao frasco de cultura. Na Figura 1A observa-se as células cultivadas após 5 dias de cultivo e coradas com azul de toluidina. As colônias celulares exibem aspecto elíptico e estrelado, coradas fortemente pelo azul de toluidina e com grande quantidade de prolongamentos celulares, intercomunicando células e núcleos. As células atingiram a confluência após o 15^o dia, o que resultou no aparecimento de uma monocamada celular (Figura 1B). As culturas primárias foram subcultivadas somente até a quarta passagem, indicando a sua limitada capacidade de crescimento "in vitro".

A curva de crescimento celular da cultura de fibrocondrócitos mostrou que as células atingiram a máxima densidade populacional no 4^o dia de cultivo e uma densidade populacional 2,5 vezes comparada ao início do estudo (Figura 2).

A influência da densidade populacional na multiplicação dos fibrocondrócitos foi analisada através da capacidade destas células em formar colônias (plaqueamento), quando cultivadas em baixa densidade. Observou-se a formação de colônias apenas nas densidades de 125 e 250 células/cm². As células apresentaram uma eficiência de plaqueamento nas densidades de 125 e 250 ao redor de 1 e 3%, respectivamente, quando cultivadas em meio DMEM; e 5% quando cultivadas usando a combinação dos meios DMEM e condicionado (v/v). Os índices obtidos mostram que a multiplicação dos fibrocondrócitos "in vitro" é sensível à variação da sua densidade populacional.

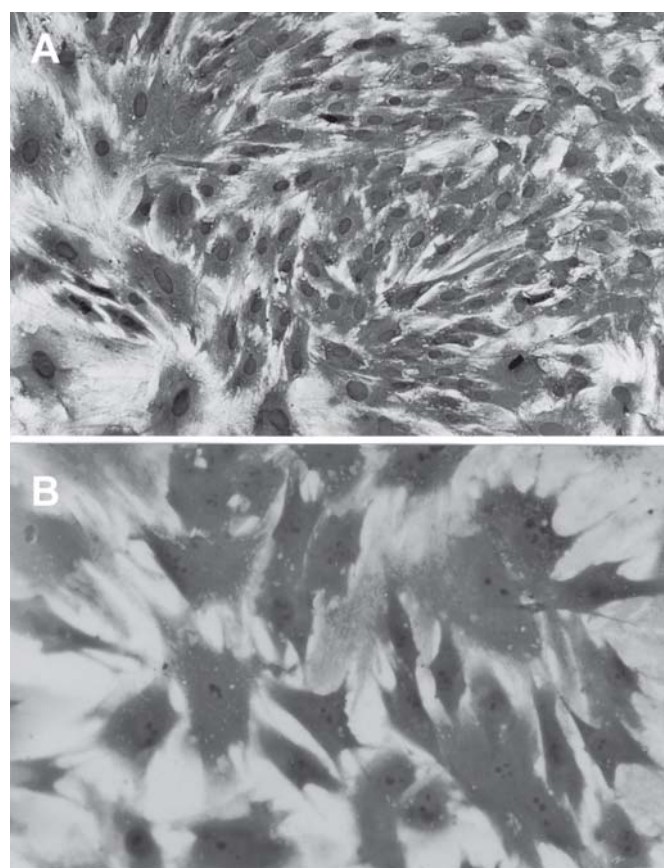


Figura 1. Fotomicrografias de cultura de fibrocondrócitos no 5^o dia de cultivo. As células foram fixadas em glutaraldeído 2% e coradas com azul de toluidina. **A.** visão panorâmica da cultura mostrando o aspecto da monocamada antes de atingir a confluência. Aumento 100x. **B.** notar o aspecto elipsóide das células, a morfologia nuclear, o número de nucléolos e os grandes prolongamentos citoplasmáticos. Aumento: 200x.

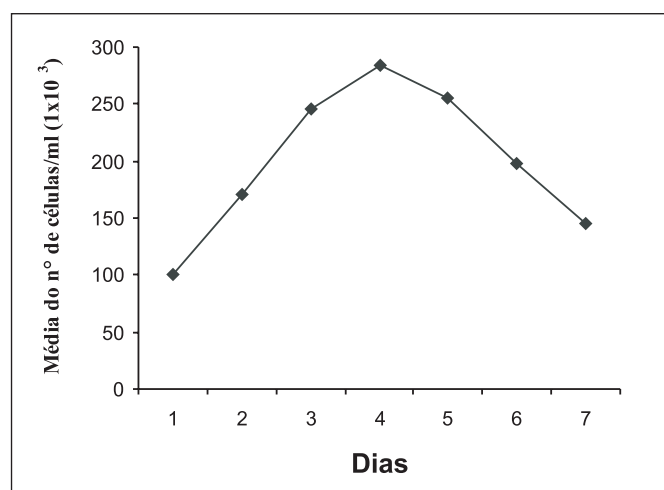


Figura 2. Curva de crescimento da cultura de fibrocondrócitos durante 7 dias consecutivos. A contagem de células foi realizada utilizando-se a câmara hemocitométrica.

A cinética de incorporação de sulfato radioativo ($\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$) nos glicosaminoglicanos sintetizados pelos fibrocondrócitos “in vitro” pode ser observada na Figura 3. As células em cultura sintetizaram os glicosaminoglicanos com uma velocidade constante desde o primeiro até o quarto dia, quando foi atingido um valor máximo (40 CPM/1000 células) permanecendo estável até o sétimo dia. Os fibrocondrócitos cultivados em alta densidade celular (5×10^5 células/cm²) apresentaram aspectos ultra-estruturais semelhante aos das células “in vivo”. A análise das micrografias eletrônicas dos cortes ultra-finos, obtidos de colônias celulares cultivadas durante 8 dias, mostrou que os fibrocondrócitos apresentavam perfil elíptico, com um grande núcleo de formato regular, com a maior parte da sua cromatina desespiralizada, sendo a heterocromatina escassa, observada sempre acolada à superfície interna do envoltório nuclear. O citoplasma mostrou-se volumoso com uma grande quantidade de vesículas e lisosomas secundários dispersos pelo citoplasma; como também cisternas do retículo endoplasmático granular com material intracisternal e um complexo de Golgi bastante desenvolvido. As mitocôndrias aparecem em número maior e várias gotículas de lipídeos podem ser observadas (Figuras 4). As culturas primárias continuaram apresentando alta viabilidade celular após o congelamento em meio de preservação constituído pelo meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e 10% de dimetil-sulfóxido, à temperatura do nitrogênio líquido (-196°C). Frascos contendo 1×10^6 células/mL foram descongeladas e sua viabilidade celular realizada com base na incorporação do corante vital azul de tripan mostrou 90% de viabilidade celular.

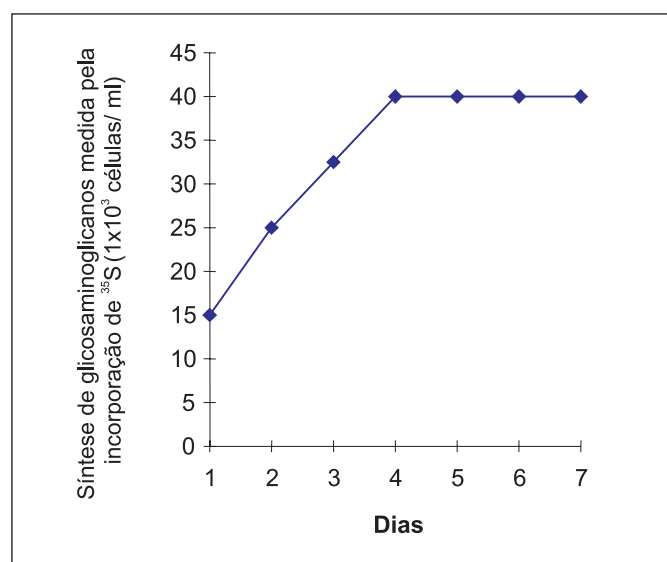


Figura 3. Cinética de incorporação de $\text{Na}_2^{35}\text{SO}_4$ radioativo na síntese de glicosaminoglicanos pelos fibrocondrócitos “in vitro”. Média da triplicata (cpm/10³ células/mL) dos valores obtidos em triplicata da contagem em líquido de cintilação.

DISCUSSÃO

O método de extração aqui utilizado foi eficiente para obtenção de células com 90% de viabilidade celular semelhante aos resultados obtidos por Green et al.¹² e Benya e Shafer². A grande dificuldade na obtenção de células dos tecidos cartilagosos é a quantidade de células utilizadas no cultivo, pois existe uma relação direta entre a síntese das proteínas sintetizadas para compor a matriz extracelular, a densidade celular e o fenótipo celular. Benya e Shaffer², mostrou que as células cultivadas em baixa densidade celular apresentam fenótipo fibroblástico com alteração na síntese dos tipos de colágeno e proteoglicanos. Esta modulação pode ser prevenida quando as células são cultivadas em alta densidade celular (10^5 células/cm²). Além disso, a utilização

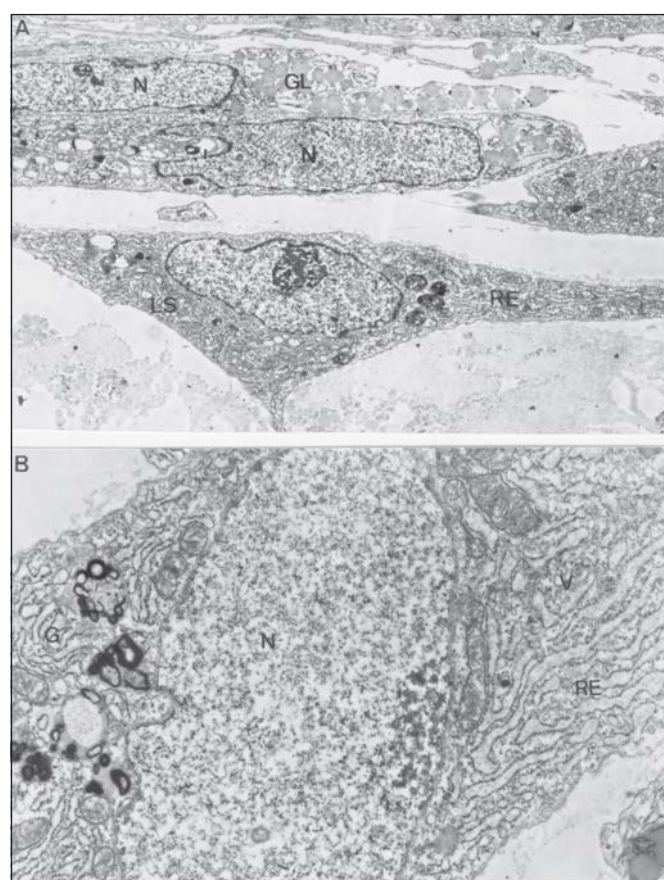


Figura 4. Micrografias eletrônicas dos fibrocondrócitos cultivados num período de 08 dias. **A:** conjunto de fibrocondrócitos próximos uns aos outros. As células apresentam perfil elíptico ou alongado, com núcleos (N) de cromatina frouxa. No citoplasma, observam-se o abundante retículo endoplasmático granular (RE), lisosomas secundários (LS) e gotículas de lipídeos (GL). Aumento: 7.500x. Em **B:** micrografia de maior aumento, do fibrocondrócito onde pode-se notar o núcleo (N), o aspecto filamentososo da eucromatina e no citoplasma, detalhes do sistema de vesículas (V) associado ao transporte entre o retículo endoplasmático granular (RE) e o complexo de Golgi (G). Aumento: 16.500x.

