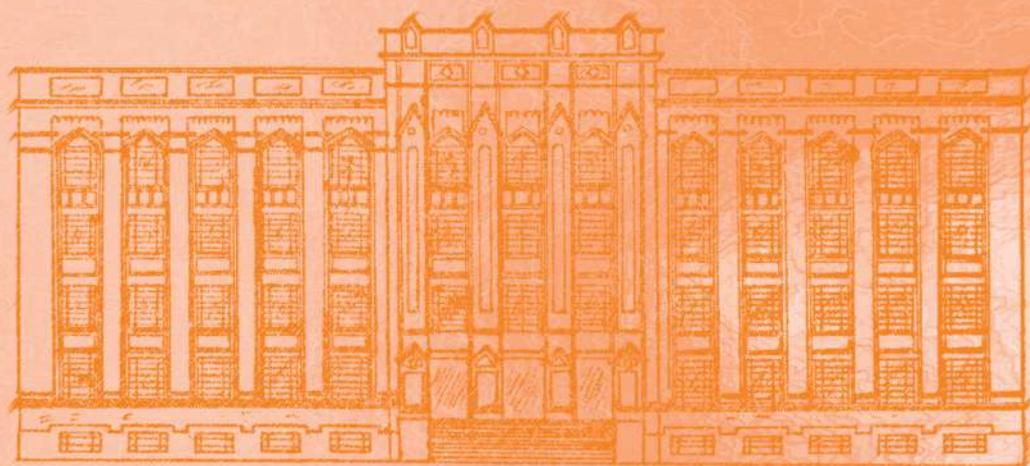


REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ

ISSN 0073-9855
RIALA6



Volume 64 número 1, 2005



GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE

ERRATA

Lira, G.M. et al. Composição centesimal, valor calórico, teor de colesterol e perfil de ácidos graxos da carne de búfalo (*Bubalis bubalis*) da cidade de São Luiz do Quitunde-AL. *Rev Inst Adolfo Lutz*, 64(1):31-8, 2005

raça, sexo e alimentação. Nos ruminantes, como bovinos e ovinos, há maior predominância de ácidos graxos saturados, porque a microbiota do rúmen hidrogena extensivamente os ácidos graxos insaturados da dieta²⁶.

Nossos resultados apontam um aspecto positivo no perfil de ácidos graxos da carne de búfalo, uma vez que ácidos graxos essenciais e benéficos ao organismo humano foram detectados.

O ácido monoinsaturado oléico (C18:1), da família ômega 9, tem sido apontado como hipolipidêmico²⁷, o qual atua diminuindo as lipoproteínas de baixa densidade (LDL)²⁶, apresentando efeito hipocolesterolêmico e protetor contra o desenvolvimento de doença coronariana aterosclerótica. Há uma correlação direta entre a incidência e gravidade das lesões ateromatosas e as concentrações plasmáticas de LDL. Concentrações elevadas de colesterol plasmático aumentam o tempo da LDL na circulação²⁸. O ácido oléico também é utilizado

no organismo como fonte preferencial de energia metabolizável para o crescimento rápido²⁹.

O ácido graxo saturado esteárico (C18:0) é considerado não aterogênico, sendo hipocolesterolêmico²⁶. Este ácido graxo é convertido rapidamente a ácido oléico pelo organismo após sua ingestão e não afeta o colesterol plasmático (Bonanome e Grundy)³⁰. Ao ácido poliinsaturado linoléico ω -6 (C18:2) são atribuídos numerosos benefícios ao organismo^{31,32}.

Os ácidos graxos da série ômega 6 exercem importante papel fisiológico como potentes mediadores da inflamação e efeito benéfico sobre o sistema imune³¹.

O ácido graxo poliinsaturado araquidônico (C20:4) é considerado essencial. Tem papel central no processo inflamatório, pode ser convertido em eicosanóides (prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanas, lipoxinas), importantes em uma série de sistemas fisiológicos, como o renal, gastrointestinal, reprodutor e cardiovascular, além de ser

Tabela 3. Perfil de ácidos graxos da carne de búfalo.

Ácidos graxos	Teores %		
	Alcatra *	Lombo paulista*	Chã de dentro**
Caprílico (C8:0)	0,37 ^a (±0,29)	0,50 ^b (±0,26)	0,48 ^b (±0,12)
Cáprico (C10:0)	0,56 ^a (±0,21)	0,89 ^b (±0,28)	0,48 ^a (±0,21)
Laúrico (C12:0)	2,65 ^a (±3,34)	2,33 ^a (±4,12)	2,34 ^a (±3,81)
Mirístico (C14:0)	1,33 ^a (±1,02)	1,35 ^a (±1,35)	1,07 ^a (±1,06)
Pentadecanóico (C15:0)	0,36 ^a (±0,07)	0,38 ^a (±0,05)	0,35 ^a (±0,03)
Palmitico (C16:0)	16,21 ^a (±1,99)	16,90 ^a (±2,34)	14,88 ^b (±2,37)
Palmitoléico (C16:1) (ω 7)	1,39 ^a (±0,50)	1,55 ^a (±0,48)	1,48 ^a (±0,49)
Margárico (C17:0)	0,93 ^a (±0,17)	0,87 ^a (±0,25)	0,81 ^a (±0,19)
Heptadecanóico (C17:1)	0,61 ^a (±0,16)	0,65 ^a (±0,15)	0,65 ^a (±0,20)
Esteárico (C18:0)	19,26 ^a (±2,19)	16,99 ^b (±2,01)	17,47 ^b (±3,06)
Oléico (C18:1) (ω 9)	24,36 ^a (±3,40)	24,73 ^a (±4,16)	23,24 ^a (±4,28)
Vacênico (C18:1) (ω 7)	2,69 ^a (±0,27)	2,58 ^a (±0,25)	2,56 ^a (±0,34)
Linoléico (C18:2) (ω 6)	9,26 ^a (±1,79)	8,99 ^a (±2,86)	10,37 ^a (±2,01)
Linolênico (C18:3) (ω 3)	2,56 ^a (±0,63)	3,07 ^a (±2,01)	2,61 ^a (±0,58)
Octadecatetraenóico (C18:4)	0,31 ^a (±0,06)	0,35 ^a (±0,07)	0,33 ^a (±0,05)
Eicosadienóico (C20:2) (ω 6)	0,43 ^a (±0,12)	0,44 ^a (±0,21)	0,44 ^a (±0,15)
Eicosatrienóico (C20:3) (ω 6)	0,77 ^a (±0,17)	0,86 ^a (±0,19)	0,87 ^a (±0,19)
Araquidônico (C20:4) (ω 6)	3,60 ^a (±0,81)	3,75 ^a (±0,91)	3,88 ^a (±0,90)
Eicosatetraenóico (C20:4) (ω 3)	0,21 ^a (±0,02)	0,14 ^b (±0,03)	0,29 ^a (±0,02)
Eicosapentaenóico (C20:5) (ω 3)	1,79 ^a (±0,45)	1,83 ^a (±0,45)	1,73 ^a (±0,40)
Docosapentaenóico (C22:5) (ω 3)	1,83 ^a (±0,38)	2,07 ^a (±0,53)	1,93 ^a (±0,46)
Docosahexaenóico (C22:6) (ω 3)	0,22 ^a (±0,03)	0,25 ^a (±0,02)	0,22 ^a (±0,02)
Não identificados	10,52	11,14	13,76
Saturados	41,67(±3,12)	40,21(±4,81)	37,88(±5,27)
Monoinsaturados	29,05(±3,73)	29,51(±4,41)	27,93(±4,71)
Poliinsaturados	20,98(±3,93)	21,75(±4,62)	22,67(±4,33)
Razão ω 6/ ω 3	2,1:1	2:1	2,3:1
Poliinsaturados/saturados	0,50(±0,13)	0,54(±0,18)	0,60(±0,19)

* Média de 10 amostras analisadas em duplicata, com desvio-padrão entre parênteses.

** Média de 11 amostras analisadas em duplicata, com desvio-padrão entre parênteses.

Médias com letras diferentes, diferem estatisticamente, $p < 0,05$.



GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE
COORDENAÇÃO DOS INSTITUTOS DE PESQUISA
INSTITUTO ADOLFO LUTZ

**REVISTA
DO
INSTITUTO ADOLFO LUTZ**

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

Volume 64 número 1, 2005

ISSN 0073-9855

**Janeiro - Junho
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 (1)

ISSN 0073-9855
RIALA 6

CDD₁₈ 614.07205

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

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

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

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

Palavra-chave: podem ser utilizados até seis descritores que identifiquem o conteúdo do artigo, se possível baseados no DECS (Descritores em Ciências da Saúde), disponível no www.bireme.br terminologia em saúde e consulta ao DECS.

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 JAust 1996;164:282-4.

▪ No prelo (forthcoming)

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

Livros e outras monografias

▪ Indivíduo como autor

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

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

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

▪ Instituição como autor e editor

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

▪ Capítulo num livro

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

▪ Resumo/Trabalho de congresso publicado

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

▪ Dissertação/Tese

Cairns RB. Infrared spectroscopic studies of solid oxygen [Tese de doutorado]. Berkeley, California: University of California, 1965.156 pp.

Material legal

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

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

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

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

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

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

Material Eletrônico

▪ Artigo de revista em formato eletrônico

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

▪ Monografia em formato eletrônico

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

▪ Arquivo de computador

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

- 1009 Milho recém-colhido no Brasil: interação da microbiota fúngica, fatores abióticos e ocorrência de fumonisinas**
Pre-harvest corn in Brazil: mycoflora interaction, abiotic factors and fumonisins occurrence
Adriana P. de ALMEIDA; Myrna SABINO; Homero FONSECA; Benedito CORRÊA 1-9
- 1010 Reservas das sementes de sete espécies de *Theobroma*: revisão**
Seed reserves from seven species of the genus *Theobroma* : a review
Maria Helena MARTINI; Débora de Queiroz TAVARES 10-9

Artigos Originais/ Original Articles

- 1011 Aplicabilidade de Petrifilm® na enumeração de bactérias e fungos em drogas vegetais**
Use of Petrifilm® for bacteria and fungi counting in herbal drugs
Adriana BUGNO; Adriana A. B. ALMODOVAR; Tatiana C. PEREIRA; Terezinha de Jesus A. PINTO 20-4
- 1012 Matérias estranhas e identificação histológica em manjerona (*Origanum majorana* L.), orégano (*Origanum vulgare* L.) e salsa (*Petroselinum sativum* Hoffm.), em flocos, comercializados no Estado de São Paulo**
Detection of extraneous materials and histology identification of marjoram (*Origanum majorana* L.), oregano (*Origanum vulgare* L) and parsley (*Petroselinum sativum* Hoffm.) flakes commercialized in São Paulo state
Regina M. Morelli S. RODRIGUES; Maria Helena MARTINI; Paulo F. T. CHIARINI; Sônia de Paula T. PRADO 25-30
- 1013 Composição centesimal, valor calórico, teor de colesterol e perfil de ácidos graxos da carne de búfalo (*Bubalis bubalis*) da cidade de São Luiz do Quitunde-AL**
Centesimal composition, caloric value, level of cholesterol, and fatty acid profile of the meat from buffalo (*Bubalis bubalis*) breeding in the area of São Luiz do Quitunde-AL
Giselda Macena LIRA; Jorge MANCINI FILHO; Rosângela Pavan TORRES; Alane Cabral de OLIVEIRA; Alba Maria Alves VASCONCELOS; Cristhiane Maria Bazílio de OMENA; Michelle Cristina Silva de ALMEIDA 31-8
- 1014 Níveis de chumbo na água para consumo em escolas municipais da cidade de São Paulo**
Lead levels in drinking water consumed in municipal schools of São Paulo city
Maria de Fátima Henriques CARVALHO; Maria Cristina DURAN; Paulo TIGLEA; Márcia Liane BUZZO; Carmen Silvia KIRA 39-43
- 1015 Determinação simultânea de chumbo e cádmio em sangue por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite**
Simultaneous determination of lead and cadmium in blood by graphite furnace atomic absorption spectrometry
Maria de Fátima H. CARVALHO; Franca D. de MAIO; Maria Cristina DURAN; Carmen S. KIRA; Isaura A. OKADA 44-9

- 1016 Avaliação de resíduos de ditiocarbamatos e etilenotioúrea (ETU) em mamão e sua implicação na saúde pública***
Evaluation of dithiocarbamate and ethylenethiourea (ETU) residues in papaya and their implication for public health
Vera R.R. LEMES; Heloisa H. C. BARRETTO; Tereza A. KUSSUMI; Sérgio COLACIOPPO 50-7
- 1017 Qualidade física e química de ovos de codornas alimentadas com dietas modificadas**
Physical and chemical quality of eggs from quails fed with modified diets
Neusa Fátima SEIBEL; Lisiane das Neves BARBOSA; Paulo Machado GONÇALVES; Leonor Almeida de SOUZA-SOARES 58-64
- 1018 Determinação de quinolonas por cromatografia líquida de alta eficiência empregando coluna monolítica de fase reversa**
Determination of quinolones by high performance liquid chromatography using a monolithic reversed-phase column
Blanca Elena O. MARKMAN; Maria Regina W. KOSCHTSCHAK; Helena M. YANO 65-9
- 1019 Alterações clínicas e laboratoriais relacionadas à exposição ambiental aos praguicidas organoclorados em moradores de aterro à céu aberto, Cubatão, S.P.*.**
Clinical and laboratorial adverse effects from exposition to organochlorine pesticides in inhabitants of dump site in Cubatão, S.P.*
Eladio SANTOS FILHO; Rebeca S. SILVA; Vera R.R. LEMES; Heloisa H.C. BARRETTO; Odete N.K. INOMATA; Tereza A. KUSSUMI; Sônia O.B. ROCHA 70-8
- 1020 Potencial toxigênico das cepas de *Aspergillus flavus* E *Fusarium verticillioides* isoladas de grãos de milho, da semeadura à colheita, provenientes das regiões de Capão Bonito/SP e Ribeirão Preto/SP**
Toxigenic potential of *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides* strains in Brazilian corn from sowing to harvest processes.
Adriana P. de ALMEIDA; Myrna SABINO; Homero FONSECA; Benedito CORRÊA 79-84
- 1021 Influência da irradiação gama na produção de aflatoxina B₁ e no crescimento de cepa toxigênica de *Aspergillus flavus* em amendoim (*Arachis hypogaea* L.)**
Gamma-irradiation effect on aflatoxin B₁ production and growth of toxigenic strain of *Aspergillus flavus* 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 85-90
- 1022 Incidência de fungos e micotoxinas em grãos de milho armazenados sob diferentes condições**
Incidence of fungi and mycotoxins in stored corn under different conditions
Vanessa PEZZINI; Eunice VALDUGA; Rogério Luis CANSIAN 91-6
- 1023 Otimização das condições de extração de compostos voláteis em leite caprino utilizando a técnica de extração e concentração simultânea**
Extraction Enhancement of Volatile Compounds from Goat Milk Using the Simultaneous Extraction and Concentration Techniques
Rita de Cássia R. E. QUEIROGA; Marta S. MADRUGA; Mércia de S. GALVÃO; Roberto G. da COSTA 97-103
- 1024 Qualidade físico-química e microbiológica do leite de cabra pasteurizado e Ultra Alta Temperatura, comercializado na região de Ribeirão Preto-SP.**
Physicochemical and microbiological quality of frozen pasteurized goat whole milk and of Ultra High Temperature milk commercialized in the region of Ribeirão Preto - SP
Maria Aparecida de OLIVEIRA; Rosa Maria Duarte FÁVARO; Marina Miyuki OKADA; Lucile Tiemi ABE; Maria Helena IHA 104-9
- 1025 Estudo comparativo de métodos para determinação de nitrato em águas para consumo humano**
Comparative study on nitrate determination methods in potable water
Elaine Marra de Azevedo MAZON; Aline Cristine Garcia de OLIVEIRA; Berenice Mandel BRÍGIDO; Valéria Pereira da Silva FREITAS 110-6
- 1026 Mel com própolis: considerações sobre a composição e rotulagem**
Honey added with propolis: composition and labeling considerations
Alexandre BERA; Ligia B. ALMEIDA-MURADIAN 117-21

- 1027 The occurrence of *Aeromonas* spp in drinking water**
 Ocorrência de *Aeromonas* spp em água de consumo humano
 Terumi Oyama FUZIHARA; Beatriz PISANI; Marise SIMÕES; Berenice Mandel BRÍGIDO; Christina LEOPOLDO E SILVA; Lúcia VANNUCCI; Kioka ARIOSHI 122-7
- 1028 Avaliação microbiológica da água de abastecimento público em escolas no município de Ibiúna - SP: estudo comparativo da qualidade da água no cavalete e pós-cavalete.**
 Microbiological evaluation of public water supply in schools of Ibiúna- SP: comparative study of water quality in conduit and post conduit.
 Francisco R. M. SOTO; Yara S. K. FONSECA; Daniel V. ANTUNES; Marcia R. RISSETO; Marcos AMAKU; Maria de Lourdes B. ARINE 128-131
- 1029 Estudo comparativo entre técnicas de Löwenstein–Jensen e do sistema MB/BacT™ no isolamento de micobactérias**
 Löwenstein–Jensen and MB/BacT™ system – a comparative study on isolation of mycobacteria
 Andréa G. V. COELHO; Liliana A. ZAMARIOLI; Clemira M. P. V. REIS; Teresa Á. R. Figueiredo 132-6
- 1030 Culturas mistas de micobactérias: é importante isolar e identificar?**
 Mixed mycobacterial cultures: is it important to separate and to identify multiple species?
 Vânia T. G. INUMARU; Roberta M. BLANCO; Maria Conceição MARTINS; Carmen M.S. GIAMPAGLIA; Suely Y.M. UEKI; Erica CHIMARA; Lucilaine FERAZOLI; Maria Alice S. TELLES 137-141

Comunicação Científica/Brief Communication

- 1031 Contaminação de areias em áreas de recreação infantil por ovos e larvas de *Ancylostoma* sp. no município de Ribeirão Preto, SP, Brasil**
 Contamination of sandpits by *Ancylostoma* sp. eggs and larvae in children recreational areas of Ribeirão Preto county, SP, Brazil
 Divani Maria CAPUANO; Gutemberg de Melo ROCHA 142-4

RESUMOS DE TESES E DISSERTAÇÕES

- Standardization and evaluation of molecular methods to detect oocysts of *Cryptosporidium* spp. (Apicomplexa: Cryptosporiidae) in faecal samples: extraction of genomic DNA and PCR (polymerase chain reaction)**
 Padronização e avaliação de métodos moleculares para detecção de oocistos de *Cryptosporidium* spp. (Apicomplexa: Cryptosporiidae) em amostras fecais: extração de DNA genômico e PCR (reação em cadeia pela polimerase
 Carvalho-Almeida, T. T 145
- Evaluation of immune response and protection induced by immunization with A2 and Lack antigens against experimental *Leishmania major* and *Leishmania amazonensis* infection**
 Avaliação dos níveis de proteção e da resposta imune induzida pela imunização com os antígenos A2 e Lack na infecção experimental com *Leishmania (Leishmania) major* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis*
 Coelho, E. A. F 145
- Study of quantification and validation methodologies of soy proteins and collagen and technological uses in meat products**
 Della Torre, J.C.M 146

Milho recém-colhido no Brasil: interação da microbiota fúngica, fatores abióticos e ocorrência de fumonisinas

Pre-harvest corn in Brazil: mycoflora interaction, abiotic factors and fumonisins occurrence

RIALA6/1009

Adriana P. de ALMEIDA^{1*}; Myrna SABINO¹; Homero FONSECA²; Benedito CORRÊA³

* Endereço para correspondência: ¹Instituto Adolfo Lutz, Divisão de Bromatologia e Química, Seção de Química Biológica, Av. Dr. Arnaldo, 355 CEP 01246-902, São Paulo/SP, Brasil e-mail: maedri@uol.com.br

² Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, USP, Piracicaba, SP.

³ Instituto de Ciências Biomédicas, USP, São Paulo, SP.

Recebido: 25/10/2004 – Aceito para publicação: 30/06/2005.

RESUMO

O milho, no Brasil, tem um importante papel, tanto na nutrição humana quanto animal. Atualmente, o país é o terceiro maior produtor mundial, após Estados Unidos e China, tendo sua produção ficado, nos últimos anos, em torno de 48,3 milhões de toneladas. Em termos de distribuição geográfica, o milho é cultivado em diversas regiões do país, sendo a região Centro-Sul responsável por mais de 95% da produção. A importância não se restringe apenas ao seu volume, mas também ao papel sócio-econômico desempenhado, cuja produção e comercialização sustenta centenas de milhares de pessoas. A contaminação do milho por espécies de *Fusarium*, na etapa de pré-colheita, tem sido um problema sério em vários países. Espécies pertencentes a esse gênero possuem ampla distribuição na natureza e produzem micotoxinas, metabólitos secundários tóxicos. O fato, ressalta a importância de se compreender os processos de contaminação do milho brasileiro por *F. verticillioides*, principal espécie produtora de fumonisinas, visando o desenvolvimento de estratégias de controle capazes de minimizar as perdas econômicas e possíveis problemas à saúde humana e animal. A revisão propõe fornecer informações atuais sobre a microbiota fúngica de grãos de milho recém-colhido e sua interação com os fatores abióticos e presença de fumonisinas. **Palavras-Chave.** fumonisinas, grãos de milho, microbiota fúngica, fatores abióticos.

ABSTRACT

In Brazil, corn plays an important role in both human and animal nutrition. Brazil has been ranked as the third world corn producer following the USA and China. Lately, the Brazilian annual corn yield reached 48.3 tons. The Central-Southern region is the major corn producer, responding for 95% of the total national production. The importance of corn production is not restricted to its volume, but also due to the social-economical role played by this culture, which production and trade have been employing a thousand people. Pre-harvest contamination of corn by *Fusarium* species has been a serious problem in several countries. Fungi belonging to this genus are ubiquitous in nature, and they are able to produce toxic secondary metabolites named mycotoxins. This fact emphasizes the importance in understanding the process of fungal contamination of field corn with *Fusarium verticillioides*, which is the main fumonisins - producer species, so as to develop the efficient control strategies, and to reduce economic losses and the possible human and animal health harms. The purpose of the present review is to provide up-to-date available news on the pre-harvest Brazilian corn mycoflora, and its interaction with abiotic factors and fumonisins occurrence.

Key Words. fumonisins, corn grains, mycoflora and abiotic factors

SUMÁRIO

Introdução	2
Importância do Milho	2
Panorama Nacional	2
Microbiota Fúngica do Milho	3
Fatores Abióticos	5
Fumonisinas	5
Conclusão	7
Referências	7

INTRODUÇÃO

Os cereais são susceptíveis à contaminação e à proliferação de microrganismos provenientes de vegetais, solo e veiculados pelo ar, cujo número e tipo de microrganismos diferem conforme o estágio e maturação do grão.

O armazenamento e a manipulação inadequados desses cereais conduzem à perda de qualidade caracterizada pelo aumento da susceptibilidade ao ataque de fungos, insetos, ácaros, bem como perda dos nutrientes. Os altos índices de contaminação têm sido freqüentes em regiões tropicais e subtropicais, embora também sejam freqüentes em regiões de clima temperado, não ocorrendo região do mundo isenta de contaminação microbiana.

Segundo Ominski et al.¹, os fungos representam a segunda maior causa de deterioração e perda de sementes e grãos armazenados, perdendo apenas para os insetos. Diversos fungos contaminam os grãos de milho no campo, entretanto as espécies do gênero *Fusarium* predominam no processo, sendo apontado como principal contaminante de grãos de milho em desenvolvimento no campo². O gênero *Fusarium* é reconhecidamente um importante contaminante do milho. A necessidade de 20 % a 21 % de umidade e atividade de água entre 0,80 e 0,90 para o desenvolvimento, justifica sua classificação como fungo de campo. Entretanto, este fungo pode sobreviver por meses em grãos armazenados constituindo-se em risco potencial oriundo de caráter micotoxigênico³.

Esta revisão traz informações atualizadas sobre a microbiota fúngica de grãos de milho recém-colhido e sua interação com os fatores abióticos e presença de fumonisinas.

IMPORTÂNCIA DO MILHO

O milho (*Zea mays L.*) é uma planta de ciclo vegetativo variado, evidenciando desde cultivares extremamente precoces, cuja polinização pode ocorrer 30 dias após a emergência, até cultivares normais, cujo ciclo vital pode alcançar 300 dias. Contudo, nas condições brasileiras, a cultura do milho apresenta ciclo variável entre 110 e 180 dias, em função da caracterização dos cultivares, período este compreendido entre a semeadura e a colheita⁴.

Provavelmente originado no México, o milho é um dos cereais que se desenvolveu e se adaptou a condições bastante diversas em termos de temperatura, umidade, duração da estação livre de geadas e de outras condições ambientais. Por este motivo ele é cultivado desde o Norte do Canadá até o Sul da Argentina⁵.

O milho constitui um dos principais insumos para o segmento produtivo, sendo utilizado com destaque no arração de animais, em especial na suinocultura, na avicultura e na bovinocultura de leite, tanto *in natura*, como na forma de farelo, ração ou silagem. Na alimentação humana, o milho é comumente empregado *in natura* como milho verde, e na forma de subprodutos, como pão, farinha e massas. Na indústria, é empregado como matéria-prima para produção de amido, óleo, farinha, glicose, produtos químicos, rações animais e na elaboração de formulações alimentícias, com crescentes pesquisas revelando novas utilidades⁶.

A diversidade na utilização resulta em amplo consumo de milho, seja pelos países produtores como importadores. Estima-se que nos países desenvolvidos, o consumo anual de grãos atinja 1000 kg / habitantes, sendo 930 kg consumidos indiretamente, na forma de ração para produção de carne e leite e 70 kg, diretamente, na dieta humana. Já, nos países pobres da Ásia, o consumo *per capita* é de 150 kg, quase todo na forma de grãos *in natura*⁷.

A necessidade de aumento da produtividade submeteu o milho a um intenso processo de melhoramento genético, resultando em diversos híbridos comerciais desenvolvidos especialmente para locais específicos e regionais.

Em termos de produção, a qualidade do milho depende de variedade e práticas culturais. Todos os grãos e cereais são expostos, tanto no campo quanto no armazenamento, à ação de fatores físicos, químicos e biológicos, que interagem entre si favorecendo os processos de deterioração. A manutenção adequada do cereal, durante o período de entressafra, permite a conservação das características organolépticas e nutricionais, preservando assim a qualidade do produto⁸.

PANORAMA NACIONAL

No Brasil, a importância do milho na alimentação humana e animal antecede à instalação dos colonizadores, sendo

cultivado e utilizado pelos indígenas. Atualmente, o Brasil é o terceiro maior produtor mundial de milho, após Estados Unidos e China, tendo sua produção ficado, nos últimos anos, em torno de 48,3 milhões de toneladas⁹.

Em termos de distribuição geográfica, o milho aparece nos quatro cantos do país, sendo a região Centro-Sul responsável por mais de 95 % da produção⁶. A importância não se restringe apenas ao seu volume, mas também ao papel sócio-econômico desempenhado, cuja produção e comercialização sustenta centenas de milhares de pessoas¹⁰.

O estado do Paraná é o principal produtor de milho do país. Somando-se as duas safras (normal e milho safrinha), o estado colheu 14,403 milhões de toneladas, com um crescimento de 46% em relação à safra anterior. De acordo com o Deral, Departamento de Economia Rural da Secretaria da Agricultura, o estado do Paraná foi responsável por 30 % da produção nacional. Os fatores responsáveis pela obtenção da safra recorde foi o clima adequado que beneficiou as lavouras, bem como o investimento dos produtores em tecnologia⁹.

No estado de São Paulo o milho é uma das mais importantes culturas, ultrapassando 1,3 milhões de hectares cultivados, tendo sido superado, em termos de área, a partir da década de 80, pelo cultivo da cana-de-açúcar¹¹.

A produção brasileira de milho em grãos tem dois destinos. Primeiro, o consumo no estabelecimento rural e, segundo a oferta do produto no mercado consumidor, onde tem-se fluxos de comercialização direcionados às fabricas de ração, indústrias químicas, produto *in natura* e exportação¹². A suinocultura e a avicultura são os responsáveis pela maior parte da utilização dos grãos (41 %), onde o milho entra como matéria-prima básica na formulação de rações destinadas a essa criação. O restante da produção divide-se entre a indústria (13,5 %), formulação de rações de outras espécies animais (5,6 %) e produção de sementes (0,6 %). A não comercialização de 40 % dos grãos produzidos deve-se, principalmente, ao consumo na propriedade rural (24,7 %), ao consumo humano nas grandes cidades (4,4 %) e às perdas durante a colheita e armazenamento do total produzido no país (9,9 %)¹³.

Como todo produto agrícola, a disponibilidade do milho está sujeita a períodos de safra e entressafra, ao contrário de seu consumo, que é contínuo. Em se tratando de uma cultura anual, faz-se, então, necessário a sua conservação em armazéns para que o mercado seja abastecido nesses períodos. Portanto, no Brasil, a conservação do milho é de interesse fundamental, devido, não somente à sua intensa utilização, mas também pelo fato de sua produção restringir-se a um curto período e o seu abastecimento ocorrer durante todo o ano.

O interesse na melhor e mais prolongada conservação do grão é tanto maior quanto mais numerosos forem os agentes naturais que cooperam para sua deterioração e quanto mais fácil for a sua proliferação. Inúmeros fatores podem influenciar no processo de deterioração, como a variedade da semente utilizada no plantio, as condições climáticas desfavoráveis na colheita, os danos mecânicos, a secagem inadequada e o armazenamento impróprio¹⁴.

Apesar da deterioração dos grãos ser um fenômeno irreversível, progressivo e dificilmente evitado, o uso de práticas adequadas de cultivo, processamento e armazenamento, contribuem para o retardamento do processo⁸. No Brasil, país de grande dimensão territorial, os índices de perdas tendem a ser maiores devido à dispersão da produção, à distância dos mercados e portos de exportação e à deficiência da rede de armazenagem, em termos de adequação e localização¹⁵.

MICROBIOTA FÚNGICA DO MILHO

A contaminação fúngica tem sido responsável pela inevitável perda de qualidade dos grãos e sementes, tornando-os impróprios para o consumo e resultando em grandes perdas econômicas.

Os fungos causam uma série de danos aos grãos durante o plantio e a colheita, bem como no armazenamento. Os efeitos da invasão fúngica incluem a diminuição do poder germinativo, emboloramento visível, descoloração, odor desagradável, perda de matéria seca, aquecimento, cozimento, mudanças químicas e nutricionais, perda da qualidade e produção de micotoxinas³.

Os fungos presentes nos grãos de cereais são, tradicionalmente, classificados conforme suas exigências de água em dois grupos ecológicos: fungos de campo e fungos de armazenamento. Os primeiros invadem as sementes ainda no campo e requerem, para o desenvolvimento, elevada umidade relativa do ar (90 %) e altos teores de umidade nos grãos (20-21 %). Neste grupo, predominam as espécies dos gêneros *Alternaria*, *Cladosporium*, *Helminthosporium* e *Fusarium*. Quanto aos fungos de armazenamento, necessitam de teores de umidade mais baixos, entre 13 e 18%, sendo pouco frequentes durante o crescimento da planta no campo e nos grãos recém-colhido. Neste grupo, os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* são os principais representantes^{3,16}.

No entanto, esta classificação não é apropriada aos trópicos úmidos, uma vez que determinadas espécies pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, anteriormente consideradas como fungos de armazenamento, podem ocorrer antes da colheita e produzir micotoxinas¹⁷.

De todos os fungos capazes de contaminar os grãos de milho no campo, as espécies do gênero *Fusarium* são as mais frequentes. Mills² menciona o gênero *Fusarium* como importante contaminante de grãos em desenvolvimento no campo, causando doenças como, podridão da semente e colmos.

As espécies fúngicas predominantes do gênero *Fusarium* no campo são, *F. verticillioides* e *F. subglutinans*, frequentemente responsáveis pelo apodrecimento da espiga de milho, cuja contaminação pode ser iniciada através de danos causados por insetos e aves. Estes fungos aparecem contaminando o grão junto ao embrião, embora muitas vezes os sinais desta contaminação não possam ser evidenciados¹⁸.

Em milho, duas rotas são postuladas para a contaminação por *Fusarium*. Na primeira, os esporos,

provenientes da safra anterior ou de ervas daninhas, capins e solo, caíam sobre as sementes expostas e a colonização ocorreria dentro da faixa adequada de umidade e temperatura. Na segunda, insetos ou pássaros danificariam os grãos, e os esporos fúngicos, trazidos pelo vento, caíam sobre a semente exposta promovendo a sua contaminação, sendo, neste caso, a umidade um fator não tão importante². Trabalhos recentes apontam a segunda rota como a mais provável. No entanto, independente de como o fungo penetre na planta, condições climáticas serão necessárias para que a colonização prossiga. A resistência do cultivar, após iniciada a invasão, é outro fator que não pode ser esquecido¹⁹.

A contaminação do milho recém-colhido por *Fusarium* spp. tem sido um problema sério em muitos países. De acordo com estimativas do “World Bank Report – Investing in Health”²⁰, intoxicações crônicas por micotoxinas tendem a reduzir a expectativa de vida nos países em desenvolvimento. O fato enfatiza a importância da compreensão da evolução da contaminação fúngica, nos campos de cultivo do milho, por *F. verticillioides*.

Abbas et al.²¹ isolaram *Fusarium* spp. em grãos de milho provenientes de 32 campos produtores em Minnesota (E.U.A.), tendo como espécies predominantes: *F. graminearum* (30 %), *F. subglutinans* (23 %), *F. verticillioides* (20 %), *F. oxysporum* (14 %) e *F. proliferatum* (12 %).

Snijders²² demonstrou que a frequência de aparecimento de cada espécie é influenciada pela localização geográfica e clima. Na África do Sul, esta influência foi bem demonstrada por Marasas et al.²³. Neste trabalho os autores verificaram a incidência de espécies de *Fusarium* em três áreas daquele país. O *F. verticillioides* predominou na região mais quente, sub-tropical, enquanto o *F. subglutinans* prevaleceu na região mais fria, temperada, e o *F. graminearum*, por sua vez apareceu com uma incidência maior na região de clima intermediário.

Julian et al.²⁴, analisando 69 amostras de grãos de milho recém-colhido e armazenado de 4 regiões de Honduras, observaram que os fungos mais frequentemente isolados foram: *Fusarium verticillioides*, *Fusarium subglutinans*, *Penicillium* spp., *Stenocarpella maydis*, *Stenocarpella macrospora* e *Acremonium* spp.

Gonzalez et al.²⁵, estudando a microbiota de grãos de milho recém-colhido (safra 1999 e 2000) provenientes das províncias da região nordeste dos Andes, Argentina, observaram que o gênero *Fusarium* foi o mais freqüente. A espécie *F. verticillioides* foi a mais freqüentemente isolada dos grãos de milho provenientes da safra de 1999 em todas as províncias, enquanto que a espécie *F. graminearum* foi a mais freqüente nas amostras de milho da safra de 2000 na província de Salta.

Ghianian et al.²⁶, analisando amostras de grãos de milho recém-colhido das províncias de Fars, Khuzestan, Kermanshah e Mazandaran, Irã, verificaram que o gênero mais freqüentemente isolado foi *Fusarium* spp. (38, 5%), seguido dos gêneros

Aspergillus (8,7 %), *Rhizopus* (4,8 %), *Penicillium* (4,5 %) e *Mucor* (1,1 %). *F. verticillioides* foi a espécie mais prevalente (83 %), tendo aparecido em alta incidência na província de Mazandaran (59 %), região com os maiores índices de chuva e umidade relativa, alta taxa de câncer de esôfago e altos níveis de fumonisina em milho.

No Brasil, *Fusarium* spp. são contaminantes comuns em grãos de milho e outros produtos agrícolas, com predominância de *F. verticillioides* e *F. graminearum*²⁷.

Meirelles et al.²⁸, analisando 38 amostras de grãos de milho envolvidos com surtos de leucoencefalomalácia equina – LEME, detectaram 97,4 % de contaminação por *Fusarium* spp., 57,9 % por *Penicillium* spp. e 36,8 % por *Aspergillus* spp. Dentro do gênero *Fusarium*, a espécie *F. verticillioides* (82 %) foi a mais prevalente.

Xavier et al.²⁹, analisando grãos de milho relacionados com o quadro de LEME, verificaram que 49,4 % das amostras estavam contaminadas por *F. verticillioides*, 25,8 %, por *Aspergillus* spp. e 25,8 %, por *Penicillium* spp.

Leoni; Soares³⁰, através do estudo de 18 amostras de milho recém-colhido, safra 1992, provenientes de diferentes municípios de São Paulo, observaram contaminação por *Fusarium* spp. em 14 a 18 % das amostras.

Pozzi et al.³¹, analisando 130 amostras de grãos de milho recém-colhido e armazenado, provenientes de Ribeirão Preto/SP, verificaram maior frequência de *Fusarium* spp. (83,8 %), seguido por *Penicillium* spp. (55,3 %), *Aspergillus* spp. (40,7 %) e outros 11 fungos filamentosos. Dentro dos gêneros *Fusarium* e *Aspergillus*, as espécies predominantes foram *F. verticillioides* (80,7 %) e *A. flavus* (36,1 %), respectivamente.

Castro et al.³², estudando amostras de grãos de milho recém-colhido, provenientes de diferentes localidades do estado de São Paulo, durante o ano de 1992, também demonstraram a predominância de invasão por fungos dos gêneros *Fusarium* e *Penicillium*.

Ono et al.³³, estudando os efeitos das condições climáticas na ocorrência de fungos e fumonisinas em 150 amostras de milho recém-colhido provenientes das regiões centro-sul, centro-oeste e norte do estado do Paraná, verificaram uma elevada contaminação dos grãos por *Fusarium* spp. (98,7 a 100 %) e *Penicillium* spp. (93 a 100 %). A maior contaminação ocorreu nas amostras de grãos de milho provenientes da região centro-oeste. Nessa região a espécie *F. verticillioides* foi a predominante, tendo sido isolada em 85,9 % das amostras.

Orsi et al.³⁴, analisando 195 amostras de três híbridos de milho recém-colhido e armazenado, provenientes de Ribeirão Preto/SP, relacionaram a influência dos fatores abióticos na frequência de isolamento da microbiota fúngica. As análises microbiológicas demonstraram a predominância do gênero *Fusarium*, seguido dos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus*. Com relação ao gênero *Fusarium*, a espécie *F. verticillioides* foi a mais freqüente nos 3 híbridos, principalmente na faixa de 0,70 a 0,79 de atividade de água.

Almeida et al.³⁵, estudando 66 amostras de grãos de milho recém-colhido (híbridos BR-201, C-901 e CX-322), provenientes das regiões de Assis, Capão Bonito e Ribeirão Preto, verificaram que o gênero *Fusarium* apareceu contaminando 80,0 % das amostras na região de Assis, 55,5 % das amostras na região de Capão Bonito e 77,8 % das amostras na região de Ribeirão Preto. A espécie *F. verticillioides* foi a mais freqüentemente isolada, tendo aparecido em 60,6% das amostras.

Almeida et al.³⁶, analisando 57 amostras de grãos de milho colhidas em diferentes estádios de maturidade da planta, também verificaram maior freqüência de *F. verticillioides* nas amostras analisadas. Tal fungo foi isolado em 35 % das amostras da região de Capão Bonito e em 49 % das amostras de Ribeirão Preto, Estado de São Paulo. Nesse mesmo trabalho, verificaram, ainda, uma contaminação prévia por *F. verticillioides* em 30 % das sementes utilizadas para o plantio.

Ono et al.³⁷, estudando os efeitos do armazenamento em 36 amostras de grãos de milho com teor de umidade de 11 e 14 %, verificaram que os gêneros *Fusarium* e *Penicillium* predominaram nas amostras de milho recém-colhido (100 %) e em amostras armazenadas por 12 meses em ambos teores de umidade avaliados.

FATORES ABIÓTICOS

O meio ambiente de uma cultura de milho é um complexo difícil de ser conhecido, devido ao seu dinamismo e constantes variações. Porém, seu importante papel no desenvolvimento e produção de plantas não permite que seja desprezado, quando se quer maximizar a produção agrícola³⁸.

Mossel; Ingram³⁹ classificaram os fatores que influenciam o desenvolvimento fúngico em: (a) intrínseco, relacionado diretamente com o substrato (conteúdo de água, pH, conteúdo nutricional, características genéticas) e (b) extrínsecos, relacionados com o meio ambiente (temperatura, umidade relativa do ambiente, chuva e outros).

A cultura do milho é uma das mais estudadas sob o ponto de vista de suas exigências climáticas, devido ao grande interesse despertado para sua produção no século XIX. O milho é uma planta que exige, durante seu ciclo vegetativo, calor e umidade para produzir satisfatoriamente, proporcionando rendimentos compensadores³⁸.

De todos os fatores que influenciam o desenvolvimento fúngico em grãos de milho, a água e temperatura são, provavelmente, os mais importantes determinantes ecológicos. A atividade de água (Aa) e temperatura influenciam, diretamente, nas interações com outros fungos, habilidade em produzir esporos e nas atividades metabólicas, principalmente na produção de micotoxinas⁴⁰.

A maioria dos fungos que contaminam os grãos se proliferam em teores de umidade acima de 13,5 %, sendo a atividade de água para o crescimento das principais espécies de

fungos toxigênicos acima de 0,76⁴¹. Segundo esses mesmos autores os valores mínimos de atividade de água para o crescimento de *F. moniliforme* e produção de fumonisinas são 0,87 e 0,90, respectivamente.

A maioria dos fungos que contaminam os grãos, antes da colheita, é capaz de crescer dentro de limites mais amplos de pH, pressão osmótica, conteúdo de umidade, bem como, de se desenvolver em temperaturas entre 0 °C e 30 °C. Entretanto, alguns podem crescer a 35 °C e outros, próximo à temperatura de congelamento, como é o caso de certas espécies de *Aspergillus*, *Cladosporium* e *Thamnidium*⁴².

Le Bars et al.⁴³, estudando o efeito da temperatura na produção de fumonisinas por cepas de *F. verticillioides* obtidas de grãos de milho, observaram que a temperatura de 20 °C é a melhor para a produção de fumonina B₁, sendo que a temperaturas de 5, 35 e 40 °C, nenhuma fumonina foi detectada.

Cahagnier et al.⁴⁴ analisando o efeito da Aa na biossíntese da fumonina B₁ (FB₁) e no crescimento de *F. verticillioides*, verificaram que a maior produção da toxina (3000 µg/g) ocorreu em valores de Aa próximos a 1,0.

Marin et al.⁴⁵, estudando 3 cepas de *F. proliferatum* e 1 de *F. verticillioides* isoladas de grãos de milho provenientes da Espanha, constataram maior produção de fumonisinas B₁ e B₂ nas cepas isoladas de grãos de milho com Aa 0,956 e 0,968. Verificaram, ainda, que as cepas isoladas de grãos de milho com Aa 0,925 produziram baixos níveis de fumonisinas.

Marin et al.⁴⁶ verificou o efeito da atividade de água (0,89 a 0,97) e temperatura (7 a 37°C) na produção de FB₁ por cepas de *F. verticillioides* e *F. proliferatum* isoladas de grãos de milho irradiados e incubados por 28 dias. As condições ótimas de produção de FB₁ para *F. verticillioides* e *F. proliferatum* foram 30 °C e Aa 0,97 e 15 °C e Aa 0,97, respectivamente. Nenhuma FB₁ foi produzida por cepas de *F. verticillioides* e *F. proliferatum* isoladas de grãos de milho com Aa entre 0,89 e 0,91.

Torres et al.⁴⁷, estudando os efeitos da Aa (0,92, 0,95 e 0,98) e temperatura (20 e 30 °C) no crescimento miceliano de *F. verticillioides*, *A. ochraceus* e *Alternaria alternata* em grãos de milho, verificaram que *F. verticillioides* demonstrou um comportamento distinto frente aos valores de atividade de água e temperatura testados, ao contrário dos outros fungos estudados.

FUMONISINAS

As fumonisinas são metabólitos fúngicos secundários originalmente isolados de *F. verticillioides*, que tem como principal característica a sua presença natural em alimentos, principalmente em milho^{48,49}.

Até o presente momento, 28 diferentes análogas às fumonisinas (FB) foram descritas. Destas, as fumonisinas B₁ (FB₁), B₂ (FB₂) e B₃ (FB₃) são produzidas naturalmente. A FB₁ é a mais importante do grupo, constituindo até 70 % do total das

fumonisininas, tanto em cultivo quanto em milho naturalmente contaminado^{50,51}.

Essa micotoxina causa leucoencefalomalácia em equínos – LEME⁵²⁻⁵⁴, edema pulmonar e hidrotórax em suínos – EPS^{55,56}, câncer hepático em ratos⁵⁷, além de, redução do desenvolvimento, problemas cardíacos, imunossupressão, degeneração e necrose hepática em aves⁵⁸. Embora ainda não seja constatada, a elevada incidência de câncer de esôfago, em determinadas regiões da África do Sul, China, Itália e Estados Unidos, tem sido relacionada a provável consumo de alimentos contendo elevados níveis de fumonisinas⁵⁹⁻⁶¹. Outro sim, a “International Agency for Research on Cancer” – IARC classificou as toxinas de *F. verticillioides* como pertencentes a Classe 2B, provavelmente carcinogênicas a seres humanos⁶².

As fumonisinas são elaboradas a partir de uma estrutura que é característica da esfinganina, um composto intermediário na biossíntese dos esfingolipídeos⁶³. Essa semelhança das fumonisinas com a molécula de esfinganina leva alguns autores a acreditarem que o seu mecanismo de ação esteja relacionado com a inibição ou quebra do metabolismo dos esfingolipídeos⁶⁴, estrutura essa relacionada com várias funções da célula, tais como: comunicação célula-célula, e crescimento, diferenciação e transformação da célula. Portanto, uma quebra na seqüência da biossíntese desses esfingolipídeos poderia trazer graves conseqüências, com transtornos orgânicos⁶⁵.

A potente ação da fumonisina sobre a biossíntese dos esfingolipídeos talvez seja o mecanismo das lesões necróticas nos cérebros de equínos intoxicados por FB₁. As lesões do tecido cerebral, que é rico em esfingolipídeos, podem ser o resultado final da inibição da síntese de esfingomiélin. A inibição dos esfingolipídeos, é específica, e o sítio de ação parece estar na ceramida sintetase, que catalisa a última etapa da síntese, quando o grupo amina da esfingosina é acilado por um acil-CoA graxo, de cadeia longa. Essa seria a forma pela qual a fumonisina causaria a leucoencefalomalácia equina em equínos (LEME) e tumor em ratos⁶⁶.

As fumonisinas foram primeiramente isoladas de culturas de *F. verticillioides*, porém, outros *Fusarium* spp. tem sido demonstrados como produtores de fumonisinas, como é o caso do *F. proliferatum*⁶⁷, *F. nygamai*⁶⁸, *F. anthophilum*, *F. dlamini* e *F. napiforme*⁶⁹. Recentemente, uma espécie do gênero *Alternaria* também foi demonstrada como sendo produtora de FB₁⁷⁰.

F. verticillioides, principal espécie produtora de fumonisinas, ocorre comumente no milho e em outros cereais como trigo, arroz e aveia, assim como em menor freqüência, em outras culturas não agrícolas. Essa espécie tem larga distribuição na natureza e não ocorre somente em zonas tropicais e subtropicais, mas também, em zonas temperadas úmidas e sub-úmidas⁷¹.

A primeira descrição sobre a ocorrência natural de FB₁ foi realizada por Sydenham et al.⁷², a partir de milho contaminado de uma área de Transkei, África do Sul, com altos índices de câncer de esôfago em humanos. Os níveis detectados nas amostras variavam de 44 a 83 µg/g.

Murphy et al.⁷³ determinaram o conteúdo de fumonisinas em milho e respectivo refugo das safras 1988 a 1991 provenientes de Iowa, Wisconsin e Illinois, Estados Unidos. Neste trabalho verificaram que a concentração de fumonisinas no refugo de milho foi 10 vezes maior que no milho intacto.

Julian et al.⁷⁴ constataram a presença de FB₁ em 24 das 66 amostras de milho provenientes de Honduras, em níveis que variaram de 0,068 a 6,55 µg/g.

Fazekas et al.⁷⁴, analisando grãos de milho provenientes da Hungria, verificaram que 70% das amostras, contaminadas visualmente por *Fusarium*, apresentavam uma média de 6,64 µg/g de FB₁ (0,095 a 52,4 µg/g). Neste mesmo trabalho, os autores verificaram que o restante das amostras (30%), que não apresentavam contaminação visual por nenhum fungo, também estavam contaminadas por FB₁, em níveis que variaram de 0,06 a 5,1 µg/g.

Yoshizawa et al.⁷⁵, analisando 18 amostras de milho tailandês, safra 92/93, detectaram FB₁ em 89% das amostras (0,063 a 18,8 µg/g) e FB₂ em 67% (0,05 a 1,4 µg/g).

No Brasil, vários trabalhos relataram a ocorrência de fumonisinas B₁ e B₂ em amostras de grãos de milho, derivados e rações, procedentes de estabelecimentos com histórico de LEME e outros tipos de intoxicações⁷⁶⁻⁷⁸.

Hirooka et al.⁷⁹, analisando 48 amostras de milho do Paraná, Mato Grosso e Goiás, detectaram fumonisinas B₁ e B₂ na totalidade das amostras, com níveis de 0,6 a 18,52 µg/g de FB₁ e de 1,2 a 19,13 µg/g de FB₂.

Ono⁸⁰, analisando 150 amostras de milho recém-colhido das safras de 1995/96, detectou FB₁ em 149 amostras, com níveis de 0,07 a 13,46 µg/g e FB₂ em 140 amostras, com níveis variando de 0,08 a 6,92 µg/g.

Em 4 locais do Estado de São Paulo (Assis, Capão Bonito, Ribeirão Preto e Votuporanga), Machinski Jr⁸¹ pesquisou a ocorrência de fumonisinas em três híbridos de milho recém-colhido – safra 94/95. Todos os híbridos analisados mostraram uma contaminação por FB₁ e FB₂, variando de 0,23 a 15,96 µg/g para FB₁ e de 0,13 a 7,01 µg/g para FB₂.

Camargos⁸², analisando amostras de milho recém-colhido - safras 1994/95 e 1997/98, provenientes das regiões de Capão Bonito, Ribeirão Preto e Votuporanga, verificou que todos os cultivares analisados estavam contaminados com fumonisinas em níveis que variaram de 0,13 a 6,58 µg/g para FB₁ e de 0,06 a 2,15 µg/g para FB₂ - safra 1994/95, e de 1,15 a 43,8 µg/g para FB₁ e de 0,08 a 11,65 µg/g para FB₂ - safra 97/98.

Orsi et al.³⁴, estudando 195 amostras de três híbridos de milho recém-colhido e armazenado, provenientes de Ribeirão Preto, Estado de São Paulo, verificaram que 90,2% das amostras apresentaram-se contaminadas por FB₁ (0,87 a 49,31 µg/g) e 97,4% por FB₂ (1,96 a 29,16 µg/g).

Ono et al.⁸³, analisaram 150 amostras de milho recém-colhido provenientes das regiões centro-sul (27 amostras), centro-oeste (86 amostras) e norte (37 amostras) do Estado do Paraná. Fumonisininas foram detectadas em 147 (98%) amostras com níveis variando de 0,096 a 22,6 µg/g. Os maiores níveis de

contaminação foram encontrados nas amostras provenientes das regiões norte (9,85 µg/g) e centro-oeste (5,08 µg/g).

Almeida et al.³⁶ verificaram a contaminação em 57 amostras de grãos de milho, provenientes das regiões de Capão Bonito e Ribeirão Preto nos diferentes estádios de maturidade da planta por fumonisinas B₁ e B₂. Os resultados de Capão Bonito mostraram 92,3% de contaminação das amostras por FB₁ (0,05 a 10,87 µg/g) e 61,5% por FB₂ (0,05 a 0,521 µg/g). Nas amostras provenientes da região de Ribeirão Preto essa análise revelou que 96,8% das amostras estavam contaminadas por FB₁ (0,05 a 17,685 µg/g) e 74,2% por FB₂ (0,05 a 5,238 µg/g).

Ono et al.⁸⁴ analisando 128 amostras de milho recém-colhido provenientes das regiões norte (safras 1991, 1995 e 1997) e centro-sul (safra de 1995), do Estado do Paraná, verificaram que 111 (86,7%) apresentaram-se contaminadas por fumonisinas. Todas as 27 (100%) amostras de grãos de milho, provenientes da região norte (safra 1991) apresentaram contaminação por fumonisinas (2,32 a 16,64 µg/g). Na região centro-sul (safra 1995), 26 (96,3%) amostras de um total de 27, foram positivas para fumonisinas (0,07 a 3,66 µg/g), enquanto que na região norte (safra 1995) todas as 37 (100%) amostras, apresentaram contaminação por fumonisinas (0,57 a 9,97 µg/g). Na região norte (safra 1997) das 37 amostras de grãos de milho analisadas, 21 (56,7%) apresentaram contaminação por fumonisinas, porém com níveis mais baixos (0,05 a 2,67 µg/g).

CONCLUSÃO

Os avanços na área da tecnologia agrícola permitiram um aumento da produção mundial de alimentos. Entretanto, determinados fatores climáticos e biológicos tem limitado a capacidade agrícola de alguns países, afetando direta ou indiretamente os produtos durante o plantio, a colheita e o armazenamento. Em termos de produção, a qualidade do milho depende muito de sua variedade e práticas culturais. Sabemos que todos os grãos são expostos, tanto no campo quanto no armazenamento, à ação de fatores físicos, químicos e biológicos, que interagem entre si favorecendo os processos de deterioração, que podem acarretar perdas substanciais na economia e alto risco à saúde humana e animal. A manutenção adequada das culturas durante o plantio, bem como dos grãos, durante o período de entressafra, permite a conservação das características organolépticas e nutricionais, preservando-se a qualidade do produto. Até o presente momento pouco se sabe a respeito de como e quando se dá a contaminação do milho, tanto no campo quanto no armazenamento. Sendo o milho uma cultura de grande significado econômico, é imprescindível a elucidação dos mecanismos de contaminação, para que medidas preventivas possam ser tomadas, amenizando-se, com isso, as perdas econômicas e os riscos à saúde humana e animal.

A presença simultânea de *Fusarium verticillioides* e fumonisinas, na maioria das amostras de grãos de milho, demonstra a importância de um controle efetivo da cultura durante à fase de crescimento da mesma.

REFERÊNCIAS

1. Ominski KH, Marquardt RR, Sinha RN, Abranson, D. Ecological aspects of growth and mycotoxin production by storage fungi. In: Miller JD, Trenholm HL, editors. Mycotoxins in Grains: compounds other than aflatoxins. St Paul, Eagan Press, 1994. p.287-312.
2. Mills JT. Ecology of mycotoxigenic *Fusarium* species on cereal seeditors. J Food Protect 1989; 52:737-42.
3. Christensen CM, Kaufmann HH. Grain storage: The role of fungi quality loss. Minneapolis, University Minnesota Press;1969.
4. Fancelli AL. Plantas alimentícias: guia para aula, estudos e discussão. Centro Acadêmico Luiz de Queiroz. ESALQ / USP; 1986.
5. Joint,Fao/Who/ Unep. Conference on mycotoxins, Global Perspective on mycotoxins. Nairobi, WHO; 1977.
6. Bull LT, Cantarella H. Cultura do milho: fatores que afetam a produtividade. Piracicaba, Potafos, 1993.
7. Moricochi L, Ferreira CR, Vicente JR, Piva LHO. Potencial de produção e produtividade da agricultura paulista. Agricultura, São Paulo 1989; 36: 127-48.
8. Almeida Lima V. Industrialização do milho. In: Fancelli, L.A., Lima, V.A, editors. Milho: produção, pré-processamento e transformação agroindustrial. São Paulo, Secretaria da Indústria, Comércio, Ciência e Tecnologia, 1983. p.77-112.
9. IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção Agrícola Municipal 2003. (<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pam/2003/default.shtm>) 25/11/04.
10. Moura PAM, Oliveira ACS Aspectos econômicos da cultura do milho. Informe Agropecuário, 6 (72) dez, 1980.
11. Nogueira-Júnior S, Nogueira EA, Tsunechiro A. Consideração sobre a agroindústria do milho. São Paulo, Instituto Econômico de Agricultura, 1987; 27, p.1-18. (Relatório de Pesquisa).
12. EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. EMBRAPA Milho e Sorgo. (<http://www.cnpm.embrapa.br/index.php3>)
13. Pedrosa AVB, Dezen RB. O milho: características do mercado e perspectivas. Preços Agríc. 1991; 55: 1-4.
14. Fancelli AL. Tecnologia da Produção. In: Fancelli, LA, Lima, VA, editors. Milho - produção, pré-processamento e transformação agroindustrial. São Paulo, Secretaria da Agricultura e Comércio, Ciência e Tecnologia, 1983. p.1-68.
15. Carvalho F, Ferreira C, Tsunechiro A, Freitas S. Avaliação econômica das perdas pós-colheita de milho no Brasil. In: Congresso Nacional de Milho e Sorgo,18. Vitória, 1990. p.8-13.
16. Christensen CM, Sauer DB. Mycoflora: In: Christensen, C.M, editor. Storage of cereal grains and their products. Minnessota, American Association of Cereal Chemists, 1982, p.219-40.
17. Hill RA, Wilson DM, McMillian WW, Widstron NW, Cole RJ, Sanders TH, Blankenship PD. Ecology of the *Aspergillus flavus* group and aflatoxin formation in corn and groundnut. In: Lacey J ed. Trichotecenes and other mycotoxins. Chichester: Wiley J, Publisher; 1985.
18. Sutton JC. Epidemiology of wheat head blight and maize ear rot caused by *Fusarium graminearum*. Can J Plant Pathol 1982; 4: 195-209.
19. Miller JD. Epidemiology of *Fusarium* ear diseases of cereals. In: Miller JD, Trenholm HL, editors. Mycotoxins in Grain. St. Paul: Eagan Press; 1994. p.19-36.
20. World Bank Report. Investing in Health. World Development Report 1993. New York, NY, Oxford University Press, 1993.
21. Abbas HK, Mirocha CJ, Meronuck RA, Pokorny JD, Gould SL, Kommedahl T. Mycotoxins and *Fusarium* species associated with infected ears of corn in Minnesota. Appl Environ Microbiol 1988; 54: 1930-3.
22. Snijders CHA. Breeding for resistance to *Fusarium* in wheat and maize. In: Miller JD, Trenholm HL, editors. Mycotoxins in Grain. St. Paul: Eagan Press; 1994. p.37-58.
23. Marasas WF, Kriek NPS, Wiggins VM, Steyn PS, Towers DK, Hastite TJ Incidence, geografic distribution and toxigenicity of *Fusarium* species South African corn. Phytopathology 1979; 69:1181-5.