de somente uma enzima para a obtenção da cultura primária de fibrocondrócitos e o tempo de extração, permite que o custo seja menor em relação as metodologias descritas na literatura. Em relação à morfologia celular, os fibrocondrócitos cultivados em alta densidade (1×10^5 células/mL) apresentaram a forma arredondada, aderiram a garrafa de cultura e formaram colônias de células com aspecto elíptico e estrelado, com prolongamentos celulares. Estes resultados também foram obtidos por Graverand et al.¹⁷ e Isoda et al.¹⁸ que mostraram que os fibrocondrócitos “in vivo” e “in vitro” apresentam prolongamentos celulares que facilitam a comunicação celular e assim, a secreção dos fatores de crescimento “in vitro” que ligam-se à matriz extracelular via proteoglicanos, influenciando o meio ambiente celular. Durante o período de 15 dias no qual os fibrocondrócitos foram mantidos em cultura, no que diz respeito à transformação celular “in vitro”, as características morfológicas e as do crescimento celular da cultura não sofreram qualquer alteração. Após a confluência celular, as células perderam sua motilidade e passaram a apresentar contato de inibição celular que é observado em culturas primárias. Essas alterações, descritas por Abercombie e Heaysman¹⁹ demonstram que as células controlam a sua densidade populacional de maneira análoga ao sistema de retroalimentação negativo, sugerindo que os fatores de crescimento e as proteínas da matriz extracelular mantêm o seu microambiente celular, regulando a sua proliferação e a diferenciação celular.

Vários estudos têm demonstrado que os fibrocondrócitos são capazes de proliferar e sintetizar suas proteínas de matriz extracelular (proteoglicanos e colágeno), entretanto a taxa de células aderidas ao substrato celular e a sua taxa crescimento é extremamente importante para a obtenção da cultura primária de fibrocondrócitos^{18,20,21,22,23}. Os nossos dados em relação ao cálculo da eficiência de plaqueamento mostram uma dependência dos fibrocondrócitos em relação à sua densidade celular também observado por Webber et al.^{22,23}. Em relação a diferença entre a taxa de eficiência de plaqueamento utilizando o meio DMEM e o meio condicionado, indica que alguns fatores presentes neste meio condicionado estimularam o metabolismo dos fibrocondrócitos em cultura. Recentemente, Pangborn et al.¹¹ mostraram que o fator de crescimento TGF-beta (1) pode ser usado para aumentar a proliferação celular e a síntese de matriz extracelular de fibrocondrócitos cultivados em monocamada e em polímero. A síntese dos glicosaminoglicanos foi utilizada como um marcador da atividade fibrocondrogênica através da incorporação de sulfato nas moléculas de glicosaminoglicanos sintetizados “in vitro”. Os nossos resultados de síntese de glicosaminoglicanos dos fibrocondrócitos estão de acordo com os resultados obtidos por outros autores^{6,7,22,23}.

A nível ultra-estrutural os fibrocondrócitos apresentaram as mesmas características da fibrocartilagem “in vivo”. As células possuem forma oval ou ligeiramente fusiforme, núcleo grande, gotículas de lipídeos no citoplasma, células dentro de lacunas e vários prolongamentos celulares além da presença de matriz territorial e interterritorial como descrito por Ghadially e Ghosh^{2,3}.

Nossos resultados mostraram que utilizando este método de cultura primária os fibrocondrócitos foram capazes de proliferar e sintetizar as suas proteínas de matriz extracelular mantendo o seu fenótipo e, portanto possibilitando o uso em reparação tecidual.

REFERÊNCIAS

1. Junqueira LCU, Carneiro J. Tecido cartilaginoso In: *Histologia Básica*. Ed Guanabara Koogan, 1995. p.94 -100
2. Ghadially FN, Thomas I, Yong N, Lalond J.J. Ultrastructure of rabbit semilunar cartilage. *J Anat* 1978; 125: 499-517.
3. Ghosh P, Taylor KF. The knee joint meniscus. *Clin Orthop Rel Res* 1987; 224: 52-63.
4. Mcdevitt CA, Webber RJ. The ultrasctruture and biochemistry of meniscal cartilage. *Clin Orthop* 1990; 252: 8-18.
5. Eyre DR, Wu JJ. Collagen of fibrocartilage: A distinctive molecular phenotype in bovine meniscus. *Febbs Lett* 1983; 158: 265-70.
6. Roughley PJ, McNicol K, Santer V, Buckwalter J. The presence of a cartilage like proteoglycan in the adult human meniscus. *Biochem J* 1981; 197: 77-83.
7. Roughley PJ, White RJ. The dermatan sulfate proteoglycans of the adult human meniscus. *J Orthop Res* 1992; 10: 631-7.
8. Calvo E, Palácios I, Delgado E, Ruiz-Cabello J, Hernandez P, Sanchez-Pernaute O, Egido J, Herrero-Beaumont. High resolution MRI detects cartilage swelling at the early stages of experimental osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartil* 2001; 9: 463-72.
9. Brittberg M, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med* 1994; 331: 889-95.
10. Mueller SM, Shortkroff S, Schneider TO, Breinan HA, Yannas IV, Spector M. Meniscus cells seeded in type I and type II collagen – GAG matrices in vitro. *Biomaterials* 1999; 20: 701-09.
11. Pangborn CA, Syriacos AA. Growth factors and fibrochondrocytes in scaffolds. *Journal Orthopaedic Research* 2005; 23: 1184-90.
12. Green PWB, Fox RR, Sokolof F. Spontaneous degenerative spinal disease in the laboratory rabbit. *J Orthop Res* 1984; 2: 161-8.
13. Benya PD, Shaffer JK. Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell* 1982; 30: 215-24.
14. Freshney RI. *Culture of animal cells: a manual of basic techniques*. 4^o ed. New York, 2000
15. Watson ML. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. *J Byphys Biochem Cytol* 1958; 4: 475-8.
16. Reynolds ES. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy 1963; 17: 208-12.
17. Graverand MP, Ou Y, Schield-Yee T, Barclay L, Hard D, Natsume T, Rattner JB. The cells of the rabbit meniscus their arrangement, interrelationship, morphological variations and cytoarchitecture. *J Anat* 2001; 198: 525-35.
18. Isoda K, Saito S. In vitro and in vivo fibrochondrocytes growth behaviour in fibrin gel na immunohistochemical study in the rabbit. *Am J Knee Surg* 1998; 11: 209-16.
19. Abercombie M, Heaysman JEM. Observation on the social behaviour of cells in tissue culture. II monolayering of fibroblasts. *Exp Cell Res* 1981; 6: 293-306.
20. Webber RJ. In vitro culture of meniscal tissue. *Clin Orthop Relat Res* 1990; 252: 114-20.
21. Webber RJ, Hough AJ JR. Serum-free culture of rabbit meniscal fibrochondrocytes proliferative response *J Orthop Res* 1988; 6(1):13-8.
22. Webber RJ, Hough AJ JR. Cell culture of rabbit meniscal fibrochondrocytes II. Sulfated proteoglycan synthesis. 1988; *Biochimie* 70: 193-204.
23. Webber RJ, Zitaglio T, Hough AJ JR. In vitro cell proliferation and proteoglycan synthesis of rabbit meniscal fibrochondrocytes as a function of age and sex. *Arthritis and Rheumatism* 1986; 29: 1010-6.

Estudo retrospectivo dos exames de líquido cefalorraquidiano (LCR) de pacientes com suspeita clínica de neurotoxoplasmose, portadores do HIV

Retrospective study on cerebrospinal fluid (CSF) evaluation in HIV positive-patients with clinically suspected neurotoxoplasmosis

RIALA6/1051

Cristiane H. COSTA*; Raquel de M. ROSA; Aparecida Helena de S. GOMES; Marilyn Castelani A. ARAÚJO; Cássia M. RAFAEL

* Endereço para correspondência: Instituto Adolfo Lutz, Laboratório Regional de Sorocaba/SP, Rua: Julio Hanser,49, CEP: 18031-490, Bairro Vergueiro. Email: asgomes.sor@terra.com.br

Recebido: 23/05/2005 – Aceito para publicação: 01/12/2005

RESUMO

A toxoplasmose é uma infecção comum, observada tanto em indivíduos sadios como em pacientes imunocomprometidos. Este trabalho tem como objetivo apresentar um estudo retrospectivo dos resultados obtidos de exames realizados no Instituto Adolfo Lutz, laboratório Regional de Sorocaba, no período de 01/01/2003 a 29/11/2004 em amostras de líquido cefalorraquidiano (LCR) de pacientes HIV positivos com sintomatologia clínica e suspeita de neurotoxoplasmose, atendidos no Conjunto Hospitalar de Sorocaba (CHS). Selecionamos 109 pacientes HIV positivos, onde foi realizada a técnica de Imunofluorescência Indireta (IFI) para pesquisa de anticorpos IgG contra *Toxoplasma gondii* no LCR. Dos 109 pacientes HIV positivos selecionados, 46 foram do sexo feminino e 63 do sexo masculino, cuja faixa etária de maior frequência foi de 21 a 40 anos. Nenhuma paciente era gestante. Dos 46 pacientes femininos, 48% apresentaram anticorpos anti-*Toxoplasma gondii* e dos 63 pacientes masculinos, 36,5% apresentaram positividade. O número de exames realizados que apresentaram resultados positivos no ano de 2003 foi de 61,5%, e em 2004 até o período estudado, foi de 38,5%. Os resultados mostram que é importante o acompanhamento de todos os pacientes portadores de HIV, mesmo os que apresentam ausência de anticorpos no LCR, pois podem ter a atividade baixa do toxoplasma no SNC, sem manifestação clínica aparente. Assim, seria oportuno realizar o segmento destes pacientes a fim de determinar sinais de reativação da doença no futuro.

Palavras-Chave. neurotoxoplasmose, LCR, HIV, *Toxoplasma gondii*, anticorpos, pacientes.

ABSTRACT

Toxoplasmosis is a protozoan disease of man caused by *Toxoplasma gondii*. In immunocompromised patients, toxoplasmosis is characterized by lesions of the central nervous system, which may lead to blindness and brain defects. The objective of the present investigation was to perform a retrospective study on the frequency of positive testing for anti-*Toxoplasma gondii* antibodies in cerebrospinal fluid (CSF) samples, which were carried out during the period from January/2003 to November/2004. At Instituto Adolfo Lutz- Regional Laboratory of Sorocaba. The analysed CSF samples were collected from HIV positive-patients with clinically suspected neurotoxoplasmosis who referred to the Conjunto Hospitalar of Sorocaba. Detection of anti-*T.gondii* IgG antibodies in CSF samples was performed by means of indirect immunofluorescence assay (IFA). Of 109 CSF samples selected for the study, 46 were from female subjects, and 63 from male patients, and the major age group was from 21 to 40 years old. No woman was pregnant. Among 46 female individual, 48% presented positive CSF samples for *Toxoplasma gondii* antibodies (TGABs), and 36,5% of positivity were detected in CSF samples from male patients. In 2003 and 2004 (until the studied date), the rates of positive TGABs in CSF samples were 61,5% and 38,5% respectively. In spite of the absence of TGABs in CSF samples from some HIV positive-patients without apparent clinical symptoms of neurotoxoplasmosis, the follow-up of these individuals will be relevant, as they might present low activity of toxoplasmosis in central nervous system. Thus, it will be opportune to perform a prospective follow-up study, including these patients, in order to evaluate the eventual occurrence of neurotoxoplasmosis reactivation in the near future.