24. Julian AM, Warring PW, Phillips SI, Medlock VFP, Macdonald MV, Río LE. Fungal contamination and selected mycotoxins in pre- and post-harvest maize in Honduras. *Mycopathologia* 1995; 129:5-16.
25. Gonzalez HH, Resnik SL, Pacin AM. Mycoflora of freshly harvested flint corn from Northwestern Provinces in Argentina. *Mycopathologia* 2000; 155(4):207-11.
26. Ghiasian SA, Kord-Bacheh P, Rezayat SM, Maghsood AH, Taherkhani H. Mycoflora of Iranian maize harvested in the main production areas in 2000. *Mycopathologia* 2004; 58(1):113-21.
27. Salgado JM, Carvalho PCT. Fungos toxigênicos associados a cereais. I - Levantamento da microbiota do milho, trigo e arroz. *Rev Microbiol* 1980; 11:60-3.
28. Meirelles MCA, Corrêa B, Fischman O, Gambale W, Paula CR, Chacon-Reche No et al. Mycoflora of the toxic feed associated with equine leukoencephalomalacia (ELEM) outbreaks in Brazil. *Mycopathologia* 1994; 127:183-8.
29. Xavier JG, Brunner CHM, Sakamoto M, Corrêa B, Fernandes WE, Dias JLC. Equine leukoencephalomalacia: Report of five cases. *Braz J Anim Sci* 1991; 28:185-9.
30. Leoni LAB, Soares LMV. Desenvolvimento de uma metodologia para determinação e confirmação de moniliformina em milho. In: Congresso Latino de Micotoxicologia, 1. Encontro Nacional De Micotoxinas, 8. Anais. Rio de Janeiro, 1994. p.114-15.
31. Pozzi CR, Corrêa B, Gambale W, Paula CR, Chacon-Reche NO et al. Post-harvest and stored corn in Brazil: mycoflora interaction, abiotic factors and mycotoxins occurrence. *Food Addit Contam* 1995; 12: 313-19.
32. Castro M.F, Soares LMV, Furlani RRZ. Mycoflora, aflatoxigenic species and mycotoxins in freshly harvested corn (*Zea mays L.*): a preliminary study. *Rev Microbiol* 1995; 26: 289-95.
33. Ono EY, Sugiura Y, Homechin M, Kamogae M, Vizzoni E, Ueno Y et al. Effect of climatic conditions on natural mycoflora and fumonisins in freshly harvested corn of the State of Parana, Brazil. *Mycopathologia* 1999; 147(3):139-48.
34. Orsi RB, Corrêa B, Pozzi RC, Schammas E, Nogueira JR, Dias SMC et al. Mycoflora and occurrence of fumonisins in freshly harvested and stored hybrid maize. *J Stored Prod Res* 2000; 36:75-87.
35. Almeida AP, Corrêa B, Mallozzi MAB, Sawasaki E, Ortega EM. Mycoflora and aflatoxin/fumonisin production by fungal isolates from freshly harvested corn hybrids. *J Braz Soc. Microbiol* 2000; 31: 321-26.
36. Almeida AP, Corrêa B, Direito GM, Fonseca H, Fancelli AL, Ortega E. Mycoflora and fumonisin contamination in Brazilian corn from sowing to harvest. *J Agric Food Chem* 2002; 50:3877-82.
37. Ono EY, Sasaki EY, Hashimoto EH, Hara LN, Corrêa B, Itano ES, Sugiura T, Ueno Y, Hirooka EY. Post-harvest storage of corn: effect of beginning moisture content on mycoflora and fumonisin contamination. *Food Addit Contam* 2002; 19(11):1081-90.
38. Silva WJ Aptidão climática para a cultura do milho. *Informe Agropecuário*, 6 (72) dez. 1980.
39. Mossel DA, Ingram M. The physiology of the microbial spoilage of foods. *J Appl Bacteriol* 1955; 18:232-68.
40. Lacey J Water availability and the occurrence of toxigenic fungi and mycotoxins in stored products. In: International Iupac Symposium On Mycotoxins And Phycotoxins, 6. Anais. Tokyo, 1988. p.186-89.
41. Lacey J, Ramakrishna N, Hamer A, Magan N, Marfleet C. Grain fungi. In: Arora DK, Mukerji KG, Marth EH, editors. *Handbook of Applied Microbiology: foods and feed*. New York: Marcel Dekker, 1991.
42. Lacey J Pre - and post - harvest ecology of fungi causing spoilage of foods and other stored products. In: Moss MO, Jarvis B, Skinner FA, editors. *Filamentous fungi in foods and feed*. Soc Appl Bacteriol Symp., Ser., n.18 (suppl.):145, 1989.
43. Le Bars J, Le Bars P, Dupuy J, Boudra H, Cassini R. Biotic and abiotic factors in fumonisin B₁ production and stability. *JAOAC Int*. 1994; 77(2):517-21.
44. Cahagnier B, Melcion D, Richard-Molard D. Growth of *Fusarium verticillioides* and its biosynthesis of fumonisin B₁ on maize grain as a function of different water activities. *Lett Appl Microbiol* 1995; 20:247-51.
45. Marín S, Sanchis V, Vinas I, Canela R, Magan N. Effect of water activity and temperature on growth and fumonisin B1 and B2 production by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* on maize grain. *Lett Appl Microbiol* 1995; 21:298-301.
46. Marín S, Magan N, Belli N, Ramos AJ, Canela R, Sanchis V. Two-dimensional profiles of fumonisin B1 production by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* in relation to environmental factors and potential for modelling toxin formation in maize grain. *Int J Food Microbiol* 1999; 51(2-3):159-67.
47. Torres MR, Ramos AJ, Soler J, Sanchis V, Marín S. SEM study of water activity and temperature effects on the initial growth of *Aspergillus ochraceus*, *Alternaria alternata* and *Fusarium verticillioides* on maize grain. Scanning electron microscopy. *Int J Food Microbiol* 2003; 81(3):185-93.
48. Bezuidenhout SC, Gelderblom WCA, Gorst-Allman CP, Horak RM, Marasas WFO, Spiteller G et al. Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium verticillioides*. *J Chem Soc. Chem Commun* 1988; 11:743.
49. Gelderblom WCA, Jaskiewicz K; Marasas WFO, Thiel PG, Horak RM; Vleggaar R et al. Fumonisin: novel mycotoxin with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. *Appl Environ Microbiol* 1988; 54:1806-11.
50. Musser SM, Plattner RD. Fumonisin composition in culture of *Fusarium verticillioides*, *Fusarium proliferatum* and *Fusarium nygamae*. *J Agric Food Chem* 1997; 45: 1169-73.
51. Rheeder JP, Marasas WFO, Vismer HF. Production of fumonisins analogs by *Fusarium* species. *Appl Env. Microbiol* 2002; 68 (5): 2101-05.
52. Haliburtom JC, Vesonder RF, Lock TF, Buck WB. Equine leukoencephalomalacia (ELEM): a study of *Fusarium verticillioides* as an etiologic agent. *Vet Hum. Toxicol.* 1979; 21:348-51.
53. Marasas WFO, Kellerman TS, Gelderblom WCA, Cotzer JAW, Thiel PG, Van Der Lugt JJ Leukoencephalomalacia in horse induced by fumonisin B₁ isolated from *Fusarium verticillioides*. *Onderstepoort. J Vet Res* 1988; 55:197-203.
54. Ross PF, Rice LG, Plattner RD, Osweiler GD, Wilson TM, Owens DL et al Concentrations of fumonisin B₁ in feed associated with animal health problems. *Mycopathologia* 1991; 114:129-35.
55. Calvin BM, Harrison LR. Fumonisin induced pulmonary edema and hydrotorax in swine. *Mycopathologia* 1992; 117:79-82.
56. Harrison LR, Colvin BM, Greene JT. Pulmonary edema and hydrotorax in swine produced by fumonisin B₁, a toxic metabolite of *Fusarium verticillioides*. *J Vet Diagn Invest* 1990; 2:217-21.
57. Gelderblom WCA, Kriek NPJ, Marasas WFO, Thiel PG. Toxicity and carcinogenic of the *Fusarium verticillioides* metabolite, fumonisin B₁ in rats. *Carcinogenesis* 1991; 12:1247-51.
58. Norred WP, Voss KA. Toxicity and role of fumonisin in animal diseases and human esophageal cancer. *Food Protect.* 1994; 57:522-7.
59. Chu FS, Li GI. Simultaneous occurrence of fumonisin B1 and other mycotoxins in mould collected from the People's Republic of China in regions with high incidence of esophageal cancer. *Appl Environ Microbiol* 1994; 60:847-52.
60. Rheeder JP, Marasas WFO, Thiel PG, Sydenham EW, Shephard GS, Van Schalkwyk DJ *Fusarium verticillioides* and the fumonisins in corn in relation to human esophageal cancer in Transkei. *Phytopathology* 1992; 82:353-7.
61. Sydenham EW, Shephard GS, Thiel PG, Marasas WFO, Stockenstrom S. Fumonisin contamination of commercial corn-base human food stuffs. *J Agric Food Chem* 1991; 39:2014-9.
62. IARC. Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. IARC. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Lyon.; IARC; 1993. v.56.
63. Sweeley CC. Sphingolipids. In: Vance DE, Vance JE, editors. *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes*, Amsterdam.; Elsevier Science Publ; 1991. p.327-61.
64. Wang E, Norred WP, Bacon CW, Riley RT, Merrill Jr AM. Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins. Implications for diseases associated with *Fusarium verticillioides*. *J Biol Chem* 1991; 266:1486-90.

65. Merrill Jr AH. Cell regulation by sphingosine and more complex sphingolipids. *J Bioenerg Biomembr* 1991; 23: 83-104.
66. Norred WP, Wang E, Yoo H, Riley RT, Merrill Jr AH. Toxicology of fumonisins and mechanistic implications. *Mycopathologia* 1992; 117 (1-2):73-8.
67. Ross PF, Nelson PE, Richard JL, Plattner RD, Rice LG, Osweiler GD et al. Production of fumonisin by *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum* isolates associated with equine leukoencephalomalacia and pulmonary edema syndrome in swine. *Appl Environ Microbiol* 1990; 56:3224- 6.
68. Thiel PG, Marasas WFO, Sydenham GS, Gelderblom WCA, Shepard GS. The implications of naturally occurring levels of fumonisins in corn for human and animal health. *Mycopathologia* 1992; 117:3-9.
69. Nelson PE. Taxonomy and biology of *Fusarium verticillioides*. *Mycopathologia* 1992; 117:29-36.
70. Chen J, Mirocha CJ, Xie W, Hogge L, Olson D. Production of the fumonisin B₁ by *Alternaria alternata* f. spp. *lycopersici*. *Appl Environ Microbiol* 1992; 58:3928-31.
71. Bacon CW, Nelson PE. Fumonisins production in corn by toxigenic strains of *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum*. *J Food Protect* 1994; 57:514-21.
72. Sydenham EW, Thiel PG, Marasas WF, Shephard GS, Van Schalkwyk DJ, Koch KR. Natural occurrence of some *Fusarium* mycotoxins in corn from low and high esophageal cancer prevalence areas of the Transkei, Southern Africa. *J Agric Food Chem* 1990; 38 (10):1900-3.
73. Murphy PA, Rice LG, Ross PF. Fumonisin B₁, B₂ and B₃ content of Iowa, Wisconsin, and Illinois corn and corn screenings. *J Agric Food Chem* 1993; 41:263-6.
74. Fazekas B, Kis M, Tóthné Hajdú E. Data on the contamination of maize with fumonisin B1 and other fusariotoxins in Hungary. *Acta Veterin. Hungarica* 1996; 44:27-37.
75. Yoshizawa T, Yamashita A, Chokethaworn N. Occurrence of fumonisins and aflatoxins in corn from Thailand. *Food Addit Contam* 1996; 13 (2):163-8.
76. Hirooka EY, Shibata MM, Viotti NMA, Carvalho L, Takahashi LSA, Souza IF et al. Fumonisin: importância da nova micotoxina de *Fusarium verticillioides* em intoxicações animais no norte do Paraná. *Rev Microbiol* 1991; 22(1):312.
77. Meirelles MCA, Correa B, Fischman O, Gambale W, Paula CR, Fonseca H. Leucoencefalomalácia equina (LEME) no Brasil. II. Aspectos epizootiológicos e micotoxicológicos dos surtos ocorridos nos anos de 1988 a 1990. *Rev Microbiol* 1991; 22:316.
78. Yamaguchi MM, Hirooka EY, Shibata TMM, Hasegawa RH, Aoyama S, Sugiura T et al. Fumonisinas em milho no Estado do Paraná. Anais do Encontro de Micotoxinas, 7, São Paulo, 1992.
79. Hirooka EY, Yamaguchi MM, Aoyama S, Sugiura Y, Ueno Y. The natural occurrence of fumonisins in Brazilian corn kernels. *Food Addit Contam* 1996; 13:173-83.
80. Ono EYS. Microbiota fúngica, fumonisinas e efeitos da armazenagem em milho [Tese de Doutorado]. Londrina, Paraná: Universidade Estadual de Londrina, 1999. 137pp.
81. Machinski Jr M. Micotoxinas em cultivares de milho (*Zea mays* L.) e em produtos de milho: Avaliação da ocorrência e de fatores que contribuem para a produção no campo [Tese de Doutorado]. Campinas, São Paulo: Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, 2000.
82. Camargos SM, Valente Soares LM, Sawasaki E, Sordi G, Castro JL, Bortoletto N. Incidência de fumonisinas em cultivares de milho no Estado de São Paulo [Tese de Doutorado]. Campinas, São Paulo: Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP, 2000.
83. Ono EY, Ono MA, Funo FY, Medinal AE, Oliveira TC, Kawamura O et al. Evaluation of fumonisin-aflatoxin co-occurrence in Brazilian corn hybrids by ELISA. *Food Addit Contam* 2001; 18(8):719-29.
84. Ono EY, Fungaro MH, Sofia SH, Figueira EL, Gerage AC, Ichinoe M et al. Trends of fumonisin contamination and animal intoxication through monitoring 1991 to 1997 corn crop in the State of Parana, Brazil. *Mycopathologia* 2004; 158(4):451-5.

Reservas das sementes de sete espécies de *Theobroma*: revisão

Seed reserves from seven species of the genus *Theobroma*: a review

RIALA6/1010

Maria Helena MARTINI^{1*}; Débora de Queiroz TAVARES²

* Endereço para correspondência: ¹Seção de Bromatologia e Química, Instituto Adolfo Lutz, Laboratório Regional de Campinas, R. São Carlos, 720, Campinas/SP, CEP 13035-420, e-mail: mhmartini@ial.sp.gov.br

²Laboratório de Microestrutura de Alimentos, FEA/UNICAMP, SP, e-mail: debora@fea.unicamp.br.

Recebido: 07/12/2004 – Aceito para publicação: 30/06/2005.

RESUMO

Os estudos sobre as reservas das sementes do gênero *Theobroma* referem-se sobretudo de *T. cacao* L, até hoje a única fonte da matéria prima do chocolate. Essas pesquisas abordaram as mudanças bioquímicas ocorridas na semente durante a fermentação, secagem, torração ou seja das etapas de produção do chocolate. Mais recentes são os trabalhos com sementes de *T. grandiflorum* (cupuaçu), utilizadas na elaboração do cupulate, produto com algumas características do chocolate. Por esse motivo, os especialistas em *Theobroma* estão ampliando as análises com as reservas das sementes para as espécies *T. grandiflorum* (Willd. Ex Spreng.) Schum, *T. subincanum* Mart, *T. obovatum* Bern., *T. bicolor* H. & B., *T. microcarpum* Mart e *T. speciosum* Mart. Como o interesse é voltado à possibilidade de ampliar as fontes de chocolate, as características estudadas nesta revisão são comparadas com *T. cacao* L. O mesofilo cotiledonar é semelhante em todas as espécies aqui estudadas devido a predominância de reserva lipídica e protéica. As células do cotilédone imaturo demonstram capacidade para sintetizar todas as reservas; na maturidade demonstram predominância de reservas lipídicas, protéicas ou de mucilagem ou de polifenóis.

Palavras-chaves. semente, *Theobroma*, compostos de reserva da semente, cacau.

ABSTRACT

Many investigations on the cellular reserves within the cotyledon mesophyll of genus *Theobroma* have been carried out in *Theobroma cacao* seeds, which is the raw material source for chocolate production. These studies demonstrated the structural cellular changes due to fermentation, drying, and roasting processes during chocolate production. Recently, the seeds from *T. grandiflorum* (“cupuaçu”) have been analyzed owing to their importance in the production of “cupulate”, a new product similar to chocolate. The present work presents a review on lipid-protein, carbohydrate and polyphenolic reserves derived from *T. cacao*, *T. grandiflorum* (Willd. Ex Spreng.) Schum, *T. subincanum* Mart, *T. obovatum* Bern., *T. bicolor* H. & B., *T. microcarpum* Mart and *T. speciosum* Mart. Cotyledon mesophyll tissue is similar in all of the studied species with respect to lipid-protein reserve. Immature cotyledonary cells show a capacity to synthesize all the reserves, however in the mature stage, these cells demonstrate predominance of lipid-protein or mucilage, or polyphenolics reserves.

Key words. seeds, *Theobroma*, reserves in seeds, cacao.

SUMÁRIO

Introdução	11
1. O Gênero <i>Theobroma</i> , as seções e o comportamento recalcitrante de suas sementes	11
2. Cacau – <i>Theobroma cacao</i> L.	11
2.1. Fruto e semente do cacau	12
3. Cupuaçu – <i>Theobroma grandiflorum</i> (Willd. Ex Spreng.) Schum	12
3.1. Fruto e semente do cupuaçu	14
4. Cacau Tigre – <i>Theobroma bicolor</i> H. & B	14

4.1. Fruto e semente do cacau tigre	14
5. Espécies de <i>Theobroma</i> menos estudadas	14
5.1. Cupui – <i>Theobroma subincanum</i> Mart.	14
5.2. Cacaui – <i>Theobroma speciosum</i> Mart.	14
5.3. Cabeça de urubu – <i>Theobroma obovatum</i> Bern.	14
5.4. Cacau jacaré – <i>Theobroma microcarpum</i> Mart.	14
6. Compostos de reserva das sementes das sete espécies <i>Theobroma</i> (<i>T. grandiflorum</i> , <i>T. subincanum</i> , <i>T. obovatum</i> , <i>T. bicolor</i> , <i>T. microcarpum</i> , <i>T. speciosum</i> e <i>T. cacao</i>)	14
6.1. Lipídeos: síntese, composição e mobilização na germinação	14
6.2. Proteínas e síntese	16
6.3. Carboidratos	17
7. Estruturas secretoras em sementes	17
7.1. Compostos fenólicos	17
7.2. Mucilagem	17
7.3. Alcalóides	17
8. Considerações sobre a revisão	17
Referências	18

INTRODUÇÃO

As sementes de espécies do gênero *Theobroma* despertam continuado interesse. A semente de *Theobroma cacao* L. permanece como única fonte do que se padroniza como chocolate; *T. grandiflorum* (Willd. Ex Spreng.) Schum. (cupuaçu) está atingindo o mercado com o cupulate, um produto assemelhado ao chocolate porém com características muito distintas, por exemplo, o aroma. Na atualidade recrudescer o estudo sobre as gorduras, fonte de novos produtos para as indústrias de alimentos, cosméticos e farmacêuticas. Estão sendo indicadas como alternativas à gordura de cacau as gorduras de *T. speciosum* Mart., *T. sylvestre* e *T. bicolor* H. & B¹. Por outro lado a presença expressiva de polifenóis em *T. cacao* L., *T. bicolor* H. & B., *T. subincanum* Mart² e sua capacidade antioxidante já atraiu a indústria de chocolate postulando agregar valor nutricional e identidade ao produto¹. Os estudos sobre a estrutura de sementes de cacau e cupuaçu referem-se às transformações ocorridas durante a fermentação, secagem, torração e etapas de produção de chocolate e cupulate^{4,5,6,7,8}.

O objetivo da presente revisão é atualizar informações sobre as reservas cotiledonares de *T. grandiflorum*, *T. subincanum*, *T. bicolor*, *T. speciosum*, *T. obovatum* e *T. microcarpum* e abordar as diferenças com os cotilédones de *T. cacao*.

1. O GÊNERO *THEOBROMA*, AS SEÇÕES E O COMPORTAMENTO RECALCITRANTE DE SUAS SEMENTES

O gênero *Theobroma*, pertence à família Sterculiaceae e a ordem Malvales, apresenta vinte e duas espécies na América

Por exemplo, o chocolate escuro precisa conter no mínimo 3600µg de polifenóis/g e no máximo 8000µg/g de chocolate. Para o chocolate branco o padrão esperado é conter polifenóis entre o mínimo de 1000µg/g e o máximo de 5000µg/g de chocolate branco¹¹.

Tropical^{3,9}. Cuatrecasas¹⁰, com base nos aspectos vegetativos, morfologia dos frutos e hipótese evolutiva, classificou-as em seis seções. Essa revisão abordou sementes de cinco seções, ou seja, espécies da flora brasileira de interesse para o Comissão Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira (CEPLAC) e o Centro de Pesquisa Agroflorestal da Amazônia Oriental (CPATU). As seções abordadas e a indicação das espécies e origens estão apresentadas na Tabela 1.

Dentre as 22 espécies, o cultivo do cacau já é antigo e o mesmo foi incentivado para o *T. grandiflorum* (cupuaçu). A polpa do fruto é industrializada para produção de sucos, sorvetes e geléias; as sementes são submetidas ao mesmo processo do chocolate, obtendo-se o cupulate com características e sabor originais. A gordura de cupuaçu tem um perfil de ácidos graxos interessantes para o uso em indústria de alimentos e cosméticos^{1,12,13,14}.

Na maioria das espécies, o período de viabilidade das sementes aumenta à medida que a temperatura e umidade de armazenamento decrescem; este comportamento é denominado *ortodoxo*¹⁵. Por outro lado, existem sementes sensíveis ao dessecação, as sementes *recalcitrantes*, porque apresentam curto período de viabilidade e requerem alto teor de umidade a qual é o estímulo que exigem para a germinação. Portanto, não ocorre secagem natural da semente dentro do fruto e, por ausência de dormência, entram em germinação imediata^{15,16}. O comportamento recalcitrante, isto é aquele que exige condições de altas umidade e temperatura, é característico de sementes tropicais, ou seja, do gênero *Theobroma*^{16,17}.

2. CACAU - *THEOBROMA CACAO* L.

O cacaueiro talvez seja originário das bacias do Amazonas e Orinoco. Seu cultivo se estende da Colômbia para a Venezuela, América Central e México. Ao dispersar-se ao longo do rio Amazonas, alcança também as Guianas. Saindo das

Américas, a cultura foi introduzida na África nos países de Gana, Nigéria, Costa do Marfim, Camarões e Malásia. A África é responsável por cerca de 60% da produção mundial de cacau, enquanto a Costa do Marfim produz 41% deste total¹⁸. O Brasil é o quinto produtor, responsável apenas por 4% do total mundial. Hoje o cultivo do cacau ocorre em nove estados brasileiros, sendo 81% da produção nacional proveniente da Bahia¹⁹.

O cacau é classificado mundialmente sob três tipos: Criollo, Forastero e Trinitario, sendo que a maioria do cacau comercializado é tipo Forastero. O tipo Trinitario resulta da hibridização entre Forastero e Criollo. Trinitario e Criollo produzem chocolates de excelente qualidade, com sabor e aroma suaves⁹.

A variedade Criollo tem cotilédones brancos e produz um chocolate considerado de qualidade superior devido à coloração marrom brilhante, aroma e sabor peculiares. A cultura de Criollo abrange países da América Central, Venezuela, Colômbia, Equador e Peru¹⁹.

A variedade Forastero é a que detem 95% de toda produtividade mundial de cacau, porque é resistente às pragas e doenças. As sementes são achatadas em relação ao Criollo e ainda diferem pela coloração violeta intensa; produzem um chocolate com sabor mais ácido e adstringente. O Forastero ocorre na Bahia, Amazônia e países produtores da África⁹.

A variedade Trinitario produz sementes que variam de amarelo a roxo. O chocolate originado desta variedade é considerado de qualidade intermediária. É cultivado na Malásia e Indonésia⁹.

2.1. Fruto e semente do cacau

O fruto de cacau, com cerca de 20cm x 7,5cm (Figura 1 D e D₁), é alongado e apresenta sulcos longitudinais no pericarpo, o qual é duro e cor variando entre o amarelo ao vermelho²⁰. Contém 30 a 50 sementes, perfazendo 13,5 a 29% do peso do fruto⁸. As sementes medem 2 a 3cm de comprimento e são revestidas por polpa mucilaginosa (Figura 1D). A polpa é constituída por um parênquima de células esponjosas e mucilaginosas contendo água, frutose, glicose, sacarose, pentosanos, ácido cítrico, proteínas e vários sais inorgânicos^{3,9}. Ao abrir a semente, verifica-se que os cotilédones são amplos, foliáceos intensamente redobrados ao redor do eixo hipocótilo-radícula, o que é frequente na ordem Malvales²¹. Estes redobramentos estão demonstrados nas Figuras: 1 (A₁, B₁, C₁, D₁) e Figura 2 (E₁, F₁, G₁). As reservas dos cotilédones são de natureza protéica, lipídica, polifenólica e amilácea; a quantidade de reserva dependerá da localização das células na semente⁴.

3. CUPUAÇU – *THEOBROMA GRANDIFLORUM* (WILLD. EX SPRENG.) SCHUM.

O cupuaçuzeiro é nativo ao sul e sudeste do Pará, em parte do Maranhão e Tocantins. Atualmente está disseminado em quase toda Amazônia sendo uma das principais frutas de cultivo da região. Nos estados de São Paulo, Bahia e Rio de Janeiro encontram-se espécimens isolados. Seu cultivo ocorre

Tabela 1. Teor de lipídeos de sementes de espécies do gênero *Theobroma* demonstrado entre 1981 a 2002.

SEÇÃO/ESPÉCIE	ORIGEM	% de LIPÍDEO
Glossopetalum		
<i>T. grandiflorum</i>	Brasil	60,5 ¹² ; 56,7 ³⁰ ; 54,2 ²
	<i>desconhecida</i>	
<i>T. obovatum</i>	Brasil	64,0 ³⁰ ; 60,8 ³¹
<i>T. subincanum</i>	Brasil	48,8 ³⁰ ; 59,9 ²
Oreanthes		
<i>T. speciosum</i>	Costa Rica	25,8 ³⁰
Rhytidocarpus		
	Brasil	36,1 ¹² ; 34,1 ³³ ; 30,8 ²
<i>T. bicolor</i>	Costa Rica	27,0 ³³
	México	17,0 ³⁴
	Costa Rica	29,6 ³⁰
	Guatemala	25,5 ²⁷
	Peru	30,8 ²⁸
Telmatocarpus		
<i>T. microcarpum</i>	Brasil	5,3 ³⁰ ; 6,5 ³¹
Theobroma		
	Brasil	56,0 ¹² ; 54,5 ³⁰ ; 47,2 ^{31,2} 51,2 ^{7,8}
<i>T. cacao</i>	<i>desconhecida</i>	52,0 ³³
	México variedade Criollo	23,9 ³⁴
	Costa Rica	19,5 ³⁴
	Guatemala	42,8 ²⁷

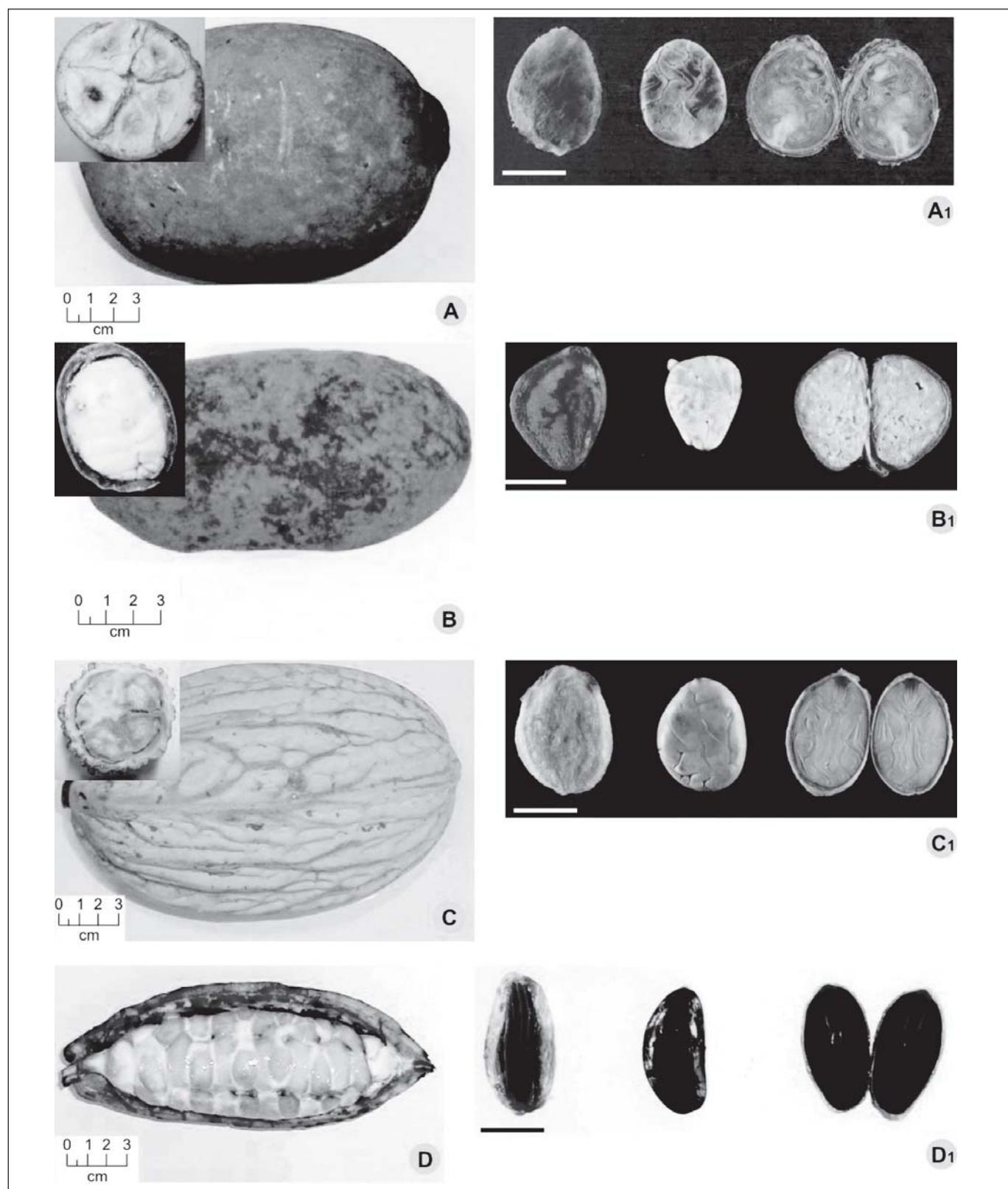


Figura 1*. Frutos (A, B, C, D) e respectivas sementes (A₁, B₁, C₁, D₁). *T. grandiflorum* (A e A₁). *T. subincanum* (B e B₁). *T. bicolor* (C e C₁). *T. cacao* (D e D₁). Os frutos demonstram forma e pesos diferentes. As sementes abertas mostram os cotilédones redobrados, característica do gênero. As variações de coloração dos cotilédones são frequentes; nos varietais de *T. cacao* as colorações vão do amarelo claro ao roxo escuro (D₁). (A₁, B₁, C₁, D₁: Barra = 10mm).

* Figura extraída da tese de doutorado da primeira autora defendida em 02/06/2004.

também na Venezuela, Equador, Costa Rica, Colômbia, Trinidad Tobago, Gana, Martinica, São Tomé, Flórida e Austrália²²⁻²⁴. A Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias (EMBRAPA), o Centro de Pesquisa Agroflorestal da Amazônia Oriental (CPATU) e Centro de Cooperação Internacional em Pesquisa Agronômica (CIRAD), França, estão incentivando o cultivo do cupuaçu em cooperativas²⁵.

O cupuaçu também apresenta variedades que são definidas em função do formato e peso do fruto, espessura da casca e presença ou ausência de sementes. As mais conhecidas são: *Cupuaçu-redondo*, *cupuaçu mamorana*, *cupuaçu mamau*²⁶.

3.1. Fruto e semente do cupuaçu

O fruto, elipsóide à subgloboso medindo 16cm x 11cm (Figura 1 A e A₁) é o maior do gênero *Theobroma*. A polpa é utilizada na indústria alimentícia para produção de sucos, sorvetes, geléias. Seu sabor é distinto do cacau sendo ácido com odor intenso e agradável^{1,20}.

Cada fruto contém 20 a 50 sementes (média 36). Os cotilédones, redondos e achatados, medem 2 a 4cm de largura (Figura 1A₁).

4. CACAU TIGRE – *THEOBROMA BICOLOR* H.& B.

Tem origem incerta, parecendo ser natural da América Central, onde é encontrado sob cultivo não extensivo desde o México até a Amazônia (região do Rio Negro). Na Guatemala ocorre sob forma silvestre. As sementes são utilizadas pela população rural, em substituição ao cacau, e sua polpa mucilagínosa usada para a produção de sucos²⁷. No Brasil a polpa é empregada como suco e as sementes são consumidas assadas^{1,12,20,28}.

4.1. Fruto e semente do cacau tigre

Fruto elipsóide a globoso, medindo cerca de 17cm x 13cm (Figura 1 C). O pericarpo é realçado por estruturas salientes, aparentando grossas veias reticuladas. Os cotilédones são esbranquiçados devido ao menor número de células polifenólicas^{2,29} (Figura 1 C₁).

5. ESPÉCIES DE *THEOBROMA* MENOS ESTUDADAS

5.1. Cupui - *Theobroma subincanum* Mart.: esta espécie é considerada a mais primitiva do gênero e sua distribuição natural ocorre por toda a bacia Amazônica, Venezuela e Guiana Francesa. Sua polpa é utilizada também no preparo de sucos. O fruto é elipsóide, medindo 15cm x 8cm (Figura 1 B). Sementes entre 2–2,5cm, apresentam polpa branco amarelada e sem odor¹⁰ (Figura 1 B₁).

5.2. Cacaui - *Theobroma speciosum* Mart.: a espécie ocorre ao

longo do rio Amazonas e seus afluentes. Não apresenta ainda valor comercial. Fruto globoso-elipsóide, medindo cerca de 10 cm de comprimento, contem até 20 sementes (Figura 2 E e E₁). Polpa esbranquiçada e sem odor²².

5.3. Cabeça de urubu - *Theobroma obovatum* Bern.: distribui-se pela região do Alto Amazonas, Acre, Mato-Grosso, Peru, Colômbia e Bolívia. Os frutos têm apenas 5 a 7cm e as sementes 16mm em seu maior eixo (Figura 2 F e F₁). A polpa das sementes é ácida e apreciada^{10,22}.

5.4. Cacau Jacaré - *Theobroma microcarpum* Mart. é considerada uma espécie rara e tida como exemplo de especiação causada pelo isolamento geográfico. Ocorre na parte ocidental da região amazônica¹. Os frutos são pequenos, possuindo em média de 10 a 12 sementes (Figura 2 G e G₁) e apresentam um dos mais baixos teores de gordura entre as demais espécies aqui em estudo, ou seja, entre 5% e 6%^{1,30,31}.

6. COMPOSTOS DE RESERVA DAS SEMENTES DAS SETE ESPÉCIES *THEOBROMA* (*T. grandiflorum*, *T. subincanum*, *T. obovatum*, *T. bicolor*, *T. microcarpum*, *T. speciosum* e *T. cacao*)

Sementes de *Theobroma* induzem a expectativa de predominância de reservas lípide-protéicas, essenciais a um primeiro processo de chocolateização. Entretanto, os polissacárides ácidos e neutros podem ser abundantes e em *T. microcarpum* parecem ter relação inversa com a quantidade de lípidos.

Quanto às proteínas nestas sete espécies, os corpos proteicos ocupam extensas áreas vacuolares nas células vivas³². Esta disposição é também evidente nas preparações microscópicas sob coloração de Naphtol Blue Black². Os lípidos destas espécies, quando observados em secções úmidas e sob frio ($\pm 5^{\circ}\text{C}$) revelam numerosos glóbulos com igual diâmetro revestindo uniformemente toda a face interna da membrana celular². Grânulos de amido são facilmente detectáveis embora sejam escassos na semente madura, à exceção de *T. microcarpum*^{2,31}. Muitos polissacárides, fortemente hidratados são perdidos na fase hidratada da preparação microscópica das sementes. Os polifenóis, entretanto, tendem a acumular-se em células específicas formando um grande e conspicuo vacúolo^{2,31}.

6.1. Lípideos: síntese, composição e mobilização na germinação

Os lípideos são a principal fonte de reserva das sementes da maioria das espécies do gênero *Theobroma* com valores acima de 60% em *T. grandiflorum* e *T. obovatum* (Tabela 1). Os triacilgliceróis (TAGs) e suas cadeias de carbono têm comprimentos e funcionalidades distintos. Gilbert-Escrivá et al.¹ analisaram os lípideos de: *T. cacao*, *T. grandiflorum*, *T. obovatum*, *T. subincanum*, *T. microcarpum* e *T. bicolor*. As

Tabelas extraídas de Gilbert-Escrivá et al.¹ contêm os principais TAGs de *T. grandiflorum*, *T. bicolor*, *T. subincanum* e *T. cacao* (Tabela 2). Os ácidos graxos (AG) predominantes estão na Tabela 3. A composição em TAGs de *T. cacao* é bastante distinta em relação as outras três espécies, o que confere as características da gordura desta espécie. Gilbert-Escrivá et al.¹ ao analisarem as curvas de cristalização das gorduras por Calorimetria Diferencial de Varredura, obtiveram um

comportamento semelhante para *T. bicolor* e *T. grandiflorum* os quais se distanciaram de *T. subincanum*. Atribuíram a fusão característica da gordura de *T. cacao* à sua composição em TAG, e aos seus comprimentos de cadeia dos ácidos graxos, os quais são mais uniformes em relação às outras três espécies. As gorduras de *T. grandiflorum* e *T. bicolor* apresentam maior maciez em relação à gordura de cacau e são indicadas para a indústria de margarinas e cosméticos^{12,33,34}. Silva³⁵ mostrou

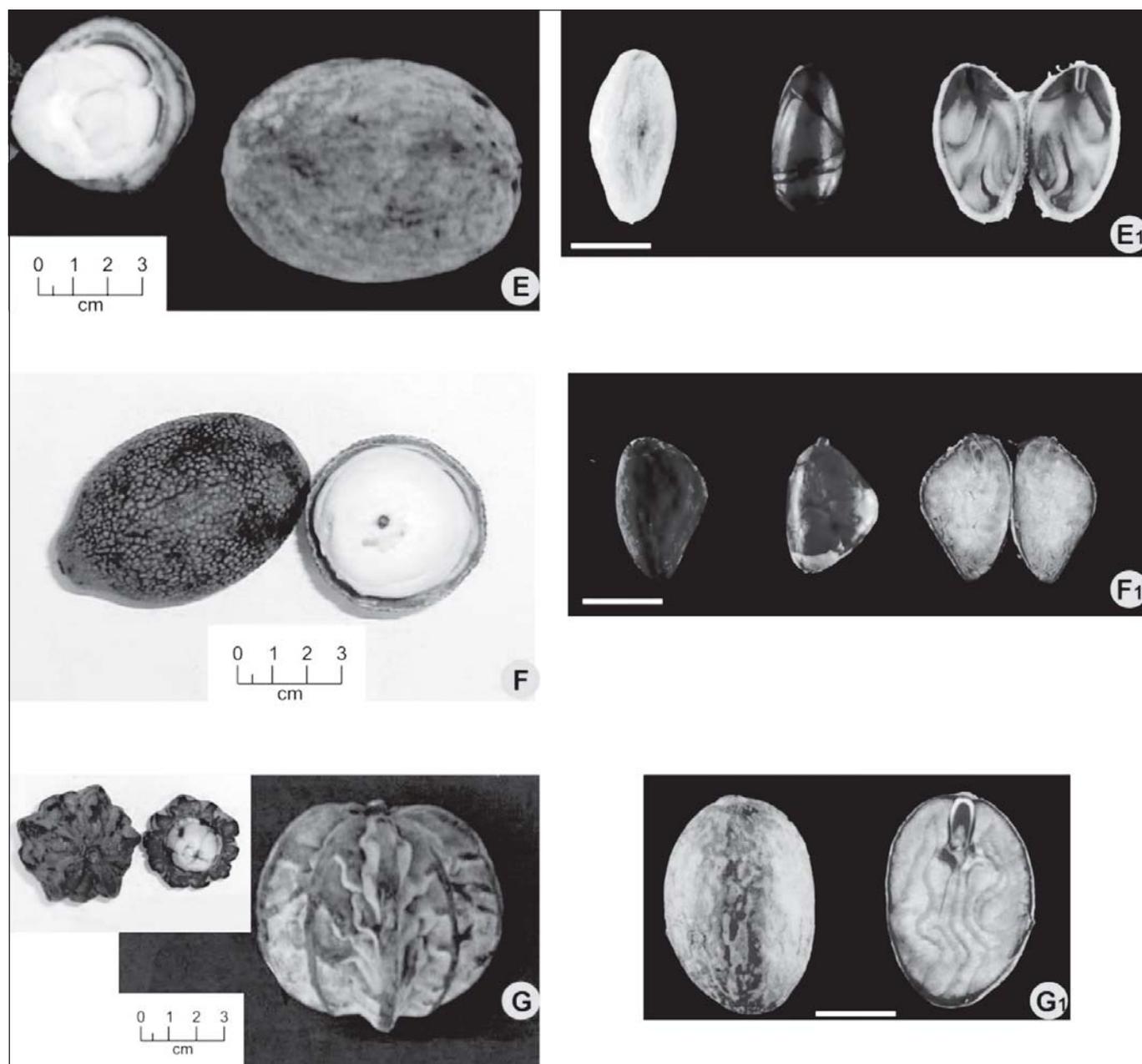


Figura 2*. Frutos (E, F, G) e respectivas sementes (E₁, F₁, G₁) de *T. speciosum* (E e E₁) . *T. obovatum* (F e F₁). *T. microcarpum* (G e G₁). O *T. speciosum* e *T. microcarpum* têm poucos redobramentos nos cotilédones, contrastando-se com *T. obovatum*, *T. grandiflorum* e *T. subincanum*, cujos redobramentos cotilédones são os mais numerosos dentre as sete espécies deste estudo. (E₁, F₁, G₁ : Barra = 10mm).

* Figura extraída da tese de doutorado da primeira autora defendida em 02/06/2004.

que o padrão de fusão da gordura de cacau foi preservado quando adicionou 10% de gordura de cupuaçu ou de sua estearina.

Durante o desenvolvimento das sementes de *T. cacao*, a síntese de TAGs é marcada por três estágios que ocorrem em um período de dois meses. O primeiro estágio se caracteriza por rápida divisão celular e pouco acúmulo de reservas. No segundo estágio ocorre rápida síntese de TAGs entre o 120° e 160° DAP; momento de estabelecimento do padrão dos ácidos graxos. O último estágio, ao redor do 170° DAP, dá início à fase de relativo dessecamento da semente³⁶.

O glóbulo lipídico, na maioria das sementes, apresenta-se circundado por uma camada de fosfolípidos originada da membrana do RE por vesiculação ou brotamento^{37,38}. Nas sementes tolerantes ao dessecamento, que predominam em climas temperados, os TAGs dos glóbulos lipídicos são sintetizados juntamente com uma classe de proteínas especializadas, as *oleosinas*, cujo peso molecular situa-se entre 15 a 24kDa. Essas proteínas conferem estabilidade ao glóbulo lipídico, inibindo sua coalescência durante períodos de desidratação e reidratação da semente^{15,37-40}. Existem glóbulos lipídicos que ao se desligarem do RE serão parcialmente cobertos pelas *oleosinas*, formando glóbulos lipídicos maiores. O diâmetro dos glóbulos lipídicos depende da taxa de *oleosina* durante sua formação. Nas sementes tolerantes ao dessecamento o tamanho varia entre 0,5- 2,0 μm ⁴⁰. Em sementes sensíveis ao dessecamento, geralmente de origem

tropical e subtropical, como cacau, e frutas ricas em óleo como azeitona e abacate, não se registram teores significativos de *oleosinas*⁴⁰. Durante a formação dos glóbulos ocorrem fusões até alcançarem diâmetros que variam entre 5 a 30 μm ^{37,38,41}. A mobilização dos glóbulos lipídicos ocorre na primeira semana de germinação, iniciando-se pela mobilização das lipases. Murphy⁴⁰ sugere que as *oleosinas* estando na superfície do glóbulo agiriam como receptoras das lipases. A atividade hidrolítica das lipases ocorre, também, nas sementes desprovidas de *oleosinas* porque as plantas não transportam lipídeos neutros ou membranas lipídicas, mas convertem-nas à sacarose ou outro intermediário solúvel para o transporte intercelular e/ou vascular⁴¹. Após a mobilização dos glóbulos lipídicos, ocorre a liberação de grande quantidade de ácidos graxos, os quais são disponibilizados para ceder energia via β -oxidação nos glioxissomas.

Os glóbulos lipídicos, dos cotilédones maduros destas sete espécies abordadas, eram maiores (7 μm)^{2,31} em relação às várias sementes tolerantes ao dessecamento, 2,0 μm em café¹⁵. Leprince et al.¹⁵ não detectaram *oleosinas* nos glóbulos lipídicos em sementes de cacau, mas observaram que os glóbulos lipídicos das sementes tropicais e subtropicais podem permanecer estáveis, apesar da ausência de *oleosinas*, durante uma desidratação artificial, mas a seguir fundem-se imediatamente se for efetuada uma reidratação. Recentemente Guilloteau et al.⁴² isolaram cinco polipeptídeos de sementes de *T. cacao* com pesos moleculares (16,1 a 26,5 kDa) semelhantes aos de *oleosinas*. Guilloteau et al.⁴² atribuem à natureza recalcitrante das sementes de cacau um segundo fator, isto é, à alta concentração da proteinase aspártica. Essa enzima, nas sementes maduras do *T. cacao*, atinge seu ponto máximo de hidrólise durante o processo de fermentação.

Tabela 2. Principais triglicérides (g/100g) de gorduras, de sementes de espécies de *Theobroma*, obtidos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

Espécies	TAG				
	POS	SOS	POP	SOO	SOA
<i>T. grandiflorum</i>	12,0	31,4	1,1	16,1	18,1
<i>T. subincanum</i>	–	27,4	1,1	21,0	14,5
<i>T. bicolor</i>	16,5	52,2	1,4	17,9	4,4
<i>T. cacao</i>	42,3	26,4	20,8	0,9	2,0

S = esteárico; P = palmítico; O = oléico; A = araquídico. Fonte: Gilabert-Escrivá et al.¹

Tabela 3. Principais ácidos graxos de sementes de espécies de *Theobroma* expressa em porcentagem molar.

Espécies	AG			
	C 16:0	C 18:0	C 18:1	C 20:0
	Palmítico	Esteárico	Oléico	Araquídico
<i>T. grandiflorum</i>	8,5	34,6	42,0	9,9
<i>T. subincanum</i>	6,8	31,8	45,6	–
<i>T. bicolor</i>	8,1	47,8	41,0	–
<i>T. cacao</i>	30,6	33,9	31,4	–

Fonte: Gilabert-Escrivá et al.¹

6.2. Proteínas e síntese

A proteólise das proteínas de reserva marca o estágio de germinação da semente^{43,44}. A síntese das proteínas ocorre no retículo endoplasmático rugoso (RER) e formam corpos protéicos^{32,45}, que serão seqüestrados por autofagia grandes vacúolos de reserva protéica⁴⁶. As proteínas das sementes de *T. cacao* seguem o padrão das dicotiledôneas, isto é, tem 52% de albuminas com peso molecular igual a 19kD. Seguem-se 43% de globulinas do tipo vicilinas, cujas frações polipeptídicas têm pesos moleculares 47 kDa, 31 kDa e 14,5 kDa^{47,48}. Uma fração importante para a formação do sabor e aroma do cacau é atribuída aos peptídeos originados da digestão proteolítica das vicilinas durante a etapa de fermentação do cacau. É importante lembrar que sementes que contêm vicilinas contêm também leguminas ou apenas leguminas. O *T. cacao* é uma exceção, suas globulinas contêm apenas vicilinas⁴⁰.

Um estudo do perfil de proteínas totais das sementes de *Theobroma: cacao, grandiflorum, bicolor, microcarpum, subincanum, obovatum* e *sylvestre*⁴⁹ sugeriu a presença de um inibidor de tripsina (21 kDa), com limitado polimorfismo. Esses autores demonstraram também vicilinas com 31 kDa e 47 kDa e estas, por sua vez, expressavam grande polimorfismo^{20,49}. Para

T. cacao, *T. grandiflorum* e *T. bicolor*, Mueller et al.²⁹ já haviam encontrado dois tipos de vicilinas ($46,5 \pm 1$ kDa e $30,3 \pm 2$ kDa), onde as vicilinas de 30 kDa representavam 15% do total de proteínas destas três espécies.

6.3. Carboidratos

Os carboidratos do material de reserva, isto é, mucilagem e grãos de amido são vicinais às outras substâncias de reserva. A porcentagem de amido encontrado em sementes de *T. cacao* provenientes de 7 diferentes regiões, inclusive do Brasil (Bahia), variou entre 4,5 a 7,0% e o conteúdo de amilose representou 36% dos amidos⁵⁰. Os carboidratos que constituem a parede celular de *T. cacao* pertencem a três grupos: mananos, galactoglucomanos e xiloglucanos⁵¹. Nessa espécie estes autores demonstraram (60%) polissacarídeos pécicos, (28%) celulose, (8%) xiloglucanos e (3%) galactoglicomananos⁵¹.

7. ESTRUTURAS SECRETORAS EM SEMENTES

7.1. Compostos Fenólicos

Os polifenóis causam forte impacto sobre o sabor do chocolate, mas são compostos comuns para a maioria dos vegetais superiores. Estão localizados no interior de idioblastos da epiderme e subepiderme de folhas, raízes e sementes^{52,53,54}. Os polifenóis são derivados do metabolismo da glicose, vias acetato e shikimato⁵⁵.

Zaprometov⁵⁶, revisando o desempenho funcional dos polifenóis confirmou a participação destes na agregação de polissacarídeos complexos na parede celular primária e na formação da suberina e cutina. Contribui também para a proteção do aparato fotossintético e genético contra radiações UV. A intrínseca reatividade dos polifenóis facilita-lhes atuar no metabolismo intracelular agindo como substância redutora ou sinalizadora na inter-relação planta-microorganismo.

Bravo⁵⁵ considera que existem acima de 8000 estruturas fenólicas nas plantas. Recentemente Wollgast e Anklam¹¹ revisaram os polifenóis de *T. cacao*; os autores apontaram acima de 20 propriedades protetoras à saúde humana, das quais muitas envolvem ações anti-oxidantes. Os polifenóis, localizados no mesofilo cotiledonar de *T. cacao*, representam 12 a 20% da massa das sementes de cacau secas e desengorduradas^{31,57}. Os polifenóis estão presentes em *T. grandiflorum*, *T. bicolor*, *T. obovatum*, *T. speciosum*, *T. Microcarpum*².

7.2. Mucilagem

Mucilagens são polímeros complexos de polissacarídeos ácidos ou neutros, de alto peso molecular contendo mais de 30.000 unidades de monossacarídeos diferentes, solúveis em água e comuns às plantas superiores^{52,58}. A função fisiológica da mucilagem na maioria

dos casos é incerta; podem ser substâncias de reserva ou contribuir para o balanço hídrico e/ou resistência ao dessecamento⁵⁹. A pectina, polissacarídeo ácido, é o principal componente da mucilagem⁶⁰. À microscopia óptica, a mucilagem permanece hialina ou forma estrias típicas deste material^{61,62}. É característico nas Malvales a presença de células e, até mesmo, cavidades contendo predominantemente mucilagem^{62,63,64}. Na realidade, já foi demonstrado que numerosas estruturas participam da secreção de mucilagem: idioblastos, cavidades, ductos, superfícies epidérmicas em muitas espécies e inclusive nas Sterculiaceae ocorrem cavidades lisígenas preenchidas com mucilagem na raiz, caule, flores e folhas^{52,65,66}.

7.3. Alcalóides

Os alcalóides teobromina, teofilina e cafeína pertencem ao grupo das purinas e embora sejam amplamente conhecidos, a presença destes é limitada à cerca de 20% das espécies vegetais. Existem duas hipóteses sobre a função das altas concentrações de alcalóides nestas espécies vegetais: a hipótese de defesa química propõe um papel protetor contra a predação; outra hipótese sugere que os alcalóides das sementes são liberados no solo para inibir a germinação de outras sementes⁶⁷. Hammerstone et al.⁶⁸, estudando onze espécies de *Theobroma*, encontraram alcalóides do grupo das purinas, cafeína e teobromina, porém em níveis detectáveis somente para *T. cacao*. Em todas as espécies encontraram o tetrametilurato, com exceção de *T. obovatum* que não apresentou alcalóides. Buchelli et al.⁶⁹ determinaram em, *T. cacao*, a variação de concentração destes alcalóides durante a maturação da semente e observaram aumento da concentração de teobromina a partir do 125º dias após polinização (DAP), estendendo-se até o final da maturação (175º DAP). Em relação à cafeína os mesmos autores evidenciaram o início da deposição a partir do 146º DAP até a maturidade.

8. CONSIDERAÇÕES SOBRE A REVISÃO

Há evidências na literatura e as presentes autoras confirmam que os frutos de *Theobroma* e respectivas sementes apresentam amplo polimorfismo. Em *T. cacao*, espécie mais estudada, o polimorfismo ocorre entre suas variedades, por exemplo, quanto à dimensão do fruto, às características morfológicas destes, quanto às suas sementes, e quanto ao tipo e quantidade dos elementos de reserva. Esse fato confere diversidade aos chocolates originados dos tipos criollo, forastero e trinitario. Os trabalhos realizados com sementes de *T. cacao* estão, em sua maioria, direcionados para as fases do processamento do chocolate. As pesquisas que caracterizaram a morfologia das sementes de *Theobroma* referem-se sobretudo à *T. cacao*.

Esta revisão bibliográfica apresenta e analisa as reservas cotiledonares de sete espécies de *Theobroma*. Estão ocorrendo pesquisas nacionais em vários centros e caracterizam-se por:

1. Detalhar as gorduras de *Theobroma*, almejando aplicações tecnológicas¹.
2. Explicar a filogenia do gênero *Theobroma*⁴⁹.
3. Apresentar propostas de tratamento para a fase de fermentação, secagem e torração de *T. cacao* visando aprimoramento do sabor⁷.
4. Estudar as reservas cotiledonares quanto à gênese e à sua distribuição nas células^{2,31}.