Key Words. neurotoxoplasmosis; CSF; HIV; *Toxoplasma gondii*; antibodies, patients.

INTRODUÇÃO

A toxoplasmose é uma infecção comum que ocorre, tanto em indivíduos sadios como em pacientes imunocomprometidos. *Toxoplasma gondii* (*T. gondii*) é um protozoário que pode ser encontrado em 3 formas: taquizoítos, encontrado na corrente sanguínea, leite ou líquido durante a fase aguda da infecção, fase em que esta forma se multiplica; bradizoítos, encontrado como cistos em vários tecidos, musculatura e retina do hospedeiro, geralmente na fase crônica e sob a forma de oocistos, encontrado no hospedeiro definitivo, como forma infectante. Os felinos, em particular os gatos, são os hospedeiros definitivos onde o parasita se reproduz resultando na forma infectante do *T. gondii* (oocistos). O ser humano é um hospedeiro acidental, capaz de controlar a infecção em condições de imunidade normal¹.

Nos pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) a neurotoxoplasmose permanece como uma das principais causas de encefalite focal. A doença resulta, na maioria dos casos, de reativação da infecção latente, com prevalência de 3% a 50%, de acordo com a área geográfica e, se não reconhecida e tratada precocemente pode levar à demência subcortical, caracterizada por um declínio cognitivo, motor e comportamental ao longo de semanas ou meses^{2,3}.

Seu diagnóstico é de crucial importância, pois o tratamento é altamente efetivo quando o paciente é tratado em tempo⁴.

O diagnóstico clínico mesmo sendo difícil por ser um processo sistêmico, com baixa parasitemia, sintomas e sinais clínicos genéricos, o que leva a confusão com outras afecções de etiologia diversas é de crucial importância, pois o tratamento é altamente efetivo quando o paciente é tratado em tempo⁴. O diagnóstico laboratorial é muito importante para sua confirmação. Atualmente, a metodologia mais utilizada para o diagnóstico da toxoplasmose consiste na pesquisa de anticorpos das classes IgM e IgG, a fim de estabelecer a fase da infecção. Trabalhos recentes têm mostrado que a detecção de IgA, parece ser um indicador melhor de fase aguda do que a pesquisa de IgM⁵.

De acordo com Chimelli et al.⁶ a toxoplasmose encefálica de ocorrência rara antes do aparecimento da AIDS, é considerada a lesão mais freqüente do Sistema Nervoso Central (SNC) nestes pacientes. A maioria dos casos é atribuída a reativação dos cistos de *T. gondii* no SNC⁷.

Segundo Borges e Figueiredo (2003)⁸, a presença de anticorpos no líquido de pacientes HIV positivos deve ser interpretada com cautela, pois pode significar apenas a transferência passiva deste anticorpo do soro para o SNC, levando a interpretações errôneas e incorretas.

Este trabalho tem como objetivo um estudo retrospectivo dos resultados de exames realizados no Instituto Adolfo Lutz, laboratório Regional de Sorocaba no período de 01/01/2003 a 29/11/2004 em amostras de LCR de pacientes HIV positivos com suspeita de neurotoxoplasmose, atendidos no Conjunto Hospitalar de Sorocaba (CHS), a fim de realizar um levantamento destas informações e alertar as autoridades competentes e o

corpo clínico, visando um maior cuidado com os pacientes soropositivos e com AIDS que apresentam a neurotoxoplasmose como doença associada.

MATERIAL E MÉTODOS

Após aprovação do Comitê de Ética do Instituto Adolfo Lutz (CEPIAL) foi realizado o levantamento de dados, utilizando os livros registros dos exames realizados na seção de Biologia Médica – Setor de Microimunoparasitologia, do Instituto Adolfo Lutz, laboratório Regional de Sorocaba. Foram selecionados 130 registros de LCR, dos quais 109 eram de pacientes portadores do vírus HIV que, por apresentarem sintomatologia clínica sugestiva de neurotoxoplasmose, haviam realizado o exame. Estes pacientes foram atendidos na clínica de moléstias infecciosas do Conjunto Hospitalar de Sorocaba (MI-CHS).

A pesquisa de anticorpos IgG anti-*T. gondii* foi realizada pela técnica de Imunofluorescência Indireta (IFI) empregando um Kit comercial. O Kit é composto por um antígeno liofilizado que é preparado de acordo com a bula e distribuído nas lâminas próprias para IFI e por um conjugado constituído por uma globulina de carneiro anti-IgG humana marcada pelo isotiocianato de fluoresceína. As diluições foram realizadas em títulos de 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, sendo que a diluição 1:2 foi desconsiderada por ser inespecífica. Para a análise estatística foram utilizadas as variáveis idade, sexo e título de anticorpos empregando o teste t-student, com nível de probabilidade de erro 5%.

RESULTADOS

Foram selecionados 109 ($p \leq 0,01$) pacientes portadores de HIV com suspeita clínica de neurotoxoplasmose, sendo 46 do sexo feminino e 63 do sexo masculino, cuja faixa etária de maior freqüência foi de 21 a 40 anos (Tabela 1).

Dos 46 pacientes do sexo feminino, nenhum era gestante. A importância de se estabelecer o diagnóstico da mulher em idade reprodutiva reside na possibilidade de se tomarem medidas terapêuticas adequadas a fim de minimizar a transmissão vertical mãe-feto⁹.

De acordo com o resultado da Imunofluorescência Indireta (IFI), dos 46 pacientes do sexo feminino, 52,1% não apresentaram positividade para anticorpos IgG anti-*T. gondii*; 48% apresentaram anticorpos no LCR sendo que observou-se uma maior freqüência com o título de 1/64, equivalendo a 19,5% em relação aos outros valores. Dos 63 pacientes do sexo masculino, verificou-se que 63,4% não apresentaram anticorpos IgG contra *T. gondii* no LCR e 36,5% apresentaram anticorpos reativos (Figura 1). Pacientes com pesquisa de anticorpos negativos devem ter o monitoramento dos exames se apresentarem manifestações neurológicas.

A freqüência de casos de neurotoxoplasmose no ano de 2003 foi de 61,4%, sendo que destes 31,3% apresentaram

positividade para anticorpos no LCR, e no ano de 2004 até o período de 29 de novembro foi de 38,5% com 54,7% de positividade. Observando que apesar da diminuição do número de casos registrados no ano de 2004, a positividade de anticorpos anti-*T. gondii* foi maior que no ano de 2003, de acordo com a Tabela 2.

DISCUSSÃO

A neurotoxoplasmose ainda é a principal causa de lesão expansiva no SNC de pacientes com AIDS. A apresentação clínica, a análise do LCR e os resultados dos estudos radiológicos podem se confundir com os de outras patologias que acometem o SNC destes pacientes. O diagnóstico definitivo de tais lesões pode requerer técnicas sofisticadas ou procedimentos invasivos não isentos de risco².

A detecção de anticorpos no LCR deve ser interpretada com cuidado, pois a presença destes no SNC pode simplesmente indicar a transferência de anticorpos passivos do soro para o SNC. Além disso, a presença dos anticorpos específicos com títulos elevados no LCR, paralelamente a presença de níveis elevados de anticorpos no soro, indicam em algumas situações, um valor diagnóstico importante, incluindo a neurotoxoplasmose^{10,11,12,13}.

Neste estudo, nenhum paciente HIV positivo do sexo feminino era gestante, entretanto as infecções maternas adquiridas antes, ou durante a gestação, causadas pelo *T. gondii* e/ou HIV, representam risco para a criança, que pode, infectar-se por via vertical, dependendo do agente envolvido. A prevenção da toxoplasmose congênita deve ser feita na gravidez, quando é possível o tratamento e a redução de danos à criança¹⁴.

Neste estudo, de 109 pacientes descritos, apenas 59% apresentaram ausência de anticorpos anti-*T. gondii* no LCR e esta ausência de anticorpos IgG anti-*T. gondii* do LCR afastou o diagnóstico de neurotoxoplasmose, sendo um importante marcador para o diagnóstico diferencial da toxoplasmose cerebral em pacientes portadores de HIV⁸.

A presença do anticorpo anti-*T. gondii* no LCR foi demonstrada em algumas doenças neurológicas, contudo em algumas situações, uma alteração da barreira hematoencefálica é responsável pela passagem de proteínas do sangue para o LCR, levando ao aparecimento passivo dos anticorpos neste ambiente^{10,11,15,16,17}.

Nós não podemos justificar estes resultados baseados somente na imunossupressão destes pacientes, porque não houve comparação dos resultados entre os níveis de anticorpos no soro e aqueles obtidos no LCR. Um outro fato a ser considerado é a presença ou a ausência da produção dos anticorpos detectados pela análise de LCR, com isso, podem depender da proximidade da lesão nas meninges. Nós observamos que 41% dos pacientes apresentaram evidência na produção de anticorpos anti-*T. gondii* no SNC. A maioria

das lesões expansivas do SNC detectado nos pacientes portadores de HIV são atribuídas a reativação da infecção latente do *T. gondii* causada pela imunossupressão do HIV induzido.

Tabela 1. Quantificação dos pacientes HIV positivos dos sexos masculino e feminino com suspeita clínica de neurotoxoplasmose segundo a faixa etária e atendidos no CHS no período de 01/01/2003 a 29/11/2004.

| Idade | Feminino (%) | Masculino (%) |
|----------------|--------------|---------------|
| 0 – 20 | 7 (15,3) | 3 (4,8) |
| 21 – 40 | 29 (63) | 38 (60,3) |
| 41 – 60 | 9 (19,6) | 19 (30,1) |
| ≥60 | 1 (2,1) | 0 (0) |
| Sem Informação | 0 (0) | 3 (4,8) |
| Total | 46 (100) | 63 (100) |

Tabela 2. Número de exames realizados em pacientes atendidos no CHS no período de 01/01/2003 a 29/11/2004 com suspeita clínica de neurotoxoplasmose.

| Ano | Número de casos (%) |
|-------|---------------------|
| 2003 | 67 (61,5) |
| 2004 | 42 (38,5) |
| Total | 109 (100) |

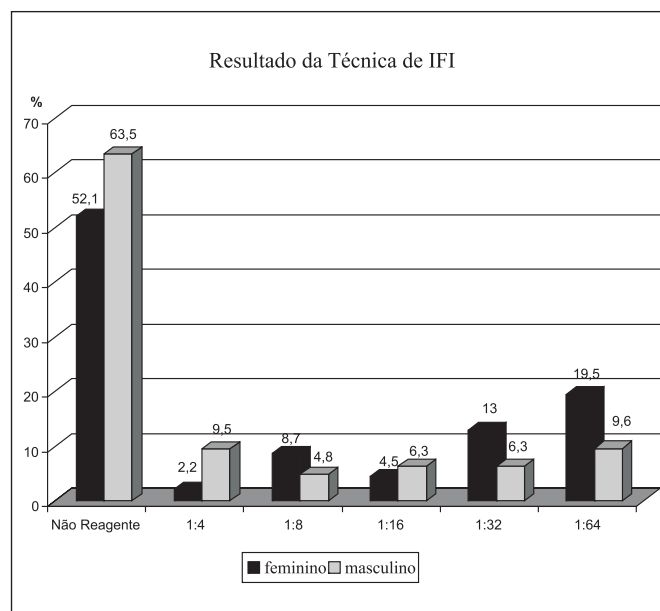


Figura 1. Título de anticorpos anti-*T. gondii* obtidos pelo método de imunofluorescência indireta (IFI) ao avaliar o LCR de pacientes HIV positivos dos sexos masculino e feminino atendidos na clínica de MI-CHS.