Essas contribuições morfológicas da última década são em realidade atualizações dos trabalhos pioneiros de Biehl e sua equipe da década de 1980. Nesta revisão foram abordados as mais recentes informações sobre a síntese de lípides devido à importância de suas gorduras do *Theobroma*. A síntese das proteínas foram estudadas por Voigt et al.⁴⁸ e Müller et al.²⁹ em *T. cacao*, *T. grandiflorum* e *T. bicolor*. Os polifenóis e a mucilagem foram abordados devido à importância funcional que exercem tanto na torração e chocolateização das amendoas de *T. cacao*^{2,31}.

REFERÊNCIAS

1. Gilibert- Escrivá MV, Gonçalves LAG, Silva LRS, Figueira A. Fatty acid and triacylglycerol composition and thermal behaviour of fats from seeds of Brazilian Amazonian *Theobroma* species. *J Sci Food Agric* 2002; 82(13): 1425-31.
2. Martini MH. Caracterização das sementes de seis espécies de *Theobroma* em relação ao *Theobroma cacao* L. [Tese de Doutorado]. Campinas, São Paulo: Universidade Estadual de Campinas, 2004. 86 pp.
3. Aragão CG. Mudanças físicas e químicas da semente de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum) durante o processo fermentativo [Dissertação de Mestrado]. Manaus, Amazonas: Universidade do Amazonas, 1992, 115 pp.
4. Biehl B, Passern U, Passern D. Subcellular structures in fermenting cocoa beans. Effect of aeration and temperature during seed and fragment incubation. *J Sci Food Agric* 1977; 28: 41-52.
5. Biehl B, Passern D, Sagemann W. Effect of Acetic Acid on Subcellular Structures of Cocoa Bean Cotyledons. *J Sci Food Agric* 1982a; 33: 1101-09.
6. Biehl B, Heinrichs H, Berghausen HZ, Srivastava S, Xiong Q, Passern, D et al. The proteases of ungerminated cocoa seeds and their role in the fermentation process. *Angew Bot* 1993; 67: 59-65.
7. Brito ES. Estudo de mudanças estruturais e químicas produzidas durante a fermentação, secagem e torração do cacau (*Theobroma cacao* L.); e propostas de tratamentos para o melhoramento do sabor. [Tese de Doutorado]. Campinas, São Paulo: Universidade Estadual de Campinas, 2000. 134p.
8. Mattietto RA. Estudo comparativo das transformações estruturais e físico-químicas durante o processo fermentativo de amêndoas de cacau (*Theobroma cacao* L) e cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum) [Dissertação de Mestrado]. Campinas, São Paulo: Universidade Estadual de Campinas, 2001. 163pp.
9. Bckett ST. Industrial Chocolate Manufacture and Use. 2nd ed. St. Paul Suffolk: St. Edmundsbury Press Ltda., 1997.
10. Cuatrecasas J. Cacao and its allies: a taxonomic revision of the genus *Theobroma*. Contributions from the United State National Herbarium 1964; Washington (DC); 35: 379-614.
11. Wollgast J, Anklam E. Review on polyphenols in *Theobroma cacao*: changes in composition during the manufacture of chocolate and methodology for identification and quantification. *Food Res Inter* 2000; 33: 423- 47.
12. Berbert PRF. Determinação do teor, ácidos graxos e características físicas das gorduras das sementes do *Theobroma grandiflora* L. e do *Theobroma bicolor* L. e comparação com a gordura do *Theobroma cacao* L. *Rev Theobroma* 1981; 11(2): 91-8.
13. Jee MH. Composition of the fat extracted from the seeds of *Theobroma bicolor*. *J Am Oil Chem Soc* 1984; 61: 751-3.
14. Nazaré RFR, Barbosa WC, Viégas RMF. Processamento das sementes de cupuaçu para obtenção de cupulate. Belém (PA): EMBRAPA-CPATU, 1990.
15. Leprince O, Van Aelst AC, Pritchard HW, Murphy DJ. Oleosins prevent oil-body coalescence during seed imbibition as suggested by a low temperature scanning electron microscope study of desiccation-tolerant and sensitive oilseeds. *Planta* 1998; 204:109-19.
16. Pammenter NW, Berjak P. Evolutionary and ecological of recalcitrant seed biology. *Seed Sci Res* 2000; 10: 301-6.
17. Mumford PM, Brett AC. Conservation of cacao seed. *Trop Agric* 1982; 59 (4): 306-10.
18. CEPLAC. Comissão Executiva do Plano de Lavoura Cacaueira: Cacau informações de mercado. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasil Disponível em <http://www.ceplac.gov.br/>. 2003.
19. Melo GRP. Características qualitativas de importância na gordura da amêndoa em nove híbridos de cacaueiro (*Theobroma cacao* L.) [Dissertação de Mestrado]. Lavras, Minas Gerais: Universidade Federal de Lavras, 1996. 41pp.
20. Silva CRS. Filogenia do gênero *Theobroma* utilizando marcadores moleculares e bioquímicos [Dissertação de Mestrado]. Piracicaba, São Paulo: Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo 2000. 139 pp.
21. Barroso GM, Morim MP, Peixoto AL, Ichaso CLF. Frutos e Sementes: morfologia aplicada à sistemática de dicotiledôneas. Viçosa (MG): Ed.UFV; 1999.
22. Cavalcante PB. Frutas comestíveis da Amazônia. 5th ed. Belém (PA): Ed. CEJUP; 1991.
23. Vasconcelos MAM. Transformações físicas e químicas durante a fermentação de amêndoas do cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* Schum) [Dissertação de Mestrado]. Campinas, São Paulo: Universidade Estadual de Campinas, 1999. 114 pp.
24. Venturieri GA. Base de dados do cupuaçu. Disponível na Internet: <http://www.ufpa.br/centros/ccb/citogenetica/cupu/>. 1999.
25. Sautier D, Silvestre A. Recherche-developpement-formation pour la valorisation économique et technologique des produits agricoles amazoniens dans l'état du Para (Bresil). Montpellier: CIRAD-SAR/ EMBRAPA-CPATU, Rapport d'activites 1995.
26. Müller CH. EMBRAPA, EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA- Centro de pesquisa agroflorestal da Amazônia oriental-CPATU. A cultura do cupuaçu, Coleção Plantar. Brasília, 1995.
27. Furlán AL, Bressani R. Recursos vegetales com potencial de explotación agrindustrial de Guatemala. Caracterización química de la pulpa y la semilla de *Theobroma bicolor*. *Arch Latin Nutr* 1999; 49: 373-8.
28. Torres DEG, Mancini DAP, Torres RP, Mancini-Filho J. Antioxidant activity of macambo (*Theobroma bicolor* L.) extracts. *Euro J Lip Sci Technol* 2002; 104: 278-81.
29. Müller S, Rohsius C, Reisdorff C, Gasparotto L, Lieberei R. Anatomical and physiological characteristics of *Theobroma spec.* seeds and their relevance to processing. Proceedings of the 13 th International cocoa research conference, Kota Kinabalu (Malasia), 2000.
30. Carpenter DR, Hammerstone JF, Romanczyk LJ, Aitken WM. Lipid composition of *Herrania* and *Theobroma* seeds. *J Am Oil Chem Soc* 1994; 71(8): 845-51.
31. Lenci CG. Caracterização estrutural e química do tecido de reserva das sementes de *Theobroma cacao*, *Theobroma obovatum* e *Theobroma microcarpum*. [Dissertação de Mestrado]. Campinas, São Paulo: Universidade Estadual de Campinas, 2002. 101 pp.

32. Bewley JD, Black M. Seeds: physiology of development and germination. 2nd ed. New York (NY): Plenum Press; 1994.
33. Chaiseri S., Arruda D.H., Dimick PS, Enriquez GA. Thermal characteristics and composition of fats from *Theobroma* Species. Turrialba 1989; 39(4): 468-72.
34. Sotelo A, Alvarez RG. Chemical composition of wild *Theobroma* species and their comparison to the cacao bean. J Agric Food Chem 1991; 39:1940-3.
35. Silva WG. Gordura de cupuaçu - sucedâneo de manteiga de cacau [Tese de Doutorado]. São Paulo, São Paulo: Universidade de São Paulo, 1988, 124pp.
36. Griffiths G, Harwood JL. The regulation of triacylglycerol biosynthesis in cocoa (*Theobroma cacao*)L. Planta 1991; 184: 279-84.
37. Huang AHC, Tzen JTC, Lee K, Bih FY, Ting JTL, Ratnayake C. Structure and ontogeny of seed oil bodies in maize and others species. In: Shewry, PR., Stobart K. (Ed). Seed storage compounds: biosynthesis, interactions, and manipulation. Oxford: Clarendon Press; 1993. p.115-27.
38. Murphy DJ, Vance J. Mechanisms of lipid-body formation. Trends Bioch Sci 1999; 24(3): 109-15.
39. Huang AHC. Oleosins and oil bodies in seeds and other organs. Plant Physiol 1996; 110: 1055-61.
40. Murphy DJ. The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plant and microorganisms. Progress Lip Res 2001; 40: 325-438.
41. Lea PJ, Leegood RC. Plant biochemistry and molecular biology. 2nd ed. Chichester (England): Wiley; 1999.
42. Guilloteau M, Laloi M, Blais D, Crouzillat D, Mc Carthy J. Oil bodies in *Theobroma cacao* seeds: cloning and characterization of cDNA encoding the 15,8 and 16,9 kDa oleosins. Plant Sci 2003; 164: 597-606.
43. Biehl B, Passern D. Proteolysis during fermentation-like incubation of cocoa seeds. J Sci Food Agric 1982 b; 33, 1280-90.
44. Marcone MF. Biochemical and biophysical properties of plant storage proteins: a current understanding with emphasis on 11S seed globulins. Food Res Inter 1999; 32: 79-92.
45. Werker E. Seed anatomy. Stuttgart: Bomtraeger; 1997.
46. Herman EM, Larkins BA. Protein storage bodies and vacuoles. Plant Cell 1999; 11: 601-13.
47. Biehl B, Wewetzer C, Passern D. Vacuolar (storage) proteins of cocoa seeds and their degradation during germination and fermentation. J Sci Food Agric 1982c; 33: 1291-304.
48. Voigt J, Biehl B, Kamaruddin S, WAZIR S. The major seed proteins of *Theobroma cacao* L. Food Chem. 1993; 47: 145-51.
49. Silva CRS, Figueira AVO, Souza ECAS. Diversidade no gênero *Theobroma*. In: Dias LAS. Melhoramento genético do cacau. Goiás: FUNAPE- UPG; 2001. p. 49-80.
50. Schmieder RL, Keeney PG. Characterization and quantification of starch in cocoa beans and chocolate products. J Food Sci 1980; 45: 555-63.
51. Redgwell RJ, Hansen CE. Isolation and characterization of cell wall polysaccharides from cocoa (*Theobroma cacao* L.) beans. Planta 2000; 210: 823-30.
52. Castro MM, Machado SR. Células e tecidos secretores. In: Appezzato-da-Goria B, Carmello-Guerreiro SM. Anatomia Vegetal. Viçosa (MG): Ed. UFV; 2003.
53. Hutzler P, Fischbach R, Heller W, Jungblut TP, Reuber S, Schmitz R, Veit M et al. Tissue localization of phenolic compounds in plants by confocal laser scanning microscopy. J Exp Bot 1998; 49: 953-65.
54. Zobel AM, Kuras M, Tykarska T. Cytoplasmic and apoplasmic location of phenolic compounds in the covering tissue of the *Brassica napus* radicle between embryogenesis and germination. Ann Bot 1989; 64: 149-7.
55. Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. Nutrition Reviews 1998; 56: 317-33.
56. Zaprometov MN. On the functional role of phenolic compounds in plants. Sov Plant Physiol 1992; 39:802-9.
57. Kim H, Keeney PG. Epicatechin content in fermented and unfermented cocoa beans. J Food Sci 1984; 49: 1090-2.
58. Medina-Torres L, Brito-De La Fuente E, Torrestiana-Sanchez B, Kattahain R. Rheological properties of the mucilage gum *Opuntia ficus indica*. Food Hydrocolloids 2000; 14: 417-24.
59. Distelbarth H, Kull U. Physiological investigations of leaf mucilages II. The mucilage of *Taxus baccata* L. and of *Thuja occidentalis* L. Israel J Bot 1985; 34: 113-28.
60. Western TL, Skinner DJ, Haughin GW. Plant Physiol 2000; 122: 345-55.
61. Baas P, Gregory M. A survey of oil cells in the dicotyledons with comments on their replacement by and joint occurrence with mucilage cells. Israel J Bot 1985; 34:167-86.
62. Martini MH, Lenci CG, Tavares DQ. Mucilage pockets in cotiledon tissue of *theobroma speciosum*. Acta Microscopica 2003; 1(1):65-9. Disponível em: < <http://www.sbm.org.br/actar/html/trabalhos/12.pdf> >.
63. Gregory M, Baas P. A survey of mucilage cells in vegetative organs of the dicotyledons. Israel J Bot 1989; 38: 125-74.
64. Metcalfe CR, Chalk L. Anatomy of the dycotyledons. Oxford, Clarendon Press; 1989. p.223-34 citado por Bakker ME., Gerritsen AF. The development of mucilage cells in *Hibiscus schizopetalus*. Acta Bot. Neerl 1992; 41: 31-42.
65. Brooks ER, Guard AT. Vegetative anatomy of *Theobroma cacao*. Bot Gaz 1952; 113: 444- 54.
66. Figueira A, Janick J, Bemiller JN. Partial characterization of cacao pod and stem gums. Carbohydrate Polymers 1994; 24: 133-8.
67. Ashihara H, Crozier A. Caffeine: a well known but little mentioned compound in plant science. Trends Plant Sci. 2001; 6(9): 407- 13, citado por LENCI CG. Caracterização estrutural e química do tecido de reserva das sementes de *Theobroma cacao*, *Theobroma obovatum* e *Theobroma microcarpum* [Dissertação de Mestrado].Campinas, São Paulo: Universidade Estadual de Campinas, 2002. 101 pp.
68. Hammerstone JF Jr, Romanczyk LJ, Aitken WM. Purine alkaloid distribution within *Herrania* and *Theobroma*. Phytochemistry 1994; 35: 1237- 40.
69. Bucheli P, Rousseau G, Alvarez M, Laloi M, McCarthy J. Developmental variation of sugars, carboxylic acids, purine alkaloids, fatty acids, and endoproteinase activity during maturation of *Theobroma cacao* L. seeds. J Sci Food Agric 2001; 49 (10): 5046-51.

Aplicabilidade de Petrifilm® na enumeração de bactérias e fungos em drogas vegetais

Use of Petrifilm® for bacteria and fungi counting in herbal drugs

RIALA6/1011

Adriana BUGNO^{1*}, Adriana A. B. ALMODOVAR¹, Tatiana C. PEREIRA¹, Terezinha de Jesus A. PINTO²

* Endereço para correspondência: ¹Instituto Adolfo Lutz, Seção de Controle de Esterilidade, Av. Dr. Arnaldo, 355, CEP 01246-902, São Paulo/SP e-mail: adrbugno@ial.sp.gov.br;

² Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Recebido: 22/11/2004 – Aceito para publicação: 04/05/2005

RESUMO

Técnicas alternativas aos métodos de plaqueamento em ágar para enumeração de bactérias e fungos têm sido desenvolvidas, buscando-se rapidez e simplicidade, mas sem comprometimento da sensibilidade e exatidão. O objetivo deste estudo foi investigar a eficácia e aplicabilidade de Petrifilm® AC para a enumeração de bactérias e de Petrifilm® YM para enumeração de bolores e leveduras em 90 amostras de drogas vegetais, comparando-se as contagens obtidas com a utilização dos sistemas Petrifilm® com àquelas obtidas com as técnicas de semeadura em profundidade em meios de cultura. Os coeficientes de correlação obtidos foram 0,9833 e 0,9231 para as contagens de bactérias e fungos, respectivamente. As contagens obtidas não mostraram diferenças significativas entre os métodos empregados. Os resultados sugerem a aplicabilidade do sistema Petrifilm® como alternativa ao método convencional de plaqueamento.

Palavras-Chave. qualidade dos medicamentos, contaminação de medicamentos, plantas medicinais, métodos microbiológicos, Petrifilm®, plaqueamento.

ABSTRACTS

Alternative techniques to agar plating methods for enumerating of bacteria and fungi counting have been developed, in order to get faster and simpler techniques without producing any effect on analytical sensibility and precision. The objective of the present study was evaluate the performance of Petrifilm® AC for enumeration of bacteria and of Petrifilm® YM for enumeration of yeasts and molds in ninety samples of herbal drugs, by comparing the enumeration obtained from both Petrifilm® systems, and that one achieved from conventional agar plating methods. Correlation coefficients of 0,9833 and 0,9231 were observed for enumeration of bacteria and fungi respectively. The results suggest that Petrifilm® is suitable as an alternative technique to conventional methods for microorganisms counting.

Key Words. drug quality, drug contamination, medicinal plants, microbiological methods, Petrifilm®, plating.

INTRODUÇÃO

Os métodos de plaqueamento em ágar para enumeração de bactérias e fungos têm sido tradicionalmente utilizados na avaliação microbiológica da qualidade de produtos farmacêuticos, no entanto, técnicas alternativas têm sido desenvolvidas, buscando-se rapidez e simplicidade, sem comprometimento da sensibilidade e exatidão. Entre as novas tecnologias desenvolvidas para enumeração de microrganismos, o sistema Petrifilm® tem ganho aceitação como alternativa aos métodos convencionais de plaqueamento em meio de cultura, pela facilidade, simplicidade e maior facilidade em evidenciar o crescimento microbiano. Consiste

em sistema pronto de meio de cultura, composto por um cartão coberto com ágar nutriente suplementado ou não com antibióticos e um filme plástico que protege o meio antes da inoculação e a amostra após a inoculação. O sistema incorpora um agente gelificante solúvel em água fria e indicador de tetrazólio para facilitar a visualização e enumeração de colônias.

Embora pouco utilizados na área farmacêutica, são vários os estudos comparativos entre os sistemas Petrifilm® e os métodos convencionais para enumeração de microrganismos aeróbios, coliformes e *Staphylococcus aureus* em produtos alimentícios, sendo metodologia oficializada para a avaliação de contaminação microbiana em várias matrizes de alimentos

pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) e a *American Public Health Association* (APHA)¹.

O objetivo deste estudo foi avaliar a aplicabilidade de Petrifilm® AC e de Petrifilm® YM como alternativas aos métodos convencionais de semeadura em profundidade em meios de cultura para enumeração de bactérias e fungos em amostras de drogas vegetais.

MATERIAIS E MÉTODOS

Desenho experimental

O estudo foi realizado como comparação pareada entre os dois métodos de enumeração, sendo que o

método de plaqueamento em profundidade utilizando Agar caseína de soja e Agar Sabouraud com cloranfenicol (0,5%) para enumeração de bactérias e fungos, respectivamente, foi referência na avaliação do Petrifilm® AC e Petrifilm® YM.

Todos os ensaios foram executados em triplicata.

Amostras

Foram avaliadas 90 amostras de drogas vegetais compostas por 64 espécies vegetais, adquiridas em estabelecimentos comerciais, conforme abaixo indicado. Em alguns casos, foram avaliadas amostras de mais de um fornecedor, sendo que o número de amostras analisadas aparece indicado entre parênteses:

Nome da Planta	Nome Científico	Nome da Planta	Nome Científico
Abutua	<i>Chondrodendron platyphylum</i>	Funcho	<i>Foeniculum vulgare</i>
Agoniada	<i>Plumeria lancifolia</i>	Ginkgo biloba (4)	<i>Ginkgo biloba</i>
Alcachofra (3)	<i>Cynara scolymus</i>	Guaraná (3)	<i>Paulinia cupana</i>
Alfazema (2)	<i>Lavandula officinallis</i>	Hipérico	<i>Hypericum perforatum</i>
Alteia	<i>Althaea officinalis</i>	Hissopo	<i>Hyssopus officinalis</i>
Angélica	<i>Angelica archangelica</i>	Ipê roxo	<i>Tabebuia avellanadae</i>
Aquiléia	<i>Achillea millefolium</i>	Jaborandi	<i>Pilocarpus jaborandi</i>
Bardana	<i>Arctium lappa</i>	Jalapa (2)	<i>Operculina sp</i>
Boldo do Chile (2)	<i>Peumus boldus</i>	Jasmim	<i>Jasminum officinale</i>
Calumba	<i>Jatrorrhiza palmata</i>	Jurubeba	<i>Solanum paniculatum</i>
Camédrio	<i>Teucrium chamaedrys</i>	Losna	<i>Artemisia absinthium</i>
Camomila (3)	<i>Matricaria recutita</i>	Macela	<i>Achyrocline satpureoides</i>
Capim cidrão	<i>Cymbopogon citratus</i>	Malva	<i>Malva silvestris</i>
Cardo santo	<i>Cardus benedictus</i>	Marapuama	<i>Ptychopetalum olacoides</i>
Carobinha	<i>Jacaranda caroba</i>	Mate torrado	<i>Illex paraguariensis</i>
Carqueja (2)	<i>Baccharis gaudichaudiana</i>	Mate verde	<i>Illex paraguariensis</i>
Cáscara-sagrada (3)	<i>Rhamnus purshiana</i>	Melissa (2)	<i>Melissa officinalis</i>
Castanha-da-índia	<i>Aesculus hippocastanum</i>	Pfáffia	<i>Pfaffia paniculata</i>
Catuaba (2)	<i>Trichilia catigua</i>	Quássia (2)	<i>Quassia amara</i>
Cavalinha	<i>Equisetum arvense</i>	Quebra pedra	<i>Phyllanthus niruri</i>
Centáurea menor	<i>Erythraea centaurium</i>	Quina amarela	<i>Chinchona calisaya</i>
Chá de bugre	<i>Cordia ecalculata</i>	Ratânia	<i>Krameria triandra</i>
Chapéu de couro	<i>Echinodorus macrophyllus</i>	Ruibarbo	<i>Rheum palmatum</i>
Cipó-prata	<i>Banisteria argyrophylla</i>	Sabugueiro (3)	<i>Sambucus nigra</i>
Condurango	<i>Marsdenia condurango</i>	Sene (2)	<i>Cassia angustifolia</i>
Erva doce	<i>Pimpinella anisum</i>	Stévia (2)	<i>Stevia rebaudiana</i>
Escamônea	<i>Convolvulus scammonia</i>	Sucupira	<i>Bowdichia spp</i>
Estigma de milho	<i>Zea mays</i>	Tília	<i>Tilia cordata</i>
Espinheira santa	<i>Maytenus ilicifolia</i>	Urucum	<i>Bixa orellana</i>
Fava tonka	<i>Dipteryx odorata</i>	Uva ursi	<i>Arctostaphylos uva ursi</i>
Frângula	<i>Rhamnus frangula</i>	Valeriana	<i>Valeriana officinalisL.</i>
Fucus (3)	<i>Fucus vesiculosus</i>	Verbascio	<i>Verbascum phlomoides</i>

Preparação da amostra

Porções de 10,0 g de amostra foram adicionadas a 90,0 mL de Água Peptonada Tamponada (MERCK), seguindo-se de homogeneização em agitador tipo vórtex, por 2 minutos. A partir desta diluição inicial, correspondente à diluição 10^{-1} , foram executadas diluições decimais seriadas até a diluição 10^{-7} , em Água Peptonada Tamponada (MERCK), com agitação em agitador tipo vórtex, por 2 minutos.

Enumeração de bactérias

Pela técnica de semeadura em profundidade

A técnica de plaqueamento em profundidade foi executada conforme indicado na Farmacopéia Brasileira². Alíquotas de 1,0 mL de cada uma das diluições (10^{-1} a 10^{-7}) foram transferidas, em duplicata, ao centro de placas de Petri, estéreis, sobre as quais foram adicionados 25,0 mL de Agar caseína de soja (MERCK). Após homogeneização das placas e solidificação do agar, as placas foram incubadas em posição invertida, a $34 + 2^{\circ}\text{C}$, por 48 horas. Após o período de incubação, foram realizadas as contagens de colônias.

Pelo sistema Petrifilm® AC

Alíquotas de 1,0 mL de cada uma das diluições (10^{-1} a 10^{-7}) foram transferidas, em duplicata, ao centro de placas Petrifilm® AC (3M). Após homogeneização, com auxílio de um disco difusor, as placas foram incubadas, a $34 + 2^{\circ}\text{C}$, por 48 horas. Após o período de incubação, foram realizadas as contagens de colônias.

Enumeração de fungos

Pela técnica de semeadura em profundidade

A técnica de plaqueamento em profundidade foi executada conforme indicado na Farmacopéia Brasileira². Alíquotas de 1,0 mL de cada uma das diluições (10^{-1} a 10^{-7}) foram transferidas, em duplicata, ao centro de placas de Petri, estéreis, sobre as quais foram adicionados 25,0 mL de Agar Sabouraud com cloranfenicol (DIFCO). Após homogeneização das placas e solidificação do agar, as placas foram incubadas em posição invertida, a $26 + 1^{\circ}\text{C}$, por 7 dias. Após o período de incubação, foram realizadas as contagens de colônias.

Pelo sistema Petrifilm® YM

Alíquotas de 1,0 mL de cada uma das diluições (10^{-1} a 10^{-7}) foram transferidas, em duplicata, ao centro de placas Petrifilm® YM (3M). Após homogeneização, com auxílio de um disco difusor, as placas foram incubadas, a $26 + 1^{\circ}\text{C}$, por 7 dias. Após o período de incubação, foram realizadas as contagens de colônias.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Cada uma das 90 amostras foi analisada em triplicata, sendo calculadas as médias das contagens de bactérias e

fungos/g de amostra correspondentes aos métodos convencionais e Petrifilm® para cada uma das 64 espécies vegetais. Em seguida, estes valores foram convertidos em escala logarítmica para que assumissem distribuição normal. Cálculos estatísticos foram executados com o uso do Microsoft Excell 2000, utilizando intervalo de confiança de 95%. Para comparar os dois métodos, convencional e Petrifilm®, foi realizado estudo de regressão linear, com o cálculo dos coeficientes de correlação, coeficientes angulares e interceptos.

As Figuras 1 e 2 apresentam os gráficos de regressão linear obtidos na avaliação entre sistemas Petrifilm® e os métodos convencionais para enumeração de bactérias e fungos, respectivamente. A Tabela 1 apresenta os dados da avaliação estatística entre os métodos convencional e Petrifilm® na enumeração de microrganismos.

Na enumeração de bactérias, foi observada alta correlação entre os métodos ($r = 0,9833$), evidenciando que a contagem de bactérias utilizando as placas Petrifilm® AC foi muito próxima àquela obtida com o método convencional. O

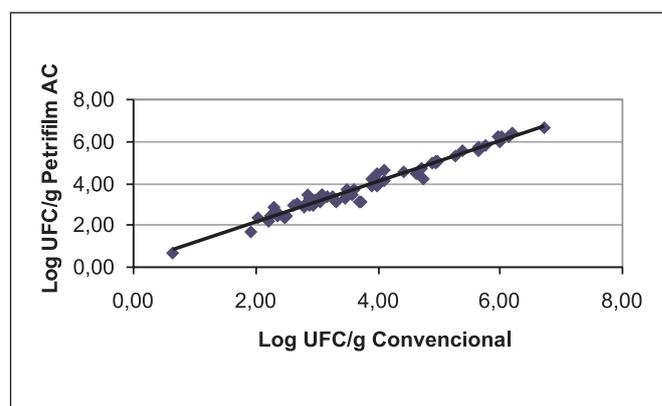


Figura 1. Dados de regressão linear entre os métodos de enumeração de bactérias utilizando semeadura em profundidade (método convencional) e sistema Petrifilm® AC ($n = 64$, $\alpha = 0,05$).

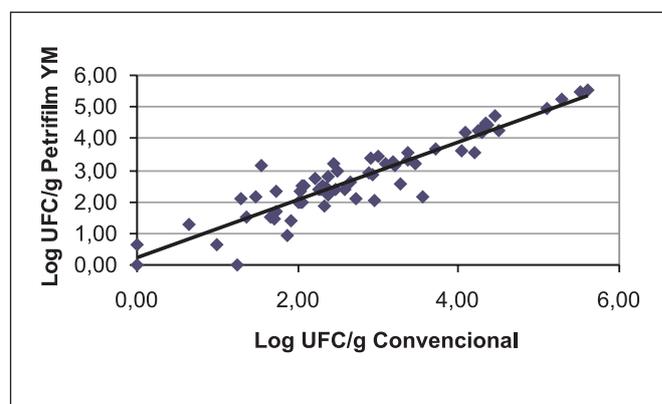


Figura 2. Dados de regressão linear entre os métodos de enumeração de fungos utilizando semeadura em profundidade (método convencional) e sistema Petrifilm® YM ($n = 64$, $\alpha = 0,05$).