CONCLUSÃO

Os resultados apresentados corroboram em demonstrar que a Toxoplasmose pode apresentar-se de forma mais grave e invasiva nos pacientes acometidos pelo vírus HIV afetando com maior frequência o SNC (neurotoxoplasmose). Pacientes do sexo masculino apresentaram uma incidência maior desta associação e os pacientes do sexo feminino uma menor frequência. A faixa etária observada foi de 21 e 40 anos.

É importante o acompanhamento dos pacientes portadores do vírus HIV e com AIDS, mesmo aqueles com ausência de anticorpos no soro e no LCR, pois podem ter baixa atividade do *T. gondii*, sem manifestação clínica aparente. Assim, seria oportuno avaliar o seguimento destes pacientes a fim de determinar sinais de reativação da doença no futuro.

REFERÊNCIAS

1. Sotolongo PC, Carrillo PC, Carrillo CC. Toxoplasmosis cerebral durante la infección por el virus de inmunodeficiencia humana. *Rev Cub Med* 2002; 41: 297-302.
2. Borges AS, Figueiredo JFC. Detecção de imunoglobulinas IgG, IgM e IgA anti-*Toxoplasma gondii* no soro, líquido e saliva de pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida e neurotoxoplasmose. *Arq Neuro-Psiquiatr* 2004; 62: 1033-7.
3. Camara VD, Tavares W, Ribeiro M, Dumas M. Manifestações Neurológicas de toxoplasmose em Aids. *DST – J Bras Doenças Sex Transm* 2003; 15: 46-50.
4. Alvarado F. Toxoplasmosis em el inmunosuprimido. *Rev salud pública* 2002; 4: 31-4.
5. Uchôa CMA, Duarte R, Silva VL, Alexandre GMC, Ferreira HG, Amendoeira MRR. Padronização de ensaio imunoenzimático para pesquisa de anticorpos das classes IgM e IgG anti-*Toxoplasma gondii* e comparação com a técnica de imunofluorescência indireta. *Rev Soc Bras Med Trop* 1999; 32: 661-9.
6. Chimelli L, Rosemberg S, Hahn MD, Lopes MB, Netto MB. Pathology of the central nervous system in patients infected with the human immunodeficiency virus (HIV): a report of 252 autopsy cases from Brazil. *Neuropath appl Neurobiol* 1992; 18: 478-88.
7. Dannemann NB, Mccutchan JA, Israelski D *et al.* Treatment of toxoplasmic encephalitis in patients with AIDS. A randomized trial comparing pyrimethamine plus clindamycin to pyrimethamine plus sulfadiazine. The California Collaborative Treatment Group. *Ann Intern Med* 1992; 116: 33-43.
8. Borges AS, Figueiredo JFC. Avaliação da síntese intratecal de anticorpos IgG anti-*Toxoplasma gondii* para o diagnóstico da neurotoxoplasmose em pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida. *Rev Soc Bras Med Trop* 2004; 37: 480-4.
9. Veloso VG, Grinsztejn B. Primeira Consulta do Paciente Infectado pelo HIV, Fórum Científico HIV e AIDS. [cited 2005 Feb 19]. Available from: URL: http://www.hiv.org.br/internas_materia.asp?cod_secao=atualiza&cod_materia=325].
10. Porter SB, Sande MA. Toxoplasmosis of the central nervous system in the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med* 1992; 327: 1643-8.
11. Ruskin J, Remington JS. Toxoplasmosis in the compromised host. *Ann Intern Med* 1976; 84: 193-9.
12. Wanke C, Tuazon CV, Kovacs A, Dona T, Davis D, Barton N, Katz D, Lunde M, Levy C, Conleu FK, Lane HC, Fauci AS, Masur H. *Toxoplasma encephalitis* in patients with acquired immune deficiency syndrome: diagnosis and response to therapy. *Am J Trop Med Hyg* 1987; 36: 509-16.
13. Zangerle R, Allerggerger F, Pohl P, Fritsch P, Dierich MP. High risk of developing toxoplasmic encephalitis in AIDS patients seropositive to *Toxoplasma gondii*. *Med Immunol Microbiol* 1991; 180: 59-66.
14. Neto JO, Meira DA. Soroprevalência de vírus linfotrópico de células T humanas, vírus da imunodeficiência humana, sífilis e toxoplasmose em gestantes de Botucatu, São Paulo, Brasil. Fatores de risco para vírus linfotrópico de células T humanas. *Rev Soc Bras Med Trop* 2004; 37: 28-32.
15. Luft BJ, Brooks RG, Conley FK, McCabe RE, Remington JS. Toxoplasmic encephalitis in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *J Am Med Assoc* 1984; 252: 913-7.
16. Potasman I, Resnick L, Luft BJ, Remington J. Intrathecal production of antibodies against *Toxoplasma gondii* in patients with toxoplasmic encephalitis and the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Ann Intern Med* 1988; 108: 49-51.
17. Wainstein MV, Wolffenbuttel L, Lopes DK, González LG, Ferreira L, Sprinz D, Kronfeld M, Edelweiss MI. Sensibilidade e especificidade do diagnóstico clínico, sorológico e tomográfico da encefalite por *Toxoplasma gondii* na síndrome da imunodeficiência adquirida. *Rev Soc Bras Med Trop* 1993; 26: 71-5.

Digitoxina: superdosagem em medicamento manipulado

Digitoxin: overdose in pharmaceutical compounded preparation

RIALA6/1052

Helena Miyoco YANO¹; Mariangela Tirico AURICCHIO¹

* Endereço para correspondência: Instituto Adolfo Lutz, Av Dr. Arnaldo, 355 CEP. 01246-902 – 5º andar Diretoria de Serviços de Medicamentos, Cerqueira. César, São Paulo

¹ Pesquisadoras do Serviço de Medicamentos do Instituto Adolfo Lutz, Laboratório Central e-mail:heleyano@ial.sp.gov.br
Recebido: 18/11/2005 – Aceito para publicação: 29/12/2005

RESUMO

Este relato de caso aborda medicamento manipulado em farmácia magistral, que apresentou teor da substância ativa Digitoxina de 565% em relação ao declarado em sua rotulagem. A solicitação da análise do medicamento veio acompanhada de informe do médico e da autoridade sanitária, na qual o paciente apresentou quadro de intoxicação grave após uso. Este episódio ilustra a dificuldade da garantia da qualidade em estabelecimento de farmácias magistrais, no processo da manipulação de medicamentos de fármacos com índice terapêutico estreito como neste caso dos digitálicos.

Palavras-Chave. digitoxina; medicamento manipulado; controle de qualidade,

ABSTRACT

The authors report a case on an inaccurate pharmacy compounding of digitoxin compounded preparation, which revealed an amount of 565% of active digitoxin in reference to that concentration stated in the label. The preparation analysis request was sent with a clinical record and sanitary authority notification on severe digitalic intoxication symptoms presented by the patient after taking that medication. The reported episode points up the lack of quality control at compounding pharmacies during dispensing drugs and compounds, with narrow therapeutic indices as digitalis drug preparations.

Key Words. digitoxin; pharmaceutical compounding; quality control.

INTRODUÇÃO

Digitoxina é um heterosídeo cardioativo empregado no tratamento da insuficiência cardíaca, devido a sua potente ação sobre o músculo cardíaco. Os digitálicos foram inicialmente identificados e isolados em espécies dos gêneros *Digitalis*, *Strophantus* e *Urginea*, sendo conhecidos já pelos egípcios e romanos¹.

A estrutura da digitoxina, similarmente a outros heterosídeos cardiotônicos, caracteriza-se pelo núcleo fundamental ciclopentano-perhidrofenantrênico da genina respectiva, em cujo carbono 17 liga-se um grupo lactônico insaturado¹.

Os medicamentos cardiotônicos exercem atividade direta sobre as fibras musculares cardíacas aumentando a força contrátil do coração e exercem ações importantes na excitabilidade, automaticidade, velocidade de condução e períodos refratários do coração^{1,2}.

O índice terapêutico de todos os fármacos cardiotônicos

é aproximadamente o mesmo, e a margem de segurança é pequena, pois a dose terapêutica é apenas 50 a 60% inferior à dose tóxica, além disso a digitoxina apresenta ainda, maior tempo de meia-vida, principalmente se comparada ao tempo de meia-vida da

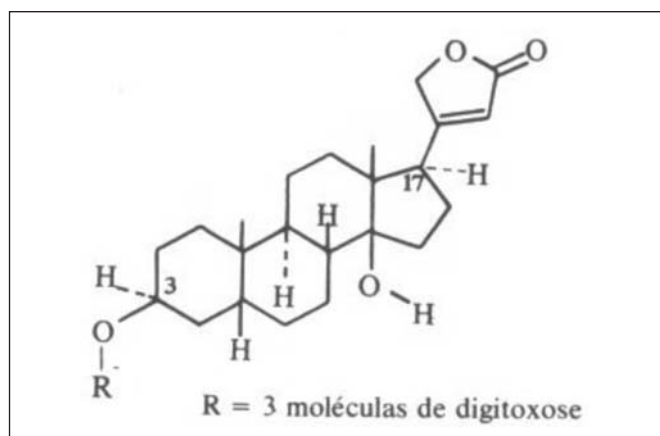


Figura 1. Estrutura química da digitoxina.

digoxina, e por ser eliminada mais lentamente do organismo, resulta em maior duração da toxicidade. Superdoses ou uso prolongado de glicosido digitálico levam à intoxicação por digitálicos. As doses tóxicas reduzem perigosamente o ritmo cardíaco, devido a uma ação direta sobre o centro regulador e o tecido condutor, e o coração acaba por parar em sístole^{1,2}.

É difícil obter-se preparações farmacêuticas à base de digitoxina industrializadas, por isso estes medicamentos têm sido obtidos por manipulação em farmácias magistrais. O objetivo deste relato é apontar a seriedade da consequência do desvio de qualidade de medicamento de faixa terapêutica estreita manipulada em farmácia magistral.

RELATO DO CASO

Em março de 2005, cápsulas manipuladas de digitoxina foram encaminhadas ao Serviço de Medicamentos, pela autoridade sanitária de município do interior do Estado de São Paulo para investigação da possibilidade do teor do fármaco estar acima do declarado na rotulagem. Segundo constou na descrição do caso, o médico informa que seu paciente fazia uso de digitoxina sob prescrição manipulada e, após ingestão do medicamento apresentou sintoma de bradicardia importante, fato que fez com que o médico suspeitasse do medicamento, determinando ao paciente a interrupção imediata do uso, providência que junto com a intervenção médica adequada levou à reversão dos sintomas.

A prescrição para o paciente era Digitoxina na dosagem de 0,05 mg por cápsula, que consiste em dosagem de manutenção de acordo com o preconizado nos protocolos clínicos³.

A amostra foi enviada ao Serviço de Medicamentos, pela Vigilância Sanitária do interior do Estado de São Paulo, e segundo a documentação recebida tratava-se do medicamento que foi utilizado pelo paciente.

No laboratório, a amostra foi submetida à análise empregando-se os métodos oficiais descritos nas farmacopéias. A cromatografia em camada delgada, para avaliação preliminar e verificação, de eventual substância não declarada na formulação, foi realizada segundo descrito na Farmacopéia Européia 3^a. edição, em placa de sílica gel, usando como fase móvel mistura de água + metanol + acetato de etila (7,5:10:75) e a placa foi aspergida com uma mistura alcoólica das soluções de cloramina e ácido tricloroacético, e examinada sob luz ultravioleta. A presença de manchas fluorescentes amarelo-escuro de mesmo Rf e foram obtidas para o padrão de digitoxina e para a amostra.

Para a análise do teor de digitoxina, na amostra foram empregadas duas metodologias oficiais:

a. Metodologia descrita na Farmacopéia Européia 3^a. edição⁴ - que consiste na adição de solução alcalina de picrato de sódio às soluções etanólicas do padrão e das cápsulas da amostra e leituras a 495 nm.

b. Metodologia descrita na United States Pharmacopeia 28^a. edição (USP 28) foi realizada cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), conforme preconizado empregando como fase móvel, água e acetonitrila (55:45), coluna de octadecil silano quimicamente ligados a sílica porosa de 3 – 10 µm de diâmetro e 25 cm, com injeção de 50µL, fluxo de 1 mL/min e detecção em 218 nm. Além das soluções da amostra, soluções dos padrões de digitoxina e digoxina, foram empregadas para confirmação do teste de adequabilidade do sistema, a amostra e os padrões foram submetidos à CLAE com detecção em 218 nm.

Todas as determinações analíticas realizadas na amostra revelaram presença de digitoxina em concentração média muito acima do declarado, constatando-se a superdosagem do fármaco no medicamento.

Não foram observadas outras manchas além da digitoxina neste sistema cromatográfico para a amostra. Os resultados individuais obtidos para cada cápsula analisada foram 0,312 mg; 0,271 mg; 0,280 mg; 0,252 mg; 0,260 mg; 0,275 mg; 0,335 mg; 0,275 mg que correspondem respectivamente a 624, 542, 560, 504, 518, 550, 670, 551 % do declarado na rotulagem. Sendo o valor médio encontrado das oito determinações de 0,283 mg correspondente a 565%.

O cromatograma obtido pela metodologia preconizada pela USP 28 é mostrado a seguir, onde está indicado o padrão de digitoxina em duas concentrações diferentes, e a mesma concentração para o padrão de digoxina, na figura A e B. O padrão de digoxina é empregado para avaliar a eficácia da

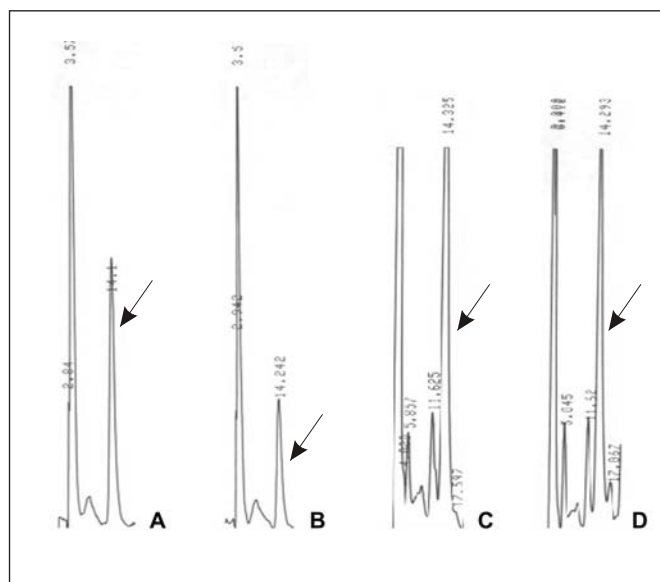


Figura 2. Cromatograma obtido em sistema de CLAE, segundo USP 28⁵, para padrão de digitoxina, com tempo de retenção de 14,2 minutos, nas concentrações de $5,35 \times 10^{-4}$ mg/mL (A) e $2,67 \times 10^{-4}$ mg/mL (B) frente a padrão de digoxina, (tempo de retenção 3,5 minutos). Em C e D cromatograma exibido pela amostra contendo digitoxina, mostrando tempo de retenção de 14,3 minutos.

separação da digitoxina no sistema. Nas figuras **C** e **D** podem ser observadas as concentrações de digitoxina na amostra.

DISCUSSÃO

As análises foram realizadas seguindo-se metodologia oficial descrita em farmacopéias, por serem as de escolha para utilização nos laboratórios oficiais de análise de medicamentos.

Os resultados analíticos de 0,283 mg por cápsula, correspondente a 565 % do teor declarado, confirmaram a hipótese de erro na manipulação, fato responsável pelo quadro de intoxicação digitalica exibido pelo paciente.

Este fármaco empregado em doses de microgramas, alerta para os problemas potenciais da manipulação de fármacos de faixa terapêutica estreita. As doses de manutenção de digitoxina são da ordem de 0,05 mg³, enquanto doses da ordem de 0,6 mg diários são empregadas para obtenção de rápida digitalização, e que podem variar de acordo com as condições do paciente, presença de outras enfermidades e utilização de medicamentos concomitantemente ao uso do digitalico,

Erro da magnitude encontrada neste relato, têm justificado a preocupação da ANVISA e das Vigilâncias Sanitárias em geral, com a qualidade dos medicamentos de baixo índice terapêutico manipulados em farmácias magistrais. Para tanto, está em curso revisão da RDC 33 de 19 de abril de 2000⁶, que trata das Boas Práticas de Manipulação de Medicamentos, apontando-se nesta revisão, o estabelecimento de exigências específicas para a manipulação de fármacos de índice terapêutico estreito, de modo a diminuir os riscos ao paciente.

Além das limitações tecnológicas para promover diluição e homogeneização de pós e uniformidade de dosagem em fármacos com índice terapêutico estreito, que são muito potentes e empregados em quantidades extremamente pequenas, as farmácias magistrais têm dificuldade de realizar os testes de controle de qualidade no produto acabado⁷.

O Serviço de Medicamentos tem recebido amostras de medicamentos manipulados contendo fármacos com índice terapêutico estreito, onde se constata a ocorrência de superdosagem e falta de uniformidade de conteúdo. Os autores esperam que este relato possa ilustrar às autoridades reguladoras, a necessidade de que normas rígidas sejam efetivamente estabelecidas para as farmácias magistrais que desejarem manipular medicamentos de índice terapêutico estreito, de modo a diminuir o risco associado ao seu consumo.

AGRADECIMENTOS

As autoras agradecem à professora Dra. Silvia R. C. J. Santos responsável pelo Laboratório de Farmacologia Terapêutica- Unidade de Pesquisa Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, pela permissão da realização dos ensaios em cromatografia líquida de alta eficiência.

REFERÊNCIAS

1. Korolkovas A, Burckhalter, JH Química farmacêutica Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1982, 783p.
2. Goodman & Gilman's the pharmacological basis of theurapeutics. 10^o ed., editores Hardman, JG e Limbird, LE. New York: McGraw-Hill, 2001, 2148p.
3. Sweetman SC The Martindale the complete drug reference, 34^oed, London: Pharmaceutical Press; 2005, 2756p.
4. European Pharmacopoeia 3^o. ed Strasbourg: Council of Europe, 1997, 1440p.
5. The United States Pharmacopeia 28.ed. Rockville: United States Pharmacopeial Conventions; 2005, 3187p.
6. Brasil, Leis e Decretos - RDC no. 33 de 19 de abril de 2000 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Aprova regulamento técnico que institui as Boas Práticas de Manipulação em Farmácias . DOU de 24 de abril de 2000, no. 78-E, seção 1, p. 27.
7. Boletim Informativo ANVISA - *Manipulação segura*. Brasília: Ministério da Saúde; vol 56 (junho), 2005, p.1 – 11.

Estudo comparativo entre os métodos ELISA e Imunofluorescência Indireta na análise de amostras de sangue de cães provenientes de municípios endêmicos e enzoóticos para leishmaniose visceral americana

Silva, R. M. da. **ELISA and Indirect Immunofluorescence tests: Comparative study in the analyses of blood samples of dogs from endemic and enzootic municipalities for American visceral leishmaniasis** São Paulo, SP, 2005. [Tese de Doutorado —Área: Epidemiologia. Faculdade de Saúde Pública —USP]. Orientador: Prof. Dr. Almério de Castro Gomes.

O presente estudo avaliou 2002 amostras de sangue de cães provenientes de áreas endêmicas (região oeste do Estado de São Paulo) e áreas não endêmicas (município de São Paulo) para leishmaniose visceral americana (LVA), com o objetivo de otimizar os testes sorológicos preconizados pelo Programa de Controle nos inquéritos sorológicos caninos, preconizados no Programa de Controle de LVA e produzidos por Biomanguinhos (Reação de Imunofluorescência Indireta / RIFI-BM e Ensaio Imunoenzimático ELISA / ELISA-BM. Para tal as amostras de sangue foram agrupadas em três bancos de dados: Banco (A) constituído por 97 amostras de sangue assim caracterizadas: 51 amostras com exame parasitológico, sorológico e sintomatologia definida como assintomática (2); oligossintomática (18) e sintomática (31); além destas, 46 amostras de sangue sorologicamente negativas das quais 26 tinham exames parasitológico e sorológico negativos e 20 somente exames sorológico negativos; Banco (B) composto por 174 amostras pareadas de soro e sangue colhidos em papel filtro com diagnóstico clínico, sorológico e parasitológico; Banco (C) constituído de 1831 amostras de sangue colhidas em papel-filtro, provenientes de 3 inquéritos sorológicos caninos realizados nos municípios de Rubiácea (504 amostras), Piacatú (607 amostras) e Luiziana (720 amostras). A RIFI foi realizada quantitativamente nas diluições 1/20, 1/40, 1/80 e 1/160 e a leitura foi expressa por critério de cruzes sendo atribuído porcentagens para cada leitura assim definidos: A) zero (0%), B) + (25%), C) ++ (50%), D) +++ (75%) e E) ++++ (100%). Os resultados dos dois testes RIFI-BM e ELISA-BM foram comparados com os resultados obtidos nos mesmos testes mas utilizando antígeno específico de *L.chagasi* e permitiram concluir que a RIFI com antígeno específico (RIFI-CH) foi capaz de separar todos os verdadeiros negativos dos verdadeiros positivos. Foi possível ainda observar que a eficiência da RIFI-BM variou de 60% a 76%. Quando se compararam os resultados da RIFI-BM com soro e com papel-filtro, na diluição 1/40, como preconiza o PCLVA, observou-se que para a RIFI com papel-filtro o melhor ponto de corte ficou definido como 30%, ou seja acima de 1+ (25%) e para o soro o ponto de corte ficou estabelecido em 45%. Portanto o novo parâmetro para o ponto de corte da RIFI-BM deve ser a diluição 1/40 com leituras de 2+ (50%), ou então 1/80 o que seguramente diminuiria o número de falsos positivos. Da comparação resultados da RIFI-BM com os do ELISA-BM observou-se uma discordância de 23% entre os dois testes, ou seja o ELISA-BM deixou de diagnosticar 23% dos resultados positivos em relação aos observados com a RIFI-BM. O ELISA BioManguinhos forneceu mais resultados falsos positivos com o ponto de corte estabelecido pelo Kit, quando comparado com o novo ponto de corte proposto neste estudo, que foi calculado a partir de controles negativos de eluatos. Quando o ELISA foi avaliado com o novo ponto de corte nas 3 populações caninas dos inquéritos sorológicos (Rubiácea, Piacatú e Luiziana) a soroprevalência diminuiu em quase 50% quando comparado com o mesmo teste com ponto de corte preconizado pelo BioManguinhos. Os resultados do estudo demonstraram a urgência de se implementar iniciativas para o aprimoramento de novos testes sorológicos com antígenos específicos que sejam capazes de identificar e separar as diferentes fases da doença.