Tabela 1. Dados da análise estatística entre os métodos de enumeração utilizando semeadura em profundidade (método convencional) e sistema Petrifilm®.

	Enumeração de Bactérias *		Enumeração de Fungos *	
	Convencional	Petrifilm® AC	Convencional	Petrifilm® YM
Média + Desvio padrão	3,79 + 1,29	3,87 + 1,28	2,77 + 1,25	2,77 + 1,23
Variância	1,66	1,63	1,55	1,52
	Teste F		Teste F	
Valor F _{calculado} (p) **	1,0211 (0,4671)		1,0246 (0,4616)	
	Regressão linear		Regressão linear	
Coefficiente de correlação (r)	0,9833		0,9231	
Coefficiente angular	0,9731		0,9120	
Intercepto	0,1835		0,2534	

* Valores expressos em Log₁₀ UFC/g**F_{calculado} < 1,5183 (para n = 64 e α = 0,05)

sistema Petrifilm® AC apresentou alta sensibilidade para detecção e quantificação de bactérias em relação ao método convencional, evidenciada por coeficiente angular > 0,96 e intercepto < 0,8 (0,9731 e 0,1835, respectivamente). Estes valores são similares a outras comparações³⁻¹¹, que demonstraram coeficientes de correlação entre 0,94 e 0,99 para a enumeração de bactérias, embora se verifiquem trabalhos nos quais os coeficientes de correlação são mais baixos, indicando baixa sensibilidade^{12,13}.

As médias obtidas nas contagens utilizando o método convencional e placas Petrifilm® foram 3,79 e 3,87, respectivamente, não tendo sido verificada diferença significativa entre os métodos avaliados.

A combinação destes resultados sugere que as placas Petrifilm® AC podem ser uma alternativa confiável ao método convencional de enumeração de bactérias em amostras de drogas vegetais.

Em avaliações da performance do sistema Petrifilm® YM em relação aos métodos convencionais de enumeração de bolores e leveduras, verificaram-se contagens de fungos menores, equivalentes ou maiores às obtidas pelos métodos convencionais¹⁴⁻²⁰.

Embora alguns trabalhos^{14-17,20} tenham demonstrado coeficientes de correlação entre 0,96 e 0,99 para a enumeração de fungos, neste estudo, foram observados coeficiente de correlação, coeficiente angular e intercepto iguais a 0,9231, 0,9120 e 0,2534, respectivamente, indicando existir boa correlação e sensibilidade do sistema Petrifilm® YM em relação ao método convencional. Este resultado está de acordo com o observado por Taniwaki^{18, 19} e Bovill⁵, que evidenciaram contagens superestimadas ou não possíveis de serem realizadas com a utilização de Petrifilm® YM em amostras com alta concentração de fungos filamentosos.

Todos os métodos para enumeração de microrganismos têm vantagens e desvantagens quando comparados a outros métodos e o sistema Petrifilm® não é exceção, apresentando

vantagens em relação ao método convencional como a facilidade de uso, não exigir treinamento específico para sua utilização, não exigir a preparação e esterilização de meios de cultura e de placas de Petri, permitir melhor visualização das colônias e utilizar 1/10 do espaço necessário para armazenamento e incubação das placas. Embora o tempo de incubação seja comparável entre as duas metodologias, a utilização do sistema Petrifilm® permite obter resultados mais rápidos por não haver a necessidade da preparação de meios de cultura antes da análise.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos indicam que os sistemas Petrifilm® para enumeração de bactérias e de fungos constituem-se em alternativas aos métodos convencionais de plaqueamento em ágar, para medidas mais rápidas em amostras de drogas vegetais, sem comprometer a confiabilidade e sensibilidade.

REFERÊNCIAS

- Downes FP, Ito K, editors. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 4th ed. Washington: APHA; 2001.
- Farmacopéia Brasileira, 4th ed. São Paulo: Ed Atheneu; 1988.
- Beuchat LR, Copeland F, Curiale MS, Danisavich T, Gangar V, King BW et al. Comparison of the SimPlate total plate count method with Petrifilm, Redigel, and conventional Pour-Plate methods for enumerating aerobic microorganisms in foods. *J Food Prot* 1998; 61: 14-8.
- Blackburn CW, Baylis CL, Pettit SB. Evaluation of Petrifilm methods for enumeration of aerobic flora and coliforms in wide range of foods. *Lett Appl Microbiol* 1996; 22: 137-40.
- Chain VS, FUNG DYC. Comparison of Redigel, Petrifilm, Spiral Plate System, Isogrid and Aerobic Plate Count for determining the number of aerobic in selected foods. *J Food Prot* 1991; 54: 208-11.
- Cormier A, Chiasson S, Leger A. Comparison of maceration and enumeration procedures for aerobic count in selected seafoods by Standard Method, Petrifilm™, Redigel™ and Isogrid. *J Food Prot* 1993; 56: 249-51.

7. Ellis P, Meldrum R. Comparison of the Compact Dry TC and 3M Petrifilm ACP Dry Sheet Media Methods with the Spiral Plate Method for the examination of randomly selected foods for obtaining aerobic colony counts. *J Food Prot* 2002; 65: 423-5.
8. Ginn RE, Packard VS, Fox TL. Enumeration of total bacteria and coliforms in milk by dry rehydratable film methods: collaborative study. *J Assoc Off Anal Chem* 1986; 69: 527-31.
9. Mizuochi S, Kodaka H. Evaluation of dry sheet medium culture plate (Compactdry TC) method for determining numbers of bacteria in food samples. *J Food Prot* 2000; 63: 665-7.
10. Park YH, Seo KS, Ahn JS, Yoo HS, Kim SP. Evaluation of Petrifilm plate method for the enumeration of aerobic microorganisms and coliforms in retailed meat samples. *J Food Prot* 2001; 64: 1841-3.
11. Senyk GF, Kozlowski SM, Noar PS, Shipe WF, Bandler DK. Comparison of dry culture medium and conventional plating techniques for enumeration of bacteria in pasteurized fluid milk. *J Dairy Sci*, 1987; 70: 1152-8.
12. Hayes MC, Ralyea RD, Murphy SC, Carey NR, Scarlett JM, Boor KJ. Identification and characterization of elevated microbial counts in bulk tank raw milk. *J Dairy Sci* 2001; 84: 292-8.
13. Pattison TL, Geornaras I, Holy AV. Microbial populations associated with commercially produced South African sorghum beer as determined by conventional and Petrifilm plating. *Int J Food Microbiol* 1998; 43: 115-22.
14. Beuchat LR, Nail BV, Brackett RE, Fox TL. Evaluation of a culture film (Petrifilm™ YM) method for enumeration of yeasts and molds in selective dairy and high-acid foods. *J Food Prot* 1990; 53: 869-74.
15. Beuchat LR, Nail BV, Brackett RE, Fox TL. Comparison of Petrifilm™ yeast and mold culture film method to conventional methods for enumerating yeasts and molds in foods. *J Food Prot* 1991; 54: 443-7.
16. Bovill R, Bew J, Robinson S. Comparison of selective media for the recovery and enumeration of probiotic yeasts from animal feed. *Int J Food Microbiol* 2001; 67: 55-61.
17. Spangenberg DS, Ingham SC. Comparison of methods for enumeration of yeasts and molds in shredded low-moisture, part-skim mozzarella cheese. *J Food Prot* 2000; 63: 529-33.
18. Taniwaki MH, Iamanaka BT, Banhe AA. Comparison of culture media to recover fungi from flour and tropical fruit pulps. *J Food Mycol* 1999; 2: 291-302.
19. Taniwaki MH, Silva N, Banhe AA, Iamanaka, BT. Comparison of culture media, Simplate, and Petrifilm for enumeration of yeasts and molds in food. *J Food Prot* 2001; 64: 1592-6.
20. Vlaemyneck GM. Comparison of Petrifilm™ and plate count methods for enumerating molds and yeasts in cheese and yogurt. *J Food Prot* 1994; 57: 913-4.

Matérias estranhas e identificação histológica em manjerona (*Origanum majorana* L.), orégano (*Origanum vulgare* L.) e salsa (*Petroselinum sativum* Hoffm.), em flocos, comercializados no estado de São Paulo

Detection of extraneous materials and histology identification of marjoram (*Origanum majorana* L.), oregano (*Origanum vulgare* L.) and parsley (*Petroselinum sativum* Hoffm.) flakes commercialized in São Paulo state

RIALA6/1012

Regina M. Morelli S. RODRIGUES^{1*}, Maria Helena MARTINI², Paulo F. T. CHIARINI², Sônia de Paula T. PRADO³.

* Endereço para correspondência: ¹ Instituto Adolfo Lutz, Divisão de Bromatologia e Química, Seção de Microscopia Alimentar, Av. Dr. Arnaldo, 355. CEP 01246-902 - São Paulo/SP, Brasil e-mail: rmorelli@ial.sp.gov.br;

² Instituto Adolfo Lutz - Laboratório Regional de Campinas;

³ Instituto Adolfo Lutz - Laboratório Regional de Ribeirão Preto.

Recebido: 13/08/2004 – Aceito para publicação: 30/06/2005

RESUMO

Os condimentos ou especiarias são constituídos de diferentes partes de vegetais dessecados, apresentam aroma característico e são utilizados para realçar o sabor dos alimentos. Este trabalho teve como objetivos a pesquisa de fraudes pela identificação dos elementos histológicos característicos, a adequação e implantação de métodos para pesquisa de matérias estranhas, por peneiração e flutuação em manjerona, orégano e salsa em flocos e a avaliação das condições higiênicas desses condimentos. As 41 amostras de manjerona, 84 de orégano e 57 amostras de salsa em flocos foram adquiridas no período de agosto a novembro de 1998, em seis cidades do estado de São Paulo. Para identificação dos elementos histológicos utilizou-se a técnica descrita por Rodrigues et al. e para identificação das matérias estranhas foram utilizados os métodos descritos pela AOAC-2000. Não foi caracterizado qualquer tipo de fraude nos três condimentos analisados. Das 182 amostras analisadas, 98,90% estavam em desacordo com a legislação utilizada até 07/07/2003. As ordens de insetos identificadas foram Hemiptera (afídeos), Coleoptera (carunchos) e Psocoptera (psócides) e os fragmentos de insetos foram a matéria estranha mais frequente. O método de flutuação foi mais eficiente para a recuperação de matérias estranhas do que a peneiração, inclusive para detectar a presença de ácaros.

Palavras-Chave. manjerona (*Origanum majorana* L.), orégano (*Origanum vulgare* L.), salsa (*Petroselinum sativum* Hoffm.), matérias estranhas, identificação histológica, metodologia.

ABSTRACT

The seasonings and spices are consisted of different parts of dried vegetables that present characteristic aromas, and they are used to add flavor and to improve the food taste. The objectives of this work were to investigate frauds by identifying characteristic histological elements, the adequacy of methods for extraneous materials identification by means of sieving and floating procedures and to evaluate the hygienic conditions of condiments (marjoram, oregano, and parsley flakes). The 41 samples of marjoram, 84 of oregano and 57 samples of parsley flakes were obtained during the period of August to November, 1998, in six cities of the state of São Paulo. The technique described by Rodrigues et al. was used for investigating the histological elements. The technical procedures described by AOAC-2000 were used for identifying the extraneous materials. No fraud was detected in the three chosen and analyzed condiments. Of 182 analyzed samples, 98.90% were not in accordance to the law determination of July 7, 2003. The identified insects belonged to orders Hemiptera (aphids), Coleoptera (beetles) and Psocoptera, and the mostly frequent extraneous materials were fragments of insects. The floating method was the most efficient to recover extraneous materials, especially in detecting the presence of mites.

Key Words. marjoram (*Origanum majorana* L.); oregano (*Origanum vulgare* L.), parsley (*Petroselinum sativum* Hoffm.), extraneous materials, histological identification, methodology.

INTRODUÇÃO

Os condimentos ou especiarias têm seu destaque na vida do homem, desde a Grécia antiga, como símbolos de crenças culturais ou para fins medicinais, aromatizantes e conservantes, e são constituídos de diferentes partes de vegetais dessecados, grosseiramente subdivididos ou moídos¹. Apresentam aroma característico e são utilizados para realçar o sabor dos alimentos ou torná-los mais agradável, além de estimular a secreção dos sucos gástricos e aumentar o peristaltismo intestinal, facilitando a degradação do alimento até a fase final¹⁻⁴.

Segundo a legislação vigente no Brasil⁵ e a do Estado de São Paulo⁶, as especiarias ou condimentos vegetais devem ser constituídos de especiarias genuínas e puras, sãs e limpas, que deverão corresponder às suas características botânicas normais e estar isentas de substâncias estranhas, elementos vegetais estranhos à espécie da planta da origem, que não possuam as características de condimento vegetal. Ainda, de acordo com a sua composição, o condimento poderá ser simples quando constituído de uma só especiaria genuína e pura, destacando-se entre os condimentos em folha, a manjerona, o orégano e a salsa.

A manjerona (*Origanum majorana* L.), uma planta da família *Labiatae*, de climas subtropicais e temperados, originária de lugares áridos da Europa meridional se espalhou por quase todo o mundo; no Brasil é cultivada, sobretudo, em hortas e jardins. Sua denominação dada pelos gregos significa “alegria da montanha”. Apresenta caule quadrangular atingindo cerca de 35cm de altura, com delicadas folhas pecioladas, opostas, elípticas, de comprimento de 6 a 24mm, aveludadas na parte de baixo^{7,8}.

O orégano (*Origanum vulgare* L.), também pertencente à família *Labiatae*, foi transportado pelos romanos do Mediterrâneo para a Europa e considerado por eles como símbolo da paz. Está aclimatado no Brasil, mas não é cultivado em larga escala. O orégano é muito confundido com a manjerona, mas possui cheiro e sabor característico mais acentuado. É uma planta perene, tem entre 25 a 40cm de altura, com folhas opostas, ovais, verde-escuras, pecioladas, inteiras ou serrilhadas, com um pouco mais de 35mm, ou seja, maior do que a da manjerona, e com as pontas (extremidades) levemente mais pontiagudas^{7,8}.

Quanto à salsa (*Petroselinum sativum* Hoffm.) não há registros de sua origem, mas sabe-se que é conhecida há séculos e que na Grécia Antiga era tida como símbolo da morte, empregada nos ritos mortuários e somente com os romanos é que passou a ser utilizada como alimento. A salsa é um condimento utilizado mundialmente e no Brasil é cultivada em larga escala; combinada com a cebolinha, forma o mais tradicional tempero brasileiro, o cheiro-verde. É uma planta herbácea de 40 a 80cm de altura com folhas verdes, de contorno triangular, serrilhadas, tipicamente divididas e aromáticas⁷.

Assim como os demais produtos alimentícios, os condimentos estão sujeitos a problemas no cultivo, colheita, estocagem, falhas no processamento, transporte e armazenagem

que favorecem a presença no produto final de matérias estranhas como insetos, ácaros, pelos de roedores, entre outras^{9,10}. Nos condimentos processados em locais com sistemas de limpeza precários é comum a ocorrência de excrementos de roedor e de insetos, caramujos, pedaços de arames, porcas e parafusos, pontas de cigarro e pedaços de madeira¹¹. A presença de matérias estranhas indica falhas nos procedimentos das Boas Práticas de Fabricação dos Alimentos, podendo causar riscos à saúde humana.

Muitas vezes a matéria estranha, advinda de qualquer etapa a que o produto foi submetido, é detectada a olho nu, mas pode chegar ao produto final como pequenos fragmentos, misturados ao produto pelo próprio processamento, tornando impossível sua visualização¹², sendo necessário o emprego de métodos adequados de isolamento¹³ para a análise microscópica.

As matérias estranhas presentes nos alimentos podem ser analisadas por métodos macroanalíticos¹² e métodos microanalíticos¹³ que são divididos de acordo com o tipo de sujidades. As sujidades são classificadas em leves e pesadas, de acordo com a densidade destes elementos em relação ao meio de flutuação que são separadas¹⁴. As sujidades leves compreendem insetos e seus fragmentos, ácaros, pêlos de roedores, enquanto as sujidades pesadas são areia, terra, vidro, insetos inteiros entre outros¹⁵.

Tanto os coleópteros como os ácaros são infestadores de condimentos^{15,16}. Segundo Olsen¹⁷, vinte e uma espécies de moscas presentes em alimentos estão estritamente associadas ao risco à saúde humana atuando como vetores mecânicos de enteropatógenos e como agentes causadores de míases. Os ácaros *Dermatophagoides farinae*, *Suidasia* sp, *Thyreophagus entomorphos* e *Tyrophagus putrescentiae* foram identificados como causadores de reações alérgicas, incluindo anafilaxia em indivíduos que consumiram alimentos contaminados¹⁸. Moecke et al.¹⁹ confirmaram a ocorrência de sete casos de anafilaxia pós prandial, no ambulatório de Alergia do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, sendo que seis ocorreram por ingestão de alimentos à base de farinha de trigo e um à base de farinha de milho, causados pelo ácaro de armazenagem, *Tyrophagus entomophagus*. É importante ressaltar que as reações alérgicas desenvolveram-se após a cocção dos alimentos contaminados, o que demonstra a termoestabilidade do antígeno após cocção.

Em relação às outras matérias estranhas, há evidências que objetos duros e cortantes maiores de 7mm de comprimento são considerados riscos à saúde do consumidor quando presentes nos alimentos²⁰. Zamboni et al.²¹ relatam que partículas ferromagnéticas maiores que 1,5mm podem penetrar no trato digestivo humano.

Este trabalho teve como objetivos a pesquisa de fraudes pela identificação dos elementos histológicos característicos, a adequação e implantação de métodos para pesquisa de matérias estranhas, por peneiração e flutuação em manjerona, orégano e salsa em flocos e a avaliação das condições higiênicas desses condimentos.

MATERIAL E MÉTODOS

Modelo de Estudo

Descritivo do tipo transversal.

Material

Foram analisadas 182 amostras de condimentos embalados sendo 41 amostras de manjerona, 84 de orégano e 57 amostras de salsa, em flocos, respectivamente de 9, 25 e 15 marcas diferentes, sendo que para amostras da mesma marca, com lotes e prazos de validade distintos. As amostras foram adquiridas, no período de agosto a novembro de 1998, em supermercados e mercearias de seis cidades do estado de São Paulo: Campinas, Ribeirão Preto, Santo André, São José do Rio Preto, São Paulo e Sorocaba.

As amostras foram analisadas nos Laboratórios de Microscopia de Alimentos do Instituto Adolfo Lutz: Central e Regionais de Campinas e Ribeirão Preto.

Métodos

Identificação dos elementos histológicos

Foi utilizada a técnica para condimentos moídos descrito por Rodrigues et al.²², que consiste no clareamento de amostras com hipoclorito de sódio. Após filtração, lavagem do material e preparação de lâminas, o material foi observado ao microscópio óptico (10X e 40X).

Determinação de matérias estranhas

Os métodos utilizados para a determinação de matérias estranhas foram os descritos pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC)²³: 16.14.03 (960.51) para peneiração utilizada nos três produtos e para flutuação as técnicas foram: 16.14.18 (985.39) para a manjerona, 16.14.21 (969.44) para o orégano e 16.14.05 [975.49 (A)a B(b)] para a salsa. Todas as análises foram realizadas em duplicata e os resultados expressos como a média aritmética das duas determinações.

Análise estatística

Para verificar se houve diferença estatisticamente significante entre os métodos de peneiração e de flutuação realizou-se o teste de Mc Nemar²⁴ para amostras pareadas.

orégano estudadas não apresentaram nenhuma matéria estranha.

De acordo com a Tabela 1, observa-se que as médias de recuperação das matérias estranhas pelo método de flutuação foram mais eficientes do que a da peneiração. Este melhor resultado de recuperação foi confirmado realizando-se o teste de Mc Nemar²⁴ para amostras pareadas, o qual mostrou que houve diferença significativa entre os métodos utilizados ($p < 0,0001$), ou seja, o método da flutuação foi mais eficiente do que o método da peneiração.

Ainda na Tabela 1, verifica-se que tanto no método da peneiração como na flutuação, a matéria estranha mais freqüente na manjerona e na salsa foram os fragmentos de insetos. Quanto ao orégano, verifica-se que, pelo método da flutuação, os insetos foram os mais freqüentes (Tabela 1).

Tabela 1. Média de matérias estranhas, por tipo, recuperadas pelos métodos da peneiração e flutuação em manjerona, orégano e salsa, em flocos.

Condimentos	Matérias Estranhas	Métodos	
		Peneiração	Flutuação
manjerona	insetos	1,8	29,4
	larvas de insetos	0,5	4,3
	exúvia	0,0	1,1
	ovos de inseto	0,0	2,2
	frag. de insetos	17,5	131,1
	ácaros	0,3	3,5
	pêlos de roedor	0,0	0,4
	outros pêlos	0,0	0,4
	demais	2,7	3,9
orégano	insetos	0,4	31,9
	larvas de insetos	0,2	1,5
	exúvia	0,0	0,5
	ovos inseto	0,0	0,1
	frag. de insetos	3,0	25,1
	ácaros	0,1	5,0
	pêlos de roedor	0,0	3,4
	outros pêlos	0,0	0,3
	demais	0,8	1,9
salsa	insetos	0,6	1,4
	larvas de insetos	0,1	0,5
	exúvia	0,0	0,0
	ovos inseto	0,0	0,0
	frag. de insetos	2,2	18,4
	ácaros	0,0	8,0
	pêlos de roedor	0,1	0,1
	outros pêlos	0,0	0,1
demais	0,1	0,0	

frag. = fragmentos

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em relação à identificação, não foi caracterizado nenhum tipo de fraude nos três condimentos analisados, uma vez que a análise histológica das amostras revelou apenas a presença de manjerona (*Origanum majorana* L.), orégano (*Origanum vulgare* L.) e salsa (*Petroselinum sativum* Hoffm.).

Das 182 amostras analisadas pelo método de peneiração e flutuação, 98,90% estavam em desacordo com a legislação em vigor até 07/07/2003⁵, que preconizava ausência de parasitas, sujidades e larvas, e apenas 1,1% das marcas de

A Tabela 2 mostra as ordens de insetos identificadas nos condimentos analisados pelos dois métodos. Foram encontrados insetos das Ordens Hemiptera (afídeos), Coleoptera (carunchos) e Psocoptera (psócides) nos três tipos de condimentos, sendo que os afídeos e psócides apresentaram freqüências mais elevadas e foram os mais recuperados pelo método de flutuação.

O método da peneiração mostrou-se adequado para a detecção de infestação viva (Figura 1), insetos e ácaros, porém não recuperou insetos da Ordem Coleoptera em nenhum dos três tipos de condimentos analisados (Tabela 2).

Dentre os condimentos, o orégano foi o que apresentou maior número de insetos pelos dois métodos utilizados, e a salsa

o menor número (Tabela 2).

Com relação aos ácaros, conforme se observa na Tabela 3, o método da flutuação também foi mais eficiente do que o da peneiração, sendo que a maior recuperação (41,5%) ocorreu para a manjerona, seguida da salsa. Ao contrário da infestação por insetos, o orégano foi o que apresentou menor número de ácaros pelo método da flutuação (Tabela 3), porém detectou-se a presença de ácaros vivos em uma amostra de orégano, pelo método da peneiração.

As Figuras 1 e 2 mostram o total de amostras positivas para cada tipo de matérias estranhas encontradas nos três condimentos, segundo os métodos de peneiração e de flutuação, respectivamente.

Tabela 2. Total de insetos recuperados, de acordo com a Ordem, pelos métodos de peneiração e flutuação nos três tipos de condimentos.

Condimentos	Métodos					
	Hemiptera	Peneiração Coleoptera	Psocoptera	Hemiptera	Flutuação Coleoptera	Psocoptera
Manjerona	4	0	4	25	6	12
Orégano	4	0	12	49	6	16
Salsa	0	0	1	5	1	1

Tabela 3. Porcentagem de recuperação de ácaros pelos métodos de peneiração e flutuação nas 182 amostras de condimentos.

Condimentos	Métodos	
	Peneiração(%)	Flutuação(%)
Manjerona	4,9	41,5
Orégano	2,3	24,7
Salsa	0	33,3

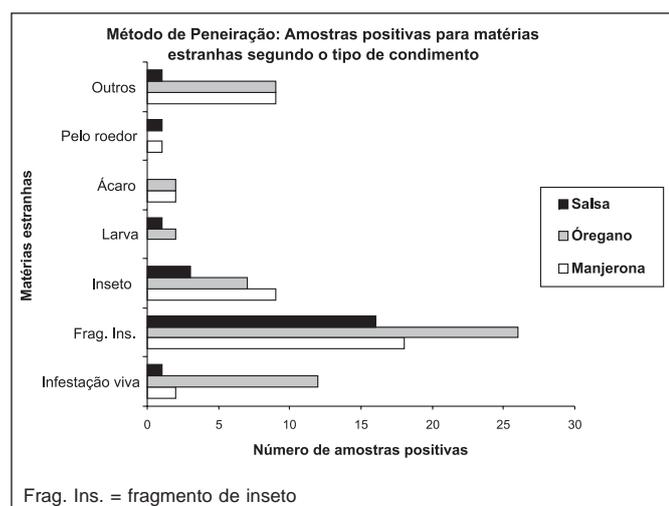


Figura 1. Total de amostras positivas para matérias estranhas encontradas nas diferentes marcas de orégano, manjerona e salsa, segundo o método de peneiração.

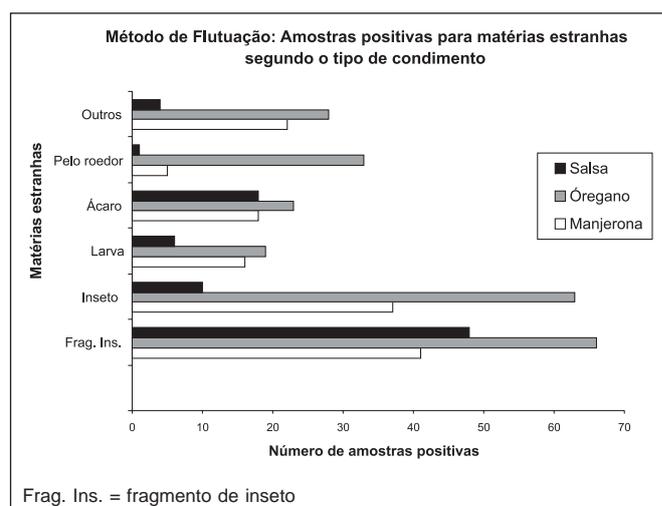


Figura 2. Total de amostras positivas para matérias estranhas encontradas nas amostras de diferentes marcas de orégano, manjerona e salsa, segundo o método de flutuação.

Observa-se na Figura 1 que, quando utilizado o método da peneiração, foi possível a detecção de infestação viva nos três tipos de condimentos, com maior número de amostras positivas para o orégano.

Entre os métodos macroanalíticos, a peneiração é muito útil por facilitar a separação e concentração de certos tipos de matérias estranhas permitindo a detecção e identificação de artrópodes vivos, o que não é possível quando se utiliza métodos microanalíticos, como a flutuação.

O analista de alimentos deve ter o conhecimento da importância da combinação dos métodos macroanalíticos e microanalíticos, quando for o caso, uma vez que ao se complementarem podem fornecer tipos diferentes de informação¹².

Atualmente, segundo a legislação em vigor²⁵, são considerados impróprios para o consumo somente os produtos que apresentam matéria prejudicial à saúde humana (como, por exemplo, insetos ou outros animais, vivos ou mortos, inteiros ou em partes, reconhecidos como vetores mecânicos; parasitos; excrementos; objetos rígidos, pontiagudos e/ou cortantes, entre outros), por poder causar agravos à saúde do consumidor. Portanto, na interpretação e aplicação dessa legislação, estes condimentos estão aprovados, pois os insetos identificados são considerados como pragas nesses tipos de condimentos e não existe estudo que comprove sua atuação como vetor mecânico. Como é comum o consumo desses condimentos retirados de suas embalagens e diretamente adicionados em saladas, como tempero, ou mesmo no alimento preparado, a presença de insetos vivos assim como de ácaros e pêlos de roedor é um fator de risco, pois podem veicular bactérias e fungos, além do fato dos ácaros serem alergênicos^{18,19}. Sabe-se que todo alimento deve atender a padrões de identidade e qualidade de forma a garantir que o consumidor adquira não somente um produto que não ofereça riscos à saúde humana, mas também que não lhe cause nenhum tipo de repulsa em decorrência da presença de alguma matéria estranha e que tenha sido fabricado dentro dos princípios de Boas Práticas Agrícolas (BPA), Boas Práticas de Fabricação (BPF), do sistema de Análises de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) entre outros.