Tese disponível na Biblioteca da Faculdade de Saúde Pública da USP
e na Biblioteca do Instituto Adolfo Lutz (São Paulo —SP
E-mail: ritsilva@terra.com.br

Investigação de leveduras no âmbito hospitalar por diferentes técnicas moleculares

Oliveira e Silva, R. B. de. **Investigation of the yeasts from biotic source, in colonization state and infection, and non-biotic sources in the hospitals for different molecular techniques.** Araraquara, SP, 2005. [Tese de Doutorado —Área: Biotecnologia. Instituto de Química —UNESP]. Orientadora: Profa. Dra. Maria José Soares Mendes-Giannini

As leveduras são importantes constituintes da microbiota humana, dentre estas, o gênero *Candida* é predominante. *Candida albicans* é a espécie de levedura mais incriminada em quadros de infecção hospitalar e muita atenção têm sido dada, atualmente, as espécies não-*albicans* e outros gêneros, como *Trichosporon*. O objetivo deste trabalho foi monitorar a distribuição das espécies de leveduras de fontes bióticas (orofaringe, fezes e urina) e abióticas (leito), em estado de colonização dentro de hospitais; otimizar métodos baseados na análise do DNA obtidos por simulação de fontes bióticas (sangue de voluntário saudável contaminado) e abióticas (solução fisiológica contaminada); caracterizar fenotípica e genotipicamente leveduras emergentes e indicar possíveis fontes transmissoras de agentes causadores de Infecção Hospitalar. De um total de 199 pacientes, 85,4% apresentaram colonização e leveduras foram isoladas em 57,9% dos sítios analisados. Em 67 pacientes (39,4%) mais de uma espécie foi encontrada nos sítios/espécimes analisados e em 42 (24,7%) uma única espécie de levedura (maioria representada por *C. albicans*) em dois ou três sítios. Houve predomínio de *Candida* não-*albicans* na colonização dos pacientes (53,43%), seguido de *C. albicans* (39,7%). Os gêneros *Trichosporon* spp e *Picchia* spp representaram 5,1 e 1,8% dos isolados, respectivamente. Entre as não-*albicans* foi prevalente *C. tropicalis* (30,8%), seguido de *C. glabrata* (14,7%), *C. parapsilosis* (7,7%), *C. krusei* (1,9%), *C. guilliermondii* (1,6%) e *C. lusitaniae* (0,7%). A frequência de colonização entre os sítios analisados foi de 37% para orofaringe e 32% e 31% para reto e urina, respectivamente. Nas amostras de urina foi relevante a presença de espécies não-*albicans* (64,1%) e de *Trichosporon asahii* (14%). Não foi observada colonização por *C. dubliniensis* entre os pacientes estudados. Em amostras de leito —fontes abióticas, *C. parapsilosis* foi isolada somente em duas ocasiões. Os métodos moleculares (PCR ITS, CA25SV3 e CA-INT; RFLP e RAPD) foram empregados com sucesso a partir de 70 isolados de *C. albicans* escolhidos. Genótipo A foi representado em 64,2% dos isolados de *C. albicans* e 14,3% e 21,4% classificados como genótipo B e C, respectivamente. Não houve associação entre genótipo e linhagens invasivas nem genótipo e material biológico. Os 13 isolados do Hospital B apresentaram perfil idêntico (genótipo A). A seqüência iniciadora 6 empregada na tipagem de *C. albicans* pelo método de RAPD foi adequada para determinar grupos genéticos relacionados e idênticos entre os isolados dos dois hospitais. Os isolados seqüenciais de *C. albicans* de diferentes sítios e períodos alternados de coleta dos mesmos pacientes apresentaram-se altamente relacionados pertencendo, na grande maioria, ao mesmo clone e/ou grupo. A PCR e a análise pelo método de RAPD permitiram, portanto, a concomitante identificação das espécies e análise da diversidade entre as linhagens. Não foram encontradas diferenças significativas nos padrões de similaridade genética entre as linhagens de *C. tropicalis* a partir dos três sítios analisados por RAPD com duas seqüências iniciadoras. A presença de cepas de *Trichosporon asahii*, resistentes às drogas fluconazol, itraconazol, 5-fluorocitosina e anfotericina B, foi observada e a análise por RAPD sugeriu que estes isolados foram similares nos diferentes sítios colonizados, sugerindo possível fonte cruzada de colonização. O estudo da microbiota dos pacientes mostrou que um único hospedeiro pode ser colonizado com múltiplas espécies ou múltiplos genótipos da mesma espécie no mesmo ou em diferentes sítios do corpo em amostras seqüenciais. Por outro lado, o DNA genômico de leveduras extraído em diferentes concentrações 10^6 , 10^4 e 10^2 , a partir de amostras bióticas e abióticas contaminadas com *C. parapsilosis*, por diferentes metodologias, não apresentaram diferenças quanto à sensibilidade, adotando-se, portanto a técnica mais simples com N-lauryl sarcosina 2%. Assim, neste trabalho foram apresentados resultados inéditos de diferentes métodos de identificação e tipagem em leveduras de colonização e infecção de pacientes de Unidade de Tratamento Intensivo, bem como de padronização de metodologias de extração de DNA para uso em pesquisas de fontes bióticas e abióticas.

Herpesvírus humano tipo 8 (HHV-8): Estudo de segmentos alvo do genoma viral em amostras de sangue, saliva e urina de pacientes infectados pelo HIV/aids, com e sem Sarcoma de Kaposi

Santos-Fortuna, E. de los **Human Herpesvirus type 8 (HHV-8): Study of target segments of the HHV-8 genoma in blood, saliva and urine of HIV/aids infected patients with or without Kaposi's Sarcoma.** São Paulo, 2005, [Tese de Doutorado- Área de Análises Clínicas Faculdade de Ciências Farmacêuticas —USP]. Orientadora: Adele Caterino de Araujo

Desde a descoberta do herpes vírus humano tipo 8 (HHV-8) como o agente etiológico do sarcoma de Kaposi (SK) nas suas diferentes formas clínico-epidemiológicas, vários estudos vêm sendo conduzidos com o intuito de determinar as vias de transmissão desse vírus em populações endêmicas e de risco epidemiológico. Em regiões endêmicas, a transmissão viral foi relacionada à transmissão horizontal de mães para filhos e entre irmãos e a sexual principalmente, nos casos de SK/aids. Com o objetivo de determinar segmentos do genoma viral em fluidos biológicos e conseqüentemente seu potencial infectante foi conduzido o presente trabalho. Foram avaliados quanto à presença de segmentos localizados em posições estratégicas do genoma do HHV-8 em sangue, saliva e urina de 76 pacientes com SK/aids, 19 pacientes com HIV/aids, 4 casos de SK clássico e 11 indivíduos sadios (HIV-soronegativos, sem SK). Foram utilizadas as técnicas de PCR “nested” para as *ORF K1*, *ORF 25*, *ORF 26*, *ORF K8.1* e *ORF 73* em DNA extraído de material de biópsia de lesão de SK (controle positivo), células do sangue periférico, saliva e urina. Os resultados de PCR positivo para o HHV-8 foram analisados quanto a variáveis epidemiológicas, clínicas e laboratoriais. Foram consideradas como variáveis: sexo, cor, origem étnica, tempo de infecção por HIV e de acompanhamento do SK, terapia ARV e para SK, contagem de células CD4+ e sorologia para o HHV-8 (IFI-LANA e IFI-Lítico). Os testes estatísticos de regressão logística e de razão de chances foram usados para detectar as associações estatisticamente significantes entre as PCRs positivas e as variáveis estudadas nos grupos SK/aids e HIV/aids. Os subtipos do HHV-8 foram também determinados pela técnica de PCR-RFLP da *ORF K1* (VR1). Os resultados obtidos mostraram a detecção de DNA/HHV-8 em 80,2% do material de biópsia, 69,7% no sangue, 59,2% na saliva e 21,0% na urina de pacientes com SK/aids. No grupo HIV/aids, a PCR para o HHV-8 resultou positiva em 47,4% dos casos no sangue e em 26,3% na saliva e urina. Já no grupo SK clássico 100% das biópsias e salivas resultaram PCR positiva, 67% do sangue e 33% das urinas. A avaliação sorológica revelou 73,3% de reatividade para IFI-LANA e 85,3% para a IFI-Lítico no grupo SK/aids, enquanto o grupo HIV/aids mostrou reatividade de 15,8% para IFI-LANA e 47,4% para IFI-Lítico; todos os pacientes apresentaram resultados reagentes nas duas sorologias para o HHV-8 no grupo de SK clássico. No grupo controle sadio não houve reatividade na sorologia para o HHV-8, com exceção de um caso, que mostrou ser reagente na IFI-LANA. Foi possível realizar a subtipagem do HHV-8 em amostras de 69 pacientes, sendo detectadas 27 cepas do subtipo A, 13 do subtipo B, 28 do subtipo C e 1 do subtipo E. Após as análises estatísticas foi verificado que as PCRs que identificam as regiões *ORF 26*, *ORF K8.1* e *ORF 73* foram as que apresentaram melhor desempenho na identificação de DNA/HHV-8. Houve associação entre a reatividade de IFI-Lítico e a presença do vírus no sangue periférico, assim como a reatividade para IFI-LANA e a detecção de DNA/HHV-8 na saliva. Houve uma tendência dos subtipos B e C de HHV-8 serem detectados em pacientes com infecção profunda ou disseminada de SK. Estes resultados sugerem que a boca pode ser um sítio de latência da infecção por HHV-8 e confirmam a atuação de sangue, saliva e urina como fluidos potencialmente infectantes.

Disponível no site de biblioteca digital de teses da USP
E-mail: efortuna@ial.sp.gov.br

Medidas dos teores de tocoferóis e estabilidade oxidativa em óleos de fritura

CORSINI, M.da . *STocopherol rates and oxidative stability measurement in frying oils*. São José do Rio Preto - SP. 2004. [Dissertação de Mestrado —Área: Ciência e Tecnologia de Alimentos —Universidade Estadual Paulista —UNESP —São José do Rio Preto] Orientadora: Prof^{ta} Dr^a Neuza Jorge.

É crescente o consumo de óleos e gorduras vegetais e de alimentos pré-fritos congelados, devido à preferência do consumidor por cardápios que aportem facilidade de preparo e manipulação. A fritura é um dos processos mais comuns para o preparo de alimentos, tanto na indústria, como em práticas culinárias domésticas. Ela confere ao alimento características agradáveis de cor, sabor, textura e palatabilidade. Além dessas alterações positivas, podem ocorrer também reações, que modificam as qualidades funcionais e nutricionais podendo chegar a níveis em que não se consegue mais produzir alimentos de qualidade. O presente estudo teve como objetivos analisar os teores de tocoferóis e a estabilidade oxidativa dos óleos de algodão, girassol e palma durante o processo de fritura descontínua de mandioca palito congelada e, ainda, verificar a absorção dos óleos, por meio das determinações da umidade e teor lipídico no produto frito. As frituras foram conduzidas em uma fritadeira elétrica doméstica, onde o óleo foi aquecido, à temperatura de 180°C, por 25 horas, com reposição de óleo fresco. Os resultados obtidos das determinações analíticas foram submetidos às análises de variância, em esquema fatorial, no delineamento inteiramente casualizado, de modo a determinar a influência dos fatores óleos e tempos de fritura sobre as alterações nos óleos e no produto. Os resultados mostraram que as menores alterações ocorreram para o óleo de palma, mais saturado. Para os óleos mais insaturados, verificou-se que, conforme diminuiu o teor de tocoferóis, aumentou a formação dos compostos de degradação e diminuiu a estabilidade oxidativa dos óleos. Apesar das diferenças na composição em ácidos graxos, os óleos estudados não apresentaram, em nenhuma análise, valores acima dos limites recomendados em alguns países para o descarte dos mesmos, independentemente do tempo de aquecimento. Observou-se, também, que, após os processos de fritura, ocorreu diminuição da umidade e aumento do teor lipídico da mandioca, o que representa produto final de elevado teor calórico.

Dissertação disponível na Biblioteca da
UNESP —Câmpus de São José do Rio Preto.
E-mail: maracorsini@yahoo.com.br

Evaluation of the immune response in rabbits immunized intranasally with antigens of *Neisseria meningitidis* B selected for the immunotypes L3,7,9[↑] or 8[↑] with monoclonal antibodies

Ferraz, A. S. **Avaliação da resposta imune em coelhos pela via de imunização nasal com antígenos de *Neisseria meningitidis* B selecionados para os imunotipos L3,7,9[↑] e L8[↑] por meio de anticorpos monoclonais.** São Paulo, SP, 2005 [Dissertação de Mestrado - Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública.2005, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Orientadora: Elizabeth N De Gaspari

Serogroup B *Neisseria meningitidis* is responsible for fulminant septcemia and it is a common cause of pyogenic meningitis. In addition to sporadic outbreaks, large epidemics of serogroup B meningococcal disease occur in many parts of the world. Therefore, the development of a vaccine against *N.meningitidis* serogroup B remains a high priority worldwide. Unlike others serogroups to wich the capsular polysaccharides constitute efficacious vaccines, the serogroup B capsule is poorly immunogenic in humans. In modern vaccine development, strong emphasis has been laid on mucosal immunization system. In particular, the intranasal (i.n) holds promise for a potential induction of protective immune responses, since its able to elicit both local and strong systemic immune response. Intranasal vaccination may therefore be of particular interest against respiratory tract infections, such as those caused by *N.meningitidis*. Lipopolysaccharides(LPS) are complex molecules which are part of outer membrane, of Gram-negative bacteria. The advantage of mucosal immunization is that vaccines containing lipopolysaccharides may be delivered safely via mucosa route without causing adverse side effect seen in parental immunization. The New Zeland white rabbits was employed as model for representative by intranasal immunization in humans with regards to vaccine disposition. Immunizing with native outer membrane vesicles (NOMV) would be an excellent way to prevent meningococcal antigens in their native conformations; however, NOMV(Native Outer Membrane Vesicles) does contain native endotoxin that would cause unwanted local and systemic reactions if given intramuscularly (i.m) administered in humans. Endotoxin is highly pyrogenic, and we found that in rabbits as little of 0,1µg of NOMV caused a pyrogenic response when delivered intravenously. On the other hand, when 400µg of NOMV were inoculated in rabbits intranasally no pyrogenic or other untoward responses. In the present study the immunogenicity of NOMV administered in rabbits divided in groups of rabbits immunized at 7-days intervals. Antigens used included: NOMV of the strains B:4:P1.15.L3,7,9,8, NOMV B:4:P1.15.L3,7,8,9 , B:4:P1.15.L3,7,9,8 selected by colony blot using monoclonal antibody. The antigens preparations were administered to nonanesthetized intranasally rabbits i.n with 1000 µg protein in a 1.0mL volume. Nasal lavage samples were collected prior to initial immunization and 35° days latter by instilling 2.5mL of sterile PBS into nostril. The rabbits head directed in aslight downward direction. The nasal lavage was collected from contralateral nostril into a sterile Petri dish. Kinetics of immune response using different concentration of of NOMV administered i.n was analysed. Rabbits immunized i.n four times with NOMV from the strain B:4:P1.15.L3,7,9,8 had lower bactericidal titers and IgG levels in sera compared with the same strain selected with MAb for the immunotypes L3,7,9 or 8 . Also difference in specificity of produced the IgG antibodies on Immunoblot were detected. Immunoblot showed that on day 35° sera reacted with a wide variety of immunoreactive bands , including class 2, class 4, 50kDa , as well as L8 LOS, NspA and NadA. Marked increases of serum IgG and Nasal lavage (IgA) to *N.menigitidis* was detected by ELISA . These data emphasize the importance of establishing of LPS immunotypes in order to produce a future meningococcal cavvine able of generating long lasting immunity in all population.

Immunogenicity of intranasally administered class 5C protein of *Neisseria meningitidis* in mice

Carmo, A. M. dos S. **Estudo da Imunogenicidade da proteína de Classe 5C de *Neisseria meningitidis* B em camundongos imunizados pela via nasal.** São Paulo, SP, 2005 [Dissertação de Mestrado - Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública. 2005 - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Orientadora: Elizabeth N De Gaspari]

Neisseria meningitidis is a human pathogen for which no fully effective vaccine is available. Meningococcal vaccines currently approved for use in humans are made from purified capsular polysaccharides. Such vaccines are effective against serogroups A and C, although in the United States, a quadrivalent vaccine containing four types of meningococcal serogroups A, C, Y, and W-135 is effective among people over two years of age. Unfortunately, such capsular polysaccharide vaccines present limitations as they have no effect on children

OMP's *N. meningitidis* are designated from class 1 through class 5. However, OMP vaccines are weak antigens in infants. In an effort to establish efficient immunization in infants, we here tested a vaccine consisting of purified class 5C protein from one reference *Neisseria meningitidis* serogroup B and different adjuvants. This study aimed to investigate adjuvants such as *Bordetella pertussis*, cholera toxin and LPS (L8 and L379) to assess the modulation of the immune response against this protein administered by intranasal route to newborn/ young and adult BALB/c mice. IgG, IgM, IgA were evaluated by ELISA and Immunoblotting. As indicator of protective immunity, avidity index and bactericidal serum activity assays were performed. The sera from immunized animals showed IgG and IgM with high and intermediary avidity indexes that showed good correlation with the bactericidal serum activity.

younger than two years and the immune response is short-lived in older children and in adolescents. Development of a vaccine against serogroup B poses an enormous problem due to the similarity between the B capsular polysaccharide structure and a polysialic acid containing glycopeptides that are part of the human brain tissue, raising the possibility of occurrence of autoimmunity. Promising studies have been conducted on the development of a vaccine based on *N. meningitidis* outer membrane proteins (OMPs). The major

All the adjuvant used were capable to increase the immune response against the class 5C protein. However, LPS was more effective for use in adult mice, while *B. pertussis* showed better results in neonate/ young mice. The intranasal route was adequate to administer the antigen in order to sensitize efficiently the cells of the immune system that were stimulated quickly by intramuscular route of immunization. The data suggest that the class 5C protein is important in the induction of mucosal immunity for the *Neisseria meningitidis* B.

Dissertação disponível na Biblioteca da Secretaria da Saúde
Email: egaspari@ial.sp.gov.br

Amperometric immunosensor using Tc85-11 protein and investigations of the protein interaction with anti-*T. Cruzi* antibody by atomic force microscopy

Ferreira, A. A. P. **Imunossensor amperométrico empregando a proteína Tc85-11 e investigações da interação da proteína com anticorpo anti-*T. Cruzi* por microscopia de força atômica** —Araraquara, SP, 2005, [Tese de Doutorado —Instituto de Química —UNESP —Araraquara]