Assim, apesar dos produtos analisados estarem de acordo com a legislação em vigor²⁵, os dados do presente estudo demonstram que o setor produtivo ainda apresenta falhas para garantir totalmente a qualidade sanitária das matérias-primas e do produto final, talvez em virtude da deficiência da aplicação de todas as “ferramentas” necessárias a um controle de qualidade adequado, indicando, portanto, a necessidade da melhoria da qualidade do alimento e uma discussão mais ampla sobre o tema e sobre as mudanças que vêm ocorrendo nas legislações de alimentos no Brasil.

CONCLUSÃO

- Não houve ocorrência de fraudes nas amostras analisadas, uma vez que só foram identificados os elementos histológicos característicos dos condimentos estudados;

- Houve diferença estatisticamente significativa entre os métodos utilizados ($p < 0,0001$), ou seja, o método de flutuação foi mais eficiente para a recuperação de matérias estranhas do que a peneiração;
- As ordens de insetos identificadas nos condimentos estudados foram: Hemiptera (afídeos), Coleoptera (carunchos) e Psocoptera (psócides);
- O método de peneiração foi importante para a identificação de infestação viva;
- A presença de maior quantidade de fragmentos de insetos deve-se ao fato de serem condimentos grosseiramente triturados;
- Os ácaros foram melhor recuperados quando utilizado o método de flutuação.

REFERÊNCIAS

1. Rizzini CTQ, Mors WB. Botânica Econômica Brasileira. 2a ed. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural; 1995.
2. Correia M, Daros VSMG, Silva RP. Matérias estranhas em canela em pó e páprica em pó, comercializadas no Estado de São Paulo. *Ciênc Tecnol Aliment* 2000; 20 (3): 375-80.
3. Hill AF. Botânica Econômica - Plantas Úteis y Productos Vegetales. Especies y otros productos aromaticos. Barcelona: Ediciones Omega; 1965.
4. Prakash V. Leafy spices. Florida: CRC Press; 1990.
5. Resolução Normativa da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos [CNNPA] nº 12, de 23 de julho de 1978. Aprova as seguintes normas técnicas especiais do Estado de São Paulo, revisadas pela CNNPA, relativas a alimentos (e bebidas) para efeito em todo território brasileiro. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 24 jul. 1978. Seção 1, pt 1, p. 11.521-5.
6. Decreto nº 12.486 de 20 de outubro de 1978. Aprova Normas Técnicas Especiais Relativas a Alimentos e Bebidas. *Diário Oficial do Estado de São Paulo*, São Paulo, 20 out. 1978. p. 32 - 3 (NTA 70).
7. Alzugaray D, Alzugaray C, editores. Enciclopédia da flora brasileira. São Paulo: Três Livros e Fascículos, 1984.
8. Maranca G. Plantas aromáticas na alimentação. São Paulo: Livraria Nobel S.A.; 1986.
9. Gorham JR. The significance for human health is insects in food. *Ann. Rev. Entomol.* 1979; 24: 209-24.
10. Peace R, Gardiner MA. Extraneous matter in food: detection, identification and evaluation. Ontario: Polyscience Publications Inc.; 1990.
11. Tainter DR, Grenis AT. Especies y aromatizantes alimentarios. Zaragoza: Acribia; 1996.
12. Food & Drug Administration, U.S. - Center for Food Safety & Applied Nutrition. FDA. Macro analytical Procedures Manual, 1984. p.1-8.
13. Boese J, Cichowicz SM. Extraneous materials - isolation. In: Cunniff P; editor. Official methods of analysis of AOAC International. 16th ed. Arlington: AOAC International; 1995. p. 38, 44 - 5.
14. Dent RG. Extraction methods. In: Gorham JR; editor. Training manual for analytical entomology in food industry. Washington, DC: FDA; 1978. p.76-84.
15. Arbogast RT. Beetles: Coleoptera. In: Gorham JR, editor. Ecology and management of food industry pests. Arlington: FDA Technical Bulletin 4; 1991. p. 131-76.
16. Boczek J. Mite pests in stored food. In: Gorham JR, editor. Ecology and management of food industry pests. Arlington: FDA Technical Bulletin 4; 1991. p. 57-79.
17. Olsen AR. Regulatory action criteria for filth and other extraneous materials. III. Review of flies and foodborne enteric disease. *Regulatory Toxicol. Pharmacol.* 1998; 28: 199- 211.

18. Olsen AR. Regulatory action criteria for filth and other extraneous materials. II. Allergenic mites: an emerging food safety issue. *Regulatory Toxicol. Pharmacol.* 1998; 28: 190-8.
19. Moecke EH, Func LG, Nazzuco RM, Morato EF. Ácaros de armazenagem causadores de anafilaxia. In: Encontro Nacional de Analistas de Alimentos. Maceió: 2001: 223.
20. Olsen AR. Regulatory action criteria for filth and other extraneous materials. I. Review of hard or sharp foreign objects as physical hazards in food. *Regulatory Toxicol. Pharmacol.* 1998; 28: 181-9.
21. Zamboni CQ, Alves HI, Spiteri N, Rodrigues RMMS. Partículas metálicas em farinha de trigo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz.* 1985; 45 (1/2): 27-9.
22. Rodrigues MMS, Atui MB, Correia M, editores. Isolamento de elementos histológicos. São Paulo: Letras & Letras;1999. p. 68 - 70.
23. Association of Official Analytical Chemists (AOAC). Official methods of analysis of AOAC International. 17th ed. Gaithersburg: 2000.
24. Berquó ES, Souza JMP, Gotlieb SLD. Bioestatística. São Paulo: Editora Pedagógica e Universitária Ltda, 1980.
25. Resolução RDC no 175, de 08 de julho de 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, Brasília, DF, 2003. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/rdc/175_03rdc.htm. 14 abril 2004.

Composição centesimal, valor calórico, teor de colesterol e perfil de ácidos graxos da carne de búfalo (*Bubalis bubalis*) da cidade de São Luiz do Quitunde-AL

Centesimal composition, caloric value, level of cholesterol, and fatty acid profile of the meat from buffalo (*Bubalis bubalis*) breeding in the area of São Luiz do Quitunde-AL

RIALA6/1013

Giselda Macena LIRA^{1*}; Jorge MANCINI FILHO²; Rosângela Pavan TORRES²; Alane Cabral de OLIVEIRA³; Alba Maria Alves VASCONCELOS³; Cristhiane Maria Bazílio de OMENA³; Michelle Cristina Silva de ALMEIDA³

* Endereço para correspondência: ¹Departamento de Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, AL, Brasil. CEP 57.072-900, fax: 082.214.1665, e-mail: gmlira@superig.com.br;

² Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo;

³ PIBIC/CNPq/UFAL – Curso de Nutrição e Farmácia.

Recebido: 08/11/2004 – Aceito para publicação: 02/06/2005.

RESUMO

O búfalo (*Bubalis bubalis*) é um animal que apresenta notável potencial para a produção de carne e leite, entretanto a literatura não apresenta muitos dados sobre os principais constituintes químicos de seus produtos. Por isso, este estudo teve como objetivo oferecer informações sobre a carne de búfalo da cidade de São Luiz do Quitunde-AL, por meio de caracterização de seu perfil de ácidos graxos, teor de colesterol, composição centesimal e valor calórico. Analisaram-se 60 amostras em três tipos de corte: alcatra (20 amostras), chã de dentro (20 amostras) e lombo paulista (20 amostras). Os resultados demonstraram elevados teores de umidade e proteínas e reduzidos valores de lipídeos, quando comparados com os de outras espécies. O maior valor calórico foi encontrado em alcatra. Os teores de colesterol corresponderam a 83,01 mg/100g (alcatra), 79,01 mg/100g (lombo paulista) e 86,70 mg/100g (chã de dentro). No perfil de ácidos graxos foram identificados vinte e dois, sendo os principais em todos os cortes os seguintes: C18:1, C18:0, C16:0, C18:2 e C20:4. O ácido esteárico (C18:0), apesar de saturado, é não aterogênico e correspondeu à metade do total dos ácidos graxos saturados em todas as amostras. A relação poliinsaturados/saturados foi 0,50 (alcatra), 0,54 (lombo paulista) e 0,60 (chã de dentro). A razão $\omega 6/\omega 3$ foi 2,1:1 (alcatra), 2:1 (lombo paulista) e 2,3:1 (chã de dentro). Considerando-se os dados obtidos a carne de búfalo apresenta-se como opção de um alimento saudável, quando comparada com outros tipos de carne.

Palavras-Chave. carne de búfalo, composição centesimal, colesterol, ácidos graxos.

ABSTRACT

Buffalo (*Bubalis bubalis*) is an animal that presents significant potential for meat and milk production, but there are few data in the literature regarding the chemical compositions of the derived products. In order to obtain information concerning the levels of fatty acids and cholesterol in buffalo meat, together with the calorific value and centesimal composition, 60 samples of meat produced in the area of São Luiz do Quitunde (Alagoas, Brazil) were analysed. Results derived from 20 samples from each of three different cuts of meat, namely rum steak, plain and loin, showed the presence of high levels of protein and water, but reduced levels of lipids when compared with meat from other animal species. Twenty-two different fatty acids were identified in meat samples, and in all meat cuts the main components were C18:1, C18:0, C16:0, C18:2 and C20:4. Despite being saturated, C18:0 is non-atherogenic and accounted for 50% of the total saturated fatty acids present in all three cuts. The polyunsaturated / saturated fatty acids ratios were 0.50 (rum steak), 0.60 (plain) and 0.54 (loin). The $\omega 6 / \omega 3$ fatty acids ratio values were 2.1:1 (rum steak), 2.3:1

(plain) and 2:1 (loin). Levels of cholesterol in rum steak, plain, and loin were 83.01, 86.70 and 79.01 mg/100g, respectively. The highest caloric value was found in rum steak cut. Taken together, these results demonstrate that buffalo meat could represent a healthier food option in comparison with other types of meat.

Key Words: buffalo meat, centesimal composition, fatty acids, cholesterol.

INTRODUÇÃO

A carne representa uma positiva contribuição nutricional na alimentação, sendo veículo para muitos elementos essenciais na dieta humana^{1,2}. Fornece proteínas de elevado valor biológico e constitui a maior fonte de cinco vitaminas: tiamina, niacina, riboflavina, B6 e B12. Outra importante contribuição nutricional é o seu conteúdo de minerais, particularmente ferro e zinco, com alta biodisponibilidade. Metade de seu conteúdo de ferro é constituído por ferro-heme (ligado à hemoglobina) que é absorvido mais eficientemente pelo organismo (cerca de 15 a 35%); enquanto que o ferro encontrado em alimentos de origem vegetal, ovos, leite e derivados é não-heme, o qual apresenta menor aproveitamento (sua absorção é de 1 a 5%)^{2,3}.

O búfalo (*Bubalis bubalis* = búfalo indiano) teve sua origem na Ásia, sendo introduzido no Brasil, em 1895, especificamente na Ilha do Marajó, através de Vicente Chemont de Miranda, com animais provenientes da Itália⁴. Ali encontrou condições perfeitas para seu desenvolvimento, possuindo taxa de crescimento anual de 10%, superior à taxa dos bovinos no Brasil. O Estado do Pará conta com mais de 50% do rebanho bubalino brasileiro⁵.

Por muitos séculos, os búfalos foram criados e mantidos para o trabalho, o que levou à evolução de animais com um poderoso desenvolvimento muscular. Durante muitos anos a carne bubalina era procedente de animais velhos, abatidos no fim de uma longa vida de trabalho, por isso gerou-se um grande preconceito associando-se à carne de búfalo características de uma carne de baixa qualidade⁴.

O búfalo é um animal doméstico e dócil que apresenta notável potencial para a produção de carne e leite. As quatro raças oficialmente reconhecidas no Brasil são: *Murrah*, *Jafarabadi*, *Mediterrâneo* e *Carabáio*^{4,6}. As raças *Mediterrâneo* (predominante no Brasil), *Jafarabadi* e *Murrah* possuem aptidão para carne e leite. A raça *Carabáio* apresenta capacidade para carne e trabalho, não possuindo aptidão leiteira⁴.

Pelas extraordinárias características de produção de leite, carne e trabalho, aliadas à sua elevada adaptabilidade às condições de ambiente do Brasil, o búfalo doméstico é um animal de grande representatividade para a pecuária nacional⁴. Atualmente, o consumo da carne de búfalo se restringe apenas a regiões específicas do país: Norte e Sul⁷.

A falta de informações sobre os constituintes químicos desse produto é fator limitante ao consumo e, conseqüentemente, à comercialização. A obtenção de tais informações é fundamental, podendo incrementar a bubalinocultura em nosso Estado e também, promover uma adequada orientação dietética; tais fatos constituem subsídios suficientes para justificar a necessidade de

desenvolver estudos, através de técnicas analíticas disponíveis, visando preencher esta lacuna. O presente trabalho teve como objetivo determinar a composição centesimal, o valor calórico, colesterol e a caracterização do perfil de ácidos graxos presentes na carne de búfalo (*Bubalis bubalis*) em diferentes tipos de corte.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

Foram analisadas 60 amostras de cortes de carne bubalina, escolhidos por serem os mais comercializados e distribuídos da seguinte forma: 20 amostras de chã de dentro, 20 amostras de alcatra e 20 amostras de lombo paulista. Os cortes eram procedentes de animais diferentes, raça *Murrah*, sexo masculino, abatidos com idade de 1 ano e 6 meses, não castrados, nascidos e criados na Fazenda Castanha Grande, situada na cidade de São Luiz do Quitunde – Alagoas. As amostras foram adquiridas logo após o abate no período de agosto de 2003 a abril de 2004 e pesavam cerca de 300g cada. Após a coleta as amostras foram conduzidas ao Laboratório de Bromatologia do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Alagoas, onde as análises foram realizadas, sendo embaladas em sacos de polietileno, identificadas e congeladas a -17 °C até o momento da realização das análises.

Métodos

Após homogeneização, foram realizadas as seguintes determinações em triplicata:

Composição centesimal

Umidade

Determinada pela perda de peso em estufa regulada a 105 °C, segundo AOAC⁸.

Cinzas

Obtidas por incineração de uma quantidade conhecida da amostra, em mufla a 550 °C, até obtenção de peso constante (AOAC)⁸.

Proteínas

Determinadas pelo método Kjeldahl, que consiste na determinação do nitrogênio total. Para converter o resultado em proteína bruta foi utilizado o fator 6,25 (AOAC)⁸.

Lipídeos Totais

Extraídos a frio pelo método de Folch *et al.*,⁹ utilizando duas extrações com clorofórmio:metanol (2:1), lavagem do resíduo (clorofórmio:metanol – 2:1), adição de KCl 0,88% em

H₂O, separação das fases, adição de metanol H₂O (1:1), evaporação de clorofórmio em rota-evaporador, fração lipídica ressuspendida em clorofórmio. Alíquotas foram tomadas para determinações gravimétricas.

Os resultados foram expressos em porcentagem, em relação ao peso da amostra integral e seca.

O valor calórico total foi calculado a partir dos coeficientes calóricos correspondentes para proteínas e lipídeos, respectivamente, 4 e 9 kcal/g¹⁰.

Colesterol

Uma alíquota de 5 ml do extrato lipídico obtido pelo método de Folch foi tomada para análise, segundo o procedimento de Bohac *et al.*,¹¹ adaptado por Bragagnolo e Rodriguez-Amaya¹², através de saponificação, extração da matéria insaponificável, reação de cor, leitura da absorbância em espectrofotômetro a 490 nm, contra um branco. As absorbâncias obtidas foram comparadas às da curva padrão utilizada (Searcy e Bergquist)¹³.

Perfil de ácidos graxos

Os extratos lipídicos obtidos pelo método de Folch foram esterificados segundo Hartman e Lago¹⁴, visando a determinação da composição em ácidos graxos por cromatografia em fase gasosa e encaminhados ao Laboratório de Lipídeos do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP onde foram injetados em cromatógrafo a gás. Para a identificação dos ácidos graxos foram utilizados padrões de ésteres metílicos de ácidos graxos puros, comparando-se o tempo de retenção dos ésteres metílicos das amostras e dos padrões. A quantificação dos ácidos graxos foi feita por normalização de área, expressando-se o resultado em percentual de cada ácido sobre o total de ácidos graxos. Condições de análise:

Cromatógrafo a gás GC 17 A Shimadzu/ Class GC 10

Coluna cromatográfica de sílica fundida Carbowax 20 M (polietilenoglicol) de 30 metros, 0,25 mm de diâmetro interno e espessura da fase estacionária de 0,25 microns.

Temperatura da coluna: 170°C.

Programação de temperatura da coluna: aquecimento a 1°C/min. de 170°C até 225°C, permanecendo nesta temperatura por 10 min.

Temperatura do injetor: 250°C.

Temperatura de detector: 270°C.

Gás de arraste: Hélio (1 mL/min.)

Razão de divisão da amostra no injetor (split) = 1:50

Análise Estatística: para avaliar a existência ou não de diferenças significativas nos teores de nutrientes entre as amostras analisadas, foi realizada a Análise de Variância (ANOVA), com o auxílio do programa epi-info, versão 6.04, a um nível de significância de 0,05. Quando as variâncias não foram homogêneas, testado pelo Qui-quadrado de Bartlett's, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis no mesmo nível de significância.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Composição Centesimal

A Tabela 1 apresenta os resultados obtidos na composição centesimal de três cortes de carne de búfalo. Pode-se verificar que a carne de búfalo apresenta elevados teores de umidade, com resultados variando de 74,95% a 76,36% para os cortes analisados. O teor de umidade da carne tem relação direta sobre sua suculência, que é um fator fundamental para aceitação do produto pelos consumidores¹⁵. Os teores mais elevados encontrados por Torres *et al.*¹⁶, em carne bovina, corresponderam a 74,42% (patinho) e 74,12% (acém).

Os teores de proteína variaram de 20,85% a 21,67%, sendo mais elevados que os valores encontrados por Torres *et al.*¹⁶ no contra-filé de carne bovina (19,13%), no lombo suíno (19,38%), na bisteca sem osso (20,36%) e no patinho (20,27%). Franco¹⁷ também relatou dados de teor de proteína para filé de carne de boi cru (16,20%), para lombo de carneiro (16%) e em pernil de porco cru (15,20%), inferiores aos do presente estudo. Os resultados encontrados neste trabalho apontam uma vantagem da carne bubalina para o consumidor, já que a carne é fonte de proteínas de elevado valor biológico. Os dados obtidos em base

Tabela 1. Composição centesimal e calórica de carne de búfalo, em base úmida e seca.

Composição Centesimal (g%)	Alcatra		Lombo Paulista		Chã de dentro	
	B.úmida*	B.seca**	B.úmida*	B.seca**	B.úmida*	B.seca**
Umidade	74,95(±1,63)	—	76,36(±2,48)	—	75,90(±1,75)	—
Proteína	21,67(±1,75)	86,51 ^a	21,32(±1,96)	90,19 ^b	20,85(±1,29)	86,51 ^a
Lipídeos	2,2(±0,81)	8,78 ^{ab}	1,83(±1,11)	7,74 ^b	2,18(±0,84)	9,05 ^a
Cinzas	1,14(±0,2)	4,55 ^a	1,08(±0,18)	4,57 ^a	1,2(±0,2)	4,98 ^a
Calorias (kcal)	106	—	102	—	103	—

* Média de 20 amostras analisadas em triplicata, com desvio padrão entre parênteses.

** Obtida através de cálculo

Valores na mesma linha com letras diferentes apresentam diferença significativa (p<0,05).

seca demonstram diferença significativa nos teores de proteínas do lombo paulista, em relação à alcatra e chã de dentro.

A carne de búfalo apresentou menores teores de lipídeos totais em relação a outras espécies. Os menores percentuais foram encontrados em lombo paulista que, em base seca, apresenta-se estatisticamente inferior aos detectados em chã de dentro e alcatra.

Em estudo realizado por Torres et al.¹⁶ com carne bovina, os teores lipídicos de contra-filé, acém e patinho corresponderam a 12,78%, 4,3% e 4,02%, respectivamente. Os autores detectaram níveis de 14,89% em lombo de porco; 9,32% em coxa de frango (sem osso) e 7,43% em coxa de peru (sem pele e sem osso). Apenas em peito de frango sem osso foram encontrados valores similares (1,84%) aos detectados no lombo paulista de carne de búfalo (1,83%) e no peito de peru (sem pele e sem osso) foram relatados valores inferiores aos da carne bubalina (1,53%).

A carne bubalina analisada também apresentou menor teor lipídico em relação ao contra-filé bovino (3%), pernil suíno (4,3%)¹⁸, e ao lombo e pernil suíno com 3% e 5%, respectivamente¹⁹; o mesmo ocorrendo em relação ao filé bovino cru com 24,4% e lombo de carneiro com 31%, de acordo com resultados relatados por Franco¹⁷.

Rodrigues et al.¹⁵ encontraram em carne de búfalo da raça *Mediterrâneo* um percentual de 8,9% de gordura, em base seca, valor similar aos detectados neste estudo, exceto para lombo paulista que apresentou percentual inferior. Estes autores consideram que há tendência da carne de búfalo apresentar menor teor de gordura que bovinos, podendo contribuir para a saúde, minimizando os problemas cardiovasculares. A ênfase atual em nutrição humana é focada no sentido de uma ingestão reduzida de gorduras. Tanto o National Cholesterol Education Program²⁰ quanto a III Diretrizes Brasileiras Sobre Dislipidemias²¹ recomendam um consumo de gordura total dentro de um limite de 30% do valor calórico total.

Ferrara e Infascelli²² descreveram que a carne de búfalos apresenta menor teor de gordura intramuscular, além de maior maciez e capacidade de retenção de água do que a bovina; a esse fato atribuiu-se uma menor taxa de crescimento do diâmetro da fibra muscular associada à menor consistência do tecido conectivo. Muller et al. (1994), *apud* Rodrigues et al.¹⁵, não encontraram diferença de maciez entre a carne de búfalos *Mediterrâneo* e bovinos *Charolês*, com os búfalos apresentando gordura de marmoreio inferior aos bovinos. Salienta-se que essa raça bovina é de origem européia, cujo marmoreio é superior aos zebrúinos e búfalos.

Os teores de cinzas da carne de búfalo variaram entre 1,08% e 1,14%. Percentuais inferiores foram relatados por Torres et al.¹⁶ em acém e contra-filé bovino (0,93% e 0,82%), percentual similar foi encontrado em patinho (1,04%) e peito de frango (1,10%). Não foram detectadas diferenças significativas entre os teores de cinzas nos cortes analisados.

Com relação ao valor calórico, os resultados encontrados foram similares para os 3 cortes estudados: 106, 103 e 102 kcal para alcatra, chã de dentro e lombo paulista, respectivamente.

Colesterol

Na Tabela 2, encontram-se os resultados das concentrações de colesterol detectados no presente estudo. Ao compararmos os teores obtidos em base seca, podemos observar que dentre os cortes pesquisados, o de chã de dentro foi o que apresentou maiores valores, estatisticamente superiores ($p < 0,05$) aos detectados em alcatra e lombo paulista, os quais apresentaram percentuais estatisticamente similares ($p < 0,05$). É importante salientar que valores menores poderiam ser detectados através do método HPLC, por ser mais preciso e exato.

Os resultados obtidos no presente estudo foram mais elevados que os relatados por Bragagnolo e Rodriguez-Amaya²³ (51mg/100g em carne bovina) e Browning et al.²⁴ (64,5mg/100g no músculo *longissimus* e 76,2mg/100g, no músculo *semimembranosus*).

Valores mais elevados são referidos por Franco¹⁷ para carne bovina (123 mg/100g) e suína (102-368 mg/100g). Lira et al.¹⁸ encontraram concentrações de colesterol de 89,3mg/100g para o contra filé bovino e 92,7 mg/100g para o pernil suíno, valores superiores aos encontrados na carne de búfalo.

Pesquisas recentes vêm demonstrando a preocupação com os teores de colesterol em carnes e produtos cárneos^{25,12,23,18}. Entretanto, vale salientar que os teores de colesterol detectados nos cortes de carne de búfalo estão muito abaixo do limite recomendado pelo National Cholesterol Education Program²⁰ e III Diretrizes Brasileiras sobre Dislipidemias²¹, que recomendam uma ingestão de colesterol menor que 300mg/dia.

Ácidos graxos

O perfil de ácidos graxos encontrados nos cortes estudados é apresentado na Tabela 3. Foram detectados vinte e dois (22) ácidos graxos, oito saturados (8), quatro (4) monoinsaturados e dez (10) poliinsaturados. Sendo que houve predominância, em ordem decrescente e para todos os tipos de corte para: ácido oléico (C18:1), ácido esteárico (C18:0), ácido palmítico (C16:0), ácido linoléico (C18:2) e ácido araquidônico (C20:4).

Segundo a revisão de Monteiro²⁶, a composição dos ácidos graxos pode sofrer variações em função da espécie,

Tabela 2. Teores de colesterol em carne de búfalo.

Cortes	Colesterol(mg/100g)	
	base úmida*	base seca **
Alcatra	83,01 (±17,35)	331,37 ^a
Lombo Paulista	79,01 (±21,11)	334,22 ^a
Chã de dentro	86,70 (±15,48)	359,75 ^b

* Média de amostras analisadas em triplicata, com desvio-padrão entre parênteses.

** Obtida através de cálculos

Valores com letras diferentes apresentam diferença significativa ($p < 0,05$).

raça, sexo e alimentação. Nos ruminantes, como bovinos e ovinos, há maior predominância de ácidos graxos saturados, porque a microbiota do rúmen hidrogena extensivamente os ácidos graxos insaturados da dieta²⁶.

Nossos resultados apontam um aspecto positivo no perfil de ácidos graxos da carne de búfalo, uma vez que ácidos graxos essenciais e benéficos ao organismo humano foram detectados.

O ácido monoinsaturado oléico (C18:1), da família ômega 9, tem sido apontado como hipolipidêmico²⁷, o qual atua diminuindo as lipoproteínas de baixa densidade (LDL)²⁶, apresentando efeito hipocolesterolêmico e protetor contra o desenvolvimento de doença coronariana aterosclerótica. Há uma correlação direta entre a incidência e gravidade das lesões ateromatosas e as concentrações plasmáticas de LDL. Concentrações elevadas de colesterol plasmático aumentam o tempo da LDL na circulação²⁸. O ácido oléico também é utilizado

no organismo como fonte preferencial de energia metabolizável para o crescimento rápido²⁹.

O ácido graxo saturado esteárico (C18:0) é considerado não aterogênico, sendo hipocolesterolêmico²⁶. Este ácido graxo é convertido rapidamente a ácido oléico pelo organismo após sua ingestão e não afeta o colesterol plasmático (Bonanome e Grundy)³⁰. Ao ácido poliinsaturado linoléico ω-6 (C18:2) são atribuídos numerosos benefícios ao organismo^{31,32}.

Os ácidos graxos da série ômega 6 exercem importante papel fisiológico como potentes mediadores da inflamação e efeito benéfico sobre o sistema imune³¹.

O ácido graxo poliinsaturado araquidônico (C20:4) é considerado essencial. Tem papel central no processo inflamatório, pode ser convertido em eicosanóides (prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanas, lipoxinas), importantes em uma série de sistemas fisiológicos, como o renal, gastrointestinal, reprodutor e cardiovascular, além de ser

Tabela 3. Perfil de ácidos graxos da carne de búfalo.