Chagas' disease is an American trypanosomiasis caused by the hemoflagellate *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). In Brazil, the control measures to eradicate the populations of native triatomine species have significantly reduced the risk of *T. cruzi* transmission by contaminated hematophagous insects but contamination by blood transfusion is still a serious problem, particularly in remote regions. The detection of antigen in blood sera could be useful just for the acute phase of the Chagas' disease while the detection of *anti-T. cruzi* antibodies in the serologic analysis is the chosen method for the etiological diagnosis of Chagas' disease in the chronic phase. The present work reports the development of an amperometric immunosensor for the diagnosis of Chagas' disease and the preliminary investigation on atomic force microscopy (AFM) by using a specific glycoprotein of the trypomastigote surface which belongs to the Tc85-11 protein family of *Trypanosoma cruzi*. Tc85-11 was expressed as polyhistidine fusion protein using the vector pCR T7/NT TOPO® Cloning (Invitrogen) and *Escherichia coli* strain BL21 (DE3) plysS (Invitrogen). Tc85-11 protein was purified from inclusion bodies, solubilized in 50 mM Tris-HCl, pH 6.0, 100 mM NaCl and 1 M imidazole and purified with a Ni²⁺ (nitrilotriacetic acid)-column (Chelating Sepharose Fast Flow resin/Amersham-Pharmacia Biotech). Approximately 0.08 mg mL⁻¹ of Tc85-11 protein was obtained. The presence of the recombinant protein was detected by SDS-PAGE (9% gel) and Western blot, employing anti-His tag antibodies (Amersham Pharmacia Biotech). The Tc85-11 protein was kindly donated by Walter Colli and Maria Júlia M. Alves (USP, Inst. Chem., SP, Brazil). Screen-printed electrodes (Au-2%Pd, Ag-2%Pd and Au-2%Pd as working, reference and auxiliary electrodes, respectively), were supplied by BVT Technologies, Brno, Czech Republic. The screen-printed electrodes (SPE) were modified with cysteamine and later activated with glutaraldehyde, which were used to form the covalent bond with the purified recombinant antigen (Tc85-11). The affinity reaction between immobilized antigen and antibody anti-*T. cruzi* (primary antibody), present in sanguineous serum of patients with Chagas' disease, was monitored by anti-IgG peroxidase conjugate (secondary antibody). This enzyme, in the presence of hydrogen peroxide and potassium iodide, catalyses the I₂ formation and the reduction current intensity was measured at -400 mV vs Ag-2%Pd screen-printed electrode at 25 °C. Electrochemical measurements were performed with a potentiostat-galvanostat (PGSTAT10 from Eco-Chemie, The Netherlands). The best results were obtained with the following conditions: dilutions of 1:20, 1:40, 1:4000 for antigen, primary antibody and secondary antibody, respectively; 1x10⁻⁴ and 3x10⁻⁴ mol L⁻¹ for H₂O₂ and KI concentrations, respectively. The threshold of reactivity (cut off) was -0.158 μA. The immunosensor was applied to sera of chagasic patients and patients having different systemic diseases. Lupus erythematosus, hepatitis, HIV, schistosomiasis, paracoccidioidomycosis, rheumatic arthritis, anti-*T. cruzi* positive and negative sera were obtained from Diagnosis Laboratory of Faculty of Pharmaceutical Sciences (Unesp, Araraquara, SP, Brazil). Sera from hosts of systemic infections (leprosy, leishmaniasis (sp), were freely supplied by Instituto Adolf Lutz (São Paulo, SP, Brazil) and Instituto Lauro de Souza Lima (Bauru, SP, Brazil). An Extend Multimode Atomic Force Microscope controlled by a Nanoscope IIIa electronics (Digital Instruments, Santa Barbara, CA, USA) operating was used to image the electrode surface before and after the different modifications. Silicon cantilevers with a force constant of 34-65 Nm⁻¹ and resonant frequency of 321-396 kHz were purchased from NanoWorld (Neuchatel, Switzerland). Digital Nanoscope software (v 4.22) was used to analyze the topographic images. The gold substrates used for the AFM studies were obtained depositing a gold layer either on silicon or on Si₃N₄ slides with a sputter system (Sputter Coater S150B, BOC Edwards, UK) followed by a thermal annealing. The atomically flat gold surface with roughness (rms) of 0.07 nm was modified with cysteamine, glutaraldehyde, and then antigen Tc85-11. In this case, no anti-IgG peroxidase conjugate was needed. Surface imaging at different levels of modification and antigen-antibody binding allow us to distinguish the affinity reactions. The specific interaction of the Tc85-11 protein with the anti-*T. cruzi* antibody was demonstrated by AFM resolute imaging. The studies had indicated that the Tc85-11 protein is suitable for serological diagnosis of Chagas' disease using amperometric immunosensors. However, using the immunosensor

a distinguishing between Chagas' and leishmaniasis diseases was not possible yet. Future research will be focused on the interaction of Tc85-11 protein with sera of leishmaniasis by AFM.

Tese disponível na Biblioteca do Instituto de Química da UNESP

E-mail: antoferr@posgrad.iq.unesp.br

AGRADECIMENTOS AOS COLABORADORES

A Comissão de Redação agradece aos pareceristas que colaboraram para este volume

Adelaide José Vaz – Faculdade de Ciências Farmacêuticas/USP/SP
Adriana de Paula Almeida – Divisão de Bromatologia e Química/IAL/São Paulo/SP
Adriana Mercandante – Faculdade de Engenharia de Alimentos/UNICAMP/Campinas/SP
Afonso de Liguori Oliveira – Escola de Veterinária/UFMG/MG
Ana Maria Rauen - ITAL/Campinas/SP
Ana Terezinha Tavechio – Divisão de Biologia Médica/IAL/São Paulo/SP
Armando Perez Flores – SABESP/São Paulo/SP
Benedito Correa – Instituto de Ciências Biomédicas/USP/SP
Bernadete D.G.M. Franco – Faculdade de Ciências Farmacêuticas/USP/SP
Cacilda Jiunko Aiba – CETESB/São Paulo/SP
Carlos A. R. Anjos – Faculdade de Engenharia de Alimentos/UNICAMP/SP
Carol H Collins – Instituto de Química/UNICAMP/Campinas/SP
Célia Sylos – UNESP/Araraquara/SP
Clarice Queico Fujimura Leite – UNESP/Araraquara/SP
Cristiane B. Cano – Divisão de Bromatologia e Química/IAL/São Paulo/SP
Cristiane Cominetti – Faculdade de Ciências Farmacêuticas/USP/SP
Deborah H. Markowicz Bastos – Faculdade de Saúde Pública/USP/SP
Déborah Inês Teixeira Fávaro – IPEN/São Paulo/SP
Delia Rodrigues-Amaya – Faculdade de Engenharia de Alimentos/UNICAMP/Campinas/SP
Eduardo Vicente – ITAL/Campinas/SP
Elisa Hirooka – UEL/Londrina/PR
Elisabeth Wenzel de Menezes – Faculdade de Ciências Farmacêuticas/USP/SP
Elizabeth Aparecida F. S. Torres – Faculdade de Saúde Pública/USP/SP
Elizabeth de Souza Nascimento – Faculdade de Ciências Farmacêuticas/USP/SP
Emy Takemoto - IAL CENTRAL / Bromatologia e Química/São Paulo/SP
Flávia Saldanha Kubrusly – Instituto Butantan/São Paulo/SP
Flávio Antonio Lázari - Departamento de Zoologia/UFPR/Curitiba/PR
Giselle I. Silva Lopez Lopes – Divisão de Bromatologia e Química/IAL/SP
Guilherme Prado – FUNED/Belo Horizonte/MG
Harumi Sakuma – Divisão de Bromatologia e Química/IAL/São Paulo/SP
Irma N. G. Rivera – Instituto de Ciências Biomédicas/USP/SP
Izildinha Moreno – ITAL/Campinas/SP
Jacqueline T. Macruz Peresi – IAL/São José do Rio Preto/SP
Jaime Amaya Farfan – Faculdade de Engenharia de Alimentos/UNICAMP/Campinas/SP
Jane Gonçalves M. Snow – ITAL/Campinas/SP
João Sarkis Yunes – Fundação Universidade Federal do Rio Grande/RS
Jorge S. do Rosário Casseb – Faculdade de Medicina/USP/SP
Jorge César Masini – Instituto de Química/USP/SP
Jorge Mancini Filho – Faculdade de Ciências Farmacêuticas/USP/SP
Jovita Madeira – FUNED/Belo Horizonte/MG
Katia M. V. A. Bittencurt. Cipolli – ITAL/ Campinas/SP
Leticia A. F. Nagato – Divisão de Bromatologia e Química/IAL/São Paulo/SP
Ligia B. Almeida Muradian – Faculdade de Ciências Farmacêuticas/USP/SP
Lina Yamachita Olivera – CIENTEC/Porto Alegre/RS
Lireny A.G. Gonçalves – Faculdade de Engenharia de Alimentos/UNICAMP/Campinas/SP
Lucia Maria Guedes Diefenbeck – IPB/LACEN/Porto Alegre/RS
Lucia M. Valente Soares – Faculdade de Engenharia de Alimentos/UNICAMP/SP
Luiz Antonio Gioielli - Faculdade de Ciências Farmacêuticas/USP/SP
Marcelo Morgano – ITAL/Campinas/SP

Márcia P. do Amaral Melo – Divisão de Bromatologia e Química/IAL/SP
Marcia Regina Beaux – Universidade Federal do Paraná/Curitiba/SP
Marcos Buckeridge - Instituto de Botânica/São Paulo/SP
Marcos Vinicius da Silva – Hospital Emílio Ribas/São Paulo/SP
Maria Alice da Silva Telles – Divisão de Biologia Médica/IAL/São Paulo/SP
Maria Antonia Callori Domingues – ESALQ/USP/Piracicaba/SP
Maria Helena Iha – IAL/Ribeirão Preto/SP
Maria Helena Matté – Faculdade de Saúde Pública/USP/SP
Maria Inês de Almeida Gonçalves – Faculdade de Ciências Farmacêuticas/USP/SP
Maria Inês Miritello Santoro – Faculdade de Ciências Farmacêuticas/USP/SP
Maria Ines Sato – CETESB/São Paulo/SP
Maria Lúcia Ribeiro – UNESP/Araraquara/SP
Marina Baquerizo Martinez – Faculdade de Ciências Farmacêuticas/USP/SP
Mário Tavares – IAL/Santos/SP
Marisa Padula – ITAL/Campinas/SP
Mariza Landgraf – Faculdade de Ciências Farmacêuticas/USP/SP
Marta Suely Madruga – Universidade Federal da Paraíba/PB
Marta Taniwaki – ITAL/Campinas/SP
Massami Shimokomaki – UEL/Londrina/PR
Mirian Solange Fernandes Caruso – Divisão de Bromatologia e Química/IAL/São Paulo/SP
Miyoko Jakabi – Divisão de Bromatologia e Química/IAL/São Paulo/SP
Neura Bragagnolo – Faculdade de Engenharia de Alimentos/UNICAMP/Campinas/SP
Neusa Akemi – CETESB/São Paulo/SP
Neuza Jorge – UNESP/ São José do Rio Preto/SP
Nivaldo Baccan – Instituto de Química/UNICAMP/Campinas/SP
Paulo Capel Navai – Faculdade de Saúde Pública/USP/SP
Paulo Roberto Nogueira de Carvalho – ITAL/Campinas/SP
Pedro Paulo Chieffi – Instituto de Medicina Tropical/USP/SP
Pericles Alves Nogueira – Faculdade de Saúde Pública/USP/SP
Raymundo S. Azevedo – Faculdade de Medicina/USP/SP
Regina M. M. S. Rodrigues – Divisão de Bromatologia e Química/IAL/São Paulo/SP
Rogério Perujo Tocchini – ITAL/Campinas/SP
Rosângela Gorni – NESTLE /SP
Rosemar Antoniassi – EMBRAPA/Rio de Janeiro/RJ
Rosimeire Zanella – Divisão de Biologia Médica/IAL/São Paulo/SP
Sebastião Timo Iaria – USP/São Paulo/SP
Sidinea Freitas – EMBRAPA/Rio de Janeiro/RJ
Silvana Bosquioli – LACEN/Curitiba/PR
Silvana do Couto Jacob – INCQS/FIOCRUZ/Rio de Janeiro/RJ
Solange Cristina Mazzoni-Viveiros - Instituto de Botânica/São Paulo/SP
Solange Maria Gennari – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia/USP/SP
Sônia Maria N. Lázari – Departamento de Zoologia/UFPR/PR
Sylvia Leão – UNIFESP/São Paulo/SP
Tânia Gomes – UNIFESP/ São Paulo/SP
Tânia Mara Amâncio Peixoto – FUNED/Belo Horizonte/MG
Vera Akiko Maihara – IPEN/USP/SP
Vera Chiocolla – Divisão de Biologia Médica/IAL/São Paulo/SP
Vera Lucia Signoreli Baldini – ITAL/Campinas/SP
Viviane F. Botosso – Instituto Butantan/São Paulo/SP

Agradecimento especial pela revisão do inglês
Mirthes Ueda - Divisão de Biologia Médica/IAL/São Paulo/SP

ISSN 0073-9855



9 770073 985009