Ácidos graxos	Teores %		
	Alcatra *	Lombo paulista*	Chã de dentro**
Caprílico (C8:0)	0,37 ^a (±0,29)	0,50 ^b (±0,26)	0,48 ^b (±0,12)
Cáprico (C10:0)	0,56 ^a (±0,21)	0,89 ^b (±0,28)	0,48 ^a (±0,21)
Laúrico (C12:0)	2,65 ^a (±3,34)	2,33 ^a (±4,12)	2,34 ^a (±3,81)
Mirístico (C14:0)	1,33 ^a (±1,02)	1,35 ^a (±1,35)	1,07 ^a (±1,06)
Pentadecanóico (C15:0)	0,36 ^a (±0,07)	0,38 ^a (±0,05)	0,35 ^a (±0,03)
Palmítico (C16:0)	16,21 ^a (±1,99)	16,90 ^a (±2,34)	14,88 ^b (±2,37)
Palmitoléico (C16:1) (É 7)	1,39 ^a (±0,50)	1,55 ^a (±0,48)	1,48 ^a (±0,49)
Margárico (C17:0)	0,93 ^a (±0,17)	0,87 ^a (±0,25)	0,81 ^a (±0,19)
Heptadecenóico (C17:1)	0,61 ^a (±0,16)	0,65 ^a (±0,15)	0,65 ^a (±0,20)
Esteárico (C18:0)	19,26 ^a (±2,19)	16,99 ^b (±2,01)	17,47 ^b (±3,06)
Oléico (C18:1) (É 9)	24,36 ^a (±3,40)	24,73 ^a (±4,16)	23,24 ^a (±4,28)
Vacênico (C18:1) (É 7)	2,69 ^a (±0,27)	2,58 ^a (±0,25)	2,56 ^a (±0,34)
Linoléico (C18:2) (É 6)	9,26 ^a (±1,79)	8,99 ^a (±2,86)	10,37(±2,01)
Linolênico (C18:3) (É 3)	2,56 ^a (±0,63)	3,07 ^a (±2,01)	2,61 ^a (±0,58)
Octadecatetraenóico (C18:4)	0,31 ^a (±0,06)	0,35 ^a (±0,07)	0,33 ^a (±0,05)
Eicosadienóico (C20:2) (É 6)	0,43 ^a (±0,12)	0,44 ^a (±0,21)	0,44 ^a (±0,15)
Eicosatrienóico (C20:3) (É 6)	0,77 ^a (±0,17)	0,86 ^a (±0,19)	0,87 ^a (±0,19)
Araquidônico (C20:4) (É 6)	3,60 ^a (±0,81)	3,75 ^a (±0,91)	3,88 ^a (±0,90)
Eicosatetraenóico(C20:4) (É 3)	0,21 ^a (±0,02)	0,14 ^b (±0,03)	0,29 ^a (±0,02)
Eicosapentaenóico (C20:5) (É 3)	1,79 ^a (±0,45)	1,83 ^a (±0,45)	1,73 ^a (±0,40)
Docosapentaenóico (C22:5) (É 3)	1,83 ^a (±0,38)	2,07 ^a (±0,53)	1,93 ^a (±0,46)
Docosahexaenóico (C22:6) (É 3)	0,22 ^a (±0,03)	0,25 ^a (±0,02)	0,22 ^a (±0,02)
Não identificados	10,52	11,14	13,76
Saturados	41,67(±3,12)	40,21(±4,81)	37,88(±5,27)
Monoinsaturados	29,05(±3,73)	29,51(±4,41)	27,93(±4,71)
Poliinsaturados	20,98(±3,93)	21,75(±4,62)	22,67(±4,33)
Razão ω 6/ ω 3	2,1 : 1	2 : 1	2,3 : 1
Poliinsaturados/saturados	0,50(±0,13)	0,54(±0,18)	0,60(±0,19)

* Média de 10 amostras analisadas em duplicata, com desvio-padrão entre parênteses.

** Média de 11 amostras analisadas em duplicata, com desvio-padrão entre parênteses.

Médias com letras diferentes, diferem estatisticamente, p<0,05.

mediador das respostas imune e inflamatória. É inibidor de proliferação celular e citotóxico²⁸. O ácido araquidônico participa na formação da bainha de mielina das terminações nervosas e de sua recomposição nos casos de esclerose múltipla³³.

Bragagnolo³⁴ detectou como principais ácidos graxos nas espécies suína e bovina (raças *Nelore*, *Beefalo* e *Canchim*), o oléico (18:1 ω -9), palmítico (16:0), esteárico (18:0) e linoléico (18:2 ω -6).

Vale salientar que o ácido graxo saturado palmítico foi o segundo predominante nestas espécies, sendo encontrado em proporções superiores às da carne de búfalo (22,6 a 26,2%). O ácido palmítico é considerado o principal ácido graxo responsável pela elevação do colesterol sérico³⁵, evidenciando vantagens na carne de búfalo em relação a estas espécies, pois um alto teor de gordura saturada é indesejável na dieta humana, visto que apresenta-se como fator dietético de risco para o desenvolvimento de doença coronariana aterosclerótica²⁸. Os ácidos esteárico e linoléico foram detectados em menores concentrações que na carne bubalina. Os percentuais de esteárico variaram entre 12,1% a 6,9% em suínos e 16,2% a 14,8% em bovinos e os teores do ácido linoléico situaram-se entre 16,2% e 14,8%, demonstrando mais um aspecto positivo sob o ponto de vista nutricional da carne de búfalo em relação a estas espécies.

Em ovinos, raça *Corriedale* e cruzamento *Ile de France x Corriedale*, foram identificados como principais ácidos graxos: oléico (30,90% e 34,14%), seguido de esteárico (18,35% e 21,90%), palmítico (15,72% e 15,0%) e linoléico (6,40% e 4,66%)²⁶.

Estes dados mostram semelhanças no perfil de ácidos graxos da carne ovina em relação a carne de búfalo.

Rodriguez et al.¹⁵ identificaram como principais ácidos graxos em búfalos raça *Mediterrâneo*, o oléico (34,7%), o palmítico (23,7%), o esteárico (18,0%) e o linoléico (6,85%). O ácido graxo monoinsaturado oléico foi detectado em proporção superior ao do nosso estudo, entretanto, é importante ressaltar que o segundo ácido graxo predominante foi o palmítico, o qual foi encontrado em percentual superior. O ácido graxo esteárico apresentou valores similares e o ácido graxo linoléico apresentou valores inferiores aos do presente estudo.

As porcentagens do ácido graxo poliinsaturado araquidônico (C20:4 ω 6) da carne de búfalo foram mais elevadas que os resultados obtidos para suínos em lombo, pernil e paleta, que corresponderam a 0,6%, 2,0% e 1,2%, respectivamente. Maiores, também, que os teores obtidos para bovinos da raça *Nelore* (0,5%), *Beefalo* (0,5%) e *Canchim* (0,4%)¹¹. Também verificou-se superioridade em relação aos resultados obtidos para búfalo raça *Mediterrâneo* (1,11%)⁶. Os ácidos graxos saturados láurico (C12:0) e mirístico (C14:0) foram detectados em pequenas concentrações em todos os cortes bubalinos testados. Tais ácidos graxos promovem hipercolesterolemia³⁶ e estão relacionados com o aumento, no soro sanguíneo, de lipoproteína de baixa densidade (LDL), resultando na incidência de doenças cardiovasculares e suas seqüelas, ao lado do

aumento dos níveis séricos de colesterol, levando a arteriosclerose³³.

Comparando-se as médias de C12:0 do presente trabalho com resultados de outras espécies, verificou-se percentuais inferiores em bovinos das raças *Nelore* (0,2%), *Beefalo* (0,2%) e *Canchim* (0,2%); em suínos (0,2%)³⁴; e também em ovinos, raça *Corriedale* (0,17%) e cruza *Ile de France x Corriedale* (0,16%)²⁶. Por outro lado, em relação aos teores de mirístico verifica-se que os resultados obtidos na carne de búfalo são inferiores aos encontrados em outras espécies. Para ovinos foram descritos 2,40% (raça *Corriedale*) e 2,35% (cruza *Ile de France x Corriedale*)²⁶. Em bovinos, encontraram-se percentuais de 3,5% (*Nelore*), 3,8% (*Beefalo*) e 4,7% (*Canchim*). Em búfalos raça *Mediterrâneo* verificou-se teores similares do ácido graxo mirístico em relação a este trabalho (0,97%)¹⁵.

Os ácidos graxos saturados encontrados nas amostras de alcatra, lombo paulista e chã de dentro representaram 41,67%, 40,21% e 37,88% dos ácidos graxos identificados, respectivamente. Rodrigues et al.¹⁵ detectaram em carne de búfalo da raça *Mediterrâneo* um total de 42,7% de ácidos graxos saturados. Este valor é superior ao detectado em nosso estudo e deve-se à maior proporção do ácido graxo palmítico da raça *Mediterrâneo*.

Em ovinos são relatados percentuais de ácidos graxos saturados totais de 46,84% (raça *Corriedale*) e 49,10% (cruza *Ile de France x Corriedale*)²⁶. Bragagnolo³⁴ detectou em suínos percentuais de 41,4% (lombo), 32,7% (pernil), 35,4% (paleta) e 38,8% (toucinho). No mesmo trabalho, encontraram-se em bovinos raças *Nelore*, *Beefalo* e *Canchim* percentuais de 47,8%, 47,4% e 48,0%, respectivamente, para estes ácidos graxos. Deve ser levado em conta, que 46% do total dos ácidos graxos saturados detectados na carne de búfalo corresponderam ao ácido esteárico, nos cortes de alcatra e chã de dentro e 42% em lombo paulista, evidenciando-se assim mais um fator positivo na carne de búfalo como opção de um alimento saudável.

Com relação aos ácidos monoinsaturados os valores obtidos corresponderam a 29,05%, 29,51% e 27,93%. Os percentuais desses ácidos graxos relatados em bovinos, raças *Nelore*, *Beefalo* e *Canchim* totalizaram 40,2%, 42,8% e 40,0%. Em suínos detectaram-se percentuais de 46,2% (lombo), 42,2% (pernil), 47,5% (paleta)³⁴. Em ovinos, foram encontrados percentuais de 34,60% (*Corriedale*) e 37,22% (*Ile de France x Corriedale*)²⁶. Rodriguez et al.¹⁵ detectaram 40,2% de ácidos graxos monoinsaturados em búfalos raça *Mediterrâneo*.

Quanto aos poliinsaturados, estes valores representaram 20,98%, 21,75% e 22,67% do total de ácidos graxos, respectivamente para alcatra, lombo paulista e chã de dentro. Monteiro²⁶ relatou em ovinos teores totais de poliinsaturados de 8,35% (raça *Corriedale*) e 6,02% (cruza *Ile de France x Corriedale*). Em bovinos, raças *Nelore*, *Beefalo* e *Canchim* foram relatados percentuais de poliinsaturados totais de 10,3%, 9,1% e 9,3%. Em suínos, detectaram-se percentuais de 12,5% (lombo), 25,1% (pernil), 16,9% (paleta)³⁴. Em búfalos da raça

Mediterrâneo foram encontrados 9,55% de ácido graxos poliinsaturados¹⁵, percentual inferior aos detectados em nosso estudo.

O ácido linolênico, da família ω -3, foi detectado em todos os cortes de carne analisados, em teores mais elevados que os encontrados por Bragagnolo³⁴ em carne bovina crua das raças *Nelore*, *Beefalo* e *Canchin*, que corresponderam a 0,6%, 0,7% e 0,7%, respectivamente. Superiores também aos valores encontrados por Rodriguez et al.¹⁵ em carne de búfalo da raça *Mediterrâneo* (0,45%).

O teor médio de ácidos graxos da família ômega 3 nos cortes analisados foi de 6,61 (alcatra), 7,36 (lombo paulista) e 6,78 (chã de dentro). Bragagnolo³⁴ relatou teores de ω 3 em bovinos de 3,3% (*Nelore*), 2,6% (*Beefalo*) e 3,4% (*Canchin*). Em suínos, foram detectados percentuais de 0,9% (lombo), 2,2% (pernil) e 1,1% (paleta).

Os ácidos graxos ômega 3 e ômega 6 apresentam efeitos hipocolesterolêmicos e reduzem os níveis de LDL. São os precursores de um conjunto de substâncias com atividades fisiológicas e farmacológicas denominadas eicosanóides, que abrangem as tromboxanas, prostaglandinas (que possuem efeitos hipotensores), prostaciclina (inibe a agregação plaquetária e aumenta o HDL) e leucotrienos. Equilíbrio entre a produção de prostaglandinas e tromboxanas inibe o aparecimento de doenças cardiovasculares³³. Esses ácidos são importantes na manutenção da hidratação da pele e essenciais às membranas, ao bom funcionamento da vista, através da retina, ao desenvolvimento do cérebro e do sistema nervoso, e dos fosfolípidos existentes no organismo. Auxiliam no controle de fatores de risco das moléstias cardíacas e vasculares, desde que em proporções adequadas³⁷. Epidemiologicamente, os ácidos graxos poliinsaturados ômega 3 mostram efeito benéfico na prevenção de vários tipos de câncer²⁸.

Quanto aos percentuais da família ômega 6, corresponderam a 14,06 (alcatra), 14,04 (lombo paulista) e 15,56 (chã de dentro). Em bovinos, estes valores corresponderam a 6,3% (*Nelore*), 6,2% (*Beefalo*) e 5,2% (*Canchim*). Em suínos, detectaram-se percentuais de 11,4% (lombo), 22,7% (pernil) e 15,6% (paleta)³⁴.

O efeito biológico dos ácidos graxos essenciais depende da razão entre os ácidos das famílias ω 6/ ω 3 presentes nos fosfolípidos que constituem as membranas. A Japan Society of Lipid Nutrition recomenda que a razão ω 6/ ω 3 seja de 4:1 para adultos saudáveis e de 2:1 na prevenção de doenças crônicas em idosos³⁸. No presente trabalho, a proporção de ácidos graxos poliinsaturados ω 6/ ω 3 encontrada foi de 2:1.

Os valores encontrados para a razão poliinsaturados/saturados no presente estudo são superiores ao mínimo recomendado pelo British Department of Health³⁹ para a dieta total, que é de 0,45.

A preocupação das pessoas com o consumo de carne vêm aumentando nos últimos anos, na medida em que os hábitos alimentares contribuem para a etiologia dos problemas cardiovasculares. Os resultados obtidos neste trabalho

apontaram vantagens no consumo de carne de búfalo sob o ponto de vista nutricional em relação à de bovinos e suínos.

Neste contexto, o incentivo à produtividade do rebanho bubalino surge como alternativa promissora para aumentar a oferta de carne de qualidade para consumo e, conseqüentemente, atender melhor à demanda de proteína animal.

CONCLUSÕES

Tendo como base os resultados obtidos, e nas condições em que o trabalho foi realizado, pode-se concluir que:

Todos os cortes de carne de búfalo analisados apresentaram elevados teores de umidade, proteínas, cinzas e baixos teores de lipídeos quando comparada a outras espécies. Os teores de colesterol estão muito abaixo do limite recomendado de 300 mg/dia. Os principais ácidos graxos encontrados para todos os tipos de corte foram: oléico (C18:1), esteárico (C18:0), palmítico (C16:0), linoléico (C18:2) e araquidônico (C20:4). O perfil de ácidos graxos obtido a coloca como opção de um alimento saudável em comparação com outras espécies. A carne de búfalo apresenta-se como fonte de ácidos graxos hipocolesterolêmicos e a razão encontrada entre os ácidos graxos ω 6/ ω 3 e a relação poliinsaturados/saturados nos cortes analisados estão dentro dos padrões recomendados.

As informações contidas no trabalho são muito importantes tanto do ponto de vista nutricional quanto econômico e poderão contribuir para uma maior difusão da carne de búfalo no país. Os resultados obtidos justificam o estabelecimento de políticas públicas de incentivo à criação de búfalos e melhoria de produtividade do rebanho bubalino.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Alagoas (FAPEAL) pelo auxílio financeiro; ao PIBIC/CNPq/UFAL pelas Bolsas de Iniciação Científica concedidas às alunas; ao Sr. Alberto Couto, proprietário da Fazenda Castanha Grande, por ter cedido as amostras para análises.

REFERÊNCIAS

1. Zarkadas, CG; Marshall, W D; Khalili, AD; Ngugen, O; Karatzas, CN; Khanizadel, S. Mineral composition of selected bovine, porcine and avian muscles and meat products. *J. Food Sci.*, 52(3): 520-25, 1987.
2. Torres, EAFS; Machado, FMS. Alimentos em questão. 1ª ed. São Paulo, Ponto Crítico, 2001. p.12-6.
3. Pedro, NAR; Fili, SP; Oliveira, E. Determinação de nutrientes minerais em alguns produtos cárneos. *Braz. J. Food Technol.*, 3: 121-27, 2000.
4. Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiróz. Os Búfalos. São Paulo, Ed. FEALQ, 1981. 185p.

5. Peixoto, MRS; Sousa, CL. Otimização e caracterização físico-química, microbiológica e sensorial de apresentado bubalino e bovino. In: XVIII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre. Anais do XVIII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos; 2002, p.730-34.
6. Miranda, WC. A criação de búfalos no Brasil. São Paulo, Editora dos Criadores Ltda, 1986. p.173.
7. Gonçalves, AA; Canellas, LC. Diagnóstico da comercialização de carne de búfalo na cidade de Porto Alegre (RS). In: XVIII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre. Anais do XVIII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2002: 135-8.
8. AOAC – Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis of AOAC. 15 th edition. Washington D.C., 1990, chopten 109p.
9. Folch, J; Lees, M; Sloanne Stanley, GH. A simple method for the isolation and purification of total lipide from animal tissues. J. Biol. Chem., Baltimore, 226: 497-509, 1957.
10. Brasil. Leis, Decretos, etc. Portaria nº33 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 I, nº 60- E, p. 5-6. Adota os valores constantes das tabelas do anexo desta portaria como níveis de IDR (Ingestão Diária Recomendada) para as vitaminas, minerais e proteínas.
11. Bohac, CE, Rhee, KS, Cross, HR, Ono, K. Assesment of methodologies for colorimetric cholesterol assay of meats. J. Food Sci. 1988; Chicago, 53: 1642 – 44.
12. Bragagnolo, N. Determinação dos teores de colesterol em carnes e massas com ovos. Campinas, 1992.105 p. [Dissertação de Mestrado de Engenharia de Alimentos - Universidade Estadual de Campinas].
13. Searcy, RL, Bergquist, LM. A new color reaction for the quantitation of serum cholesterol. Clin. Chim. Acta, 1960; 5:192-99.
14. Hartman, L; Lago, BCA. Rapid preparation of fatty methyl esters from lipids. Lab. Pract., 22: 475-77, 1973.
15. Rodrigues, VC; Bressan, MC; Cardoso, MG; Freitas, RTF. Ácidos graxos na carne de búfalos e bovinos castrados e inteiros. R. Bras. Zoot. 33(2): 434-43,2004.
16. Torres, EAFS, Campos, NC, Duarte, M; Garbelotti, ML, Philippi, ST, Rodrigues, SM. Composição centesimal e valor calórico de alimentos de origem animal. Ciênc. Tecnol. Aliment., 20(2): 145-50, 2000.
17. Franco, G. Tabela de Composição Química dos Alimentos, 8º ed. Rio de Janeiro, Livraria Atheneu, p. 155-69, 1992.
18. Lira, GM; Sant’ana, AEG; Araújo, DCS; Menezes, MES; Oliveira, FR. Determinação de lipídios e colesterol em carnes bovina e suína comercializadas em Maceió. Nutrire: Rev. Soc. Bras. Alim. Nutr./J. Brazilian Soc. Food Nutr., 21: 7-16, 2001.
19. Bragagnolo, N; Rodriguez-Amaya, DB. Teores de colesterol, lipídios totais e ácidos graxos em cortes de carne suína. Ciênc. Tecnol. Aliment., 22(1):98-104, 2002.
20. National Cholesterol Education Program. Report of the National Cholesterol Education Program expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults. Arch. Int. Med.,148: 36-9, 1988.
21. III Diretrizes Brasileiras Sobre Dislipidemias e Diretriz de Prevenção da Aterosclerose do Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. Arq. Bras. Cardiol. 77: 2001.
22. Ferrara, B; Infascell, F. Buffalo meat production. World Buffalo Congress.1994, São Paulo. Proceedings... São Paulo: FAO/FINEP, 1: 122-136.
23. Bragagnolo, N; Rodriguez – Amaya, DB. Teores de colesterol em carne suína e bovina e efeito do cozimento. Ciênc. Tecnol. Aliment. v.15, p. 11-17, 1995.
24. Browning, MA; Huffman, DL; Egbert, WR; Jungst, SB. Physical and compositional characteristics of beef carcasses selected for leanness. J Food Sci. 55(1): 9-14, 1990.
25. Madruga, MS; Figueirido, MJ; Nunes, ML; Lima, FMS. Teores de colesterol de linguiças de frango “light” e tradicionais submetidas a diferentes condições de estocagem. Ciênc. Tecnol. Aliment. 24 (4): 527 - 31, 2004.
26. Monteiro, EM. Influência do cruzamento Ile de France x Corriedale (F1) nos parâmetros de qualidade da carne de cordeiro. São Paulo, 1998. 99p [Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo].
27. Spector, AA. Essentialy of fatty acids. Lipids, 34, Supplement, 1999.
28. Curi, R; Pompéia, C; Miyasaka, K; Procopio, J. Entendendo as Gorduras – Os Ácidos Graxos. São Paulo, Editora Manole Ltda. 1º ed., 2002.
29. Oda, SHI; Bressan, MC; Cardoso, MG; Freitas, RTF; Miguel, GZ; Faria, PB; et al. Efeitos dos métodos de abate e sexo na composição centesimal, perfil de ácidos graxos e colesterol da carne de capivaras. Ciênc. Tecnol. Aliment. 24(2): 236-42, 2004.
30. Bonanome, AMD; Grundy SM. Effect of dietary stearic acid on plasma cholesterol and lipoprotein levels. New England J Medicine, 318 (19): 1244-7. 1988.
31. Pompéia, C; Procopio, J; Curi, R. Fatty acids and the immune system. Rev. Bras. Ciênc. Farm./Braz. J. Pharm. Sci., 35(2): 165-94, 1999.
32. British Nutrition Foundations. Unsaturated fatty acids: nutritional and physiological significance; the report of the British Nutrition Foundation’s Task Force. London: Chapman & Hall, 1994. 211p.
33. Turatti, JM; Gomes, RAR; Athié, I. LIPÍDEOS: Aspectos funcionais e novas tendências. Campinas: ITAL, 2002. 78p.
34. Bragagnolo, N. Fatores que influenciam o nível de colesterol, lipídios totais e composição de ácidos graxos em camarão e carne. Campinas, 1997.123 p. [Tese de Doutorado em Ciência de Alimentos. Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas].
35. Paleari, MA; Camisasca, S; Beretta, G; Renan, P; Corisco, P; Bertolo, G; Crivelli, G. Ostrich meat physico chemical characteristics and comparison with turkey and bovine meat. Meat Sci. 48 (3/4): 205-10,1998.
36. Lima, FEL; Menezes, TN; Tavares, MP; Szarfarc, SC; Fisberg, RM. Ácidos graxos e doenças cardiovasculares: uma revisão. Rev. Nutr. Campinas, 13(2): 73-80, 2000.
37. Belda, MCR; Pourchet-Campos, MA. Ácidos graxos essenciais em nutrição: uma visão atualizada. Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, 11(1): 5-35, 1991.
38. Uauy, R; Mena, P; Valenzuela, A. Essential fatty acids as determinants of lipids requeriments in infants, children and adults. European J. Clin. Nutrition. 53 (1):66-67, 1999.
39. British Department of Health. Nutritional of cardiovascular diseases. Report on health and social subjects, nº 46. London, 1994.

Níveis de chumbo na água para consumo em escolas municipais da cidade de São Paulo

Lead levels in drinking water consumed in municipal schools of São Paulo city

RIALA6/1014

Maria de Fátima Henriques CARVALHO^{1*}; Maria Cristina DURAN¹; Paulo TIGLEA¹; Márcia Liane BUZZO¹; Carmen Silvia KIRA¹.

* Endereço para correspondência: ¹Seção de Equipamentos Especializados, Instituto Adolfo Lutz, Seção de Equipamentos Especializados, Av Dr. Arnaldo, 355 – São Paulo – SP CEP 01246-902, tel 011-3068-2923, e-mail: mcarvalh@ial.sp.gov.br
Recebido: 31/03/2005 – Aceito para publicação: 30/06/2005.

RESUMO

A água para consumo humano é uma das fontes possíveis de exposição ao chumbo em áreas urbanas, sendo as crianças mais suscetíveis quando expostas ao metal, comparadas aos adultos. O presente estudo teve como objetivos avaliar a concentração de chumbo em água consumida nas escolas públicas da cidade de São Paulo e comparar as concentrações do metal em amostras coletadas imediatamente ao início do escoamento da água e após dois minutos de escoamento contínuo. O chumbo foi determinado por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GFAAS), com aquecimento transversal e corretor de fundo com efeito Zeeman. Amostras de água de doze escolas foram avaliadas e, dentre estas, duas continham chumbo acima do limite estabelecido pela legislação brasileira (0,01 mg.L⁻¹). Nestes pontos de coleta, amostras também foram tomadas após o escoamento de água de dois minutos e apresentaram concentrações de chumbo abaixo de 0,01 mg.L⁻¹. Ações corretivas foram implementadas nas escolas que haviam apresentado o problema e análises subsequentes mostraram que o nível de chumbo na água estava abaixo do limite de quantificação do método analítico (0,001 mg.L⁻¹), indicando a adequação das medidas, tornando a água satisfatória para o consumo humano.

Palavras-Chave. chumbo, água para consumo, escolas, absorção atômica, São Paulo.

ABSTRACT

Drinking water is one of the possible sources of lead exposure in urban areas. Children are more susceptible when exposed to this metal. The purpose of the present study was to assess the concentration of lead in drinking water consumed in municipal schools of São Paulo. The concentrations of lead in samples collected immediately after opening the faucet were compared with those lead levels in water collected after two minutes in continuous flowing. Lead concentration was determined by graphite furnace atomic absorption spectrometry (GFAAS), with transversal heating and Zeeman background correction. Among twelve surveyed schools, the water samples from two schools contained lead levels above the limits determined by Brazilian legislation (0.01 mg.L⁻¹). After two minutes of continuous flowing, lead concentrations in these locals were below 0.01 mg.L⁻¹. Corrective actions in water distribution system of these schools were implemented, and after subsequent analysis, lead concentrations were below the quantification limit of the method (0.001 mg.L⁻¹), indicating that these actions were appropriated in order to make the water suitable for human consumption.

Key Words. lead, drinking water, schools, atomic absorption spectrometry, GFAAS.

INTRODUÇÃO

A água para consumo é uma das fontes possíveis de exposição ao chumbo nas áreas urbanas. A contaminação pode ocorrer por migração do metal presente no material utilizado no sistema hidráulico dos edifícios. Fatores como a temperatura e composição da água podem influenciar na liberação dos metais. Desta forma, o material usado para a distribuição da água não deve ceder substâncias que causem riscos à saúde humana e deve ser resistente à corrosão¹. De modo geral, a água com maior alcalinidade e dureza é considerada menos corrosiva em tubulações metálicas². Há, portanto, a necessidade que a água dos reservatórios do sistema de abastecimento, colunas de distribuição e pontos de fornecimento para o consumo, tais como torneiras e bebedouros, sofra verificação periódica de potabilidade. O dimensionamento do sistema hidráulico deve ser proporcional ao consumo, para garantir a potabilidade da água, com a finalidade de reduzir o tempo de armazenamento nos reservatórios, tubulações e acessórios.

O grau de exposição ao chumbo depende principalmente da dose, frequência e fatores individuais de risco. As fontes mais comuns de exposição a este metal são o solo, ar, água para consumo, alimentos, ocupação e hábitos de lazer. Em estudos epidemiológicos alguns desses fatores de risco à exposição ao chumbo podem prevalecer independentemente, ou influenciar em combinação com outros fatores. O chumbo é acumulativo no organismo, e quando ingerido de forma contínua, mesmo em baixas concentrações, pode provocar alterações na síntese do heme e distúrbios no sistema nervoso. As crianças são mais suscetíveis à absorção do chumbo em relação aos adultos, e podem sofrer efeitos neurológicos, retardo no desenvolvimento psicomotor e dificuldades de aprendizagem, entre outras conseqüências³.

No Brasil, as instalações hidráulicas prediais para água fria, para uso e consumo humano, devem seguir a Norma Técnica NBR 5626/92⁴, com a finalidade de atender às exigências mínimas de higiene, segurança, economia e conforto dos usuários. O Ministério da Saúde, por meio da Resolução N° 105, aprovou como critério geral para os equipamentos plásticos fixos de provisão, armazenamento e distribuição de água potável, que estes não devem ceder substâncias em quantidades que impliquem em risco para a saúde humana, incluindo os metais⁵.

Devido à alta toxicidade do chumbo, a legislação brasileira estabeleceu em 1990 o limite máximo de 0,05 mg.L⁻¹ para água de consumo. Em revisão de 2000, o Ministério da Saúde reduziu o limite tolerado para o chumbo para 0,01 mg.L⁻¹ de água para consumo. Este limite foi mantido na Portaria N° 518 de 25 de março de 2004, que estabeleceu os atuais padrões de potabilidade para água⁶⁻⁸.

O objetivo deste estudo foi reavaliar as concentrações de chumbo em água consumida em escolas localizadas em várias regiões da cidade de São Paulo, abastecidas pela rede pública que, em estudo anteriormente realizado por Teixeira⁹, apresentaram níveis acima dos limites estabelecidos pela

legislação, com a finalidade de verificar a situação mais atualizada de contaminação por esse metal, que pudesse resultar em fonte de exposição das crianças em idade escolar, e subsidiar as medidas corretivas para a solução dos problemas encontrados. O presente estudo também comparou as concentrações do metal em amostras coletadas imediatamente ao início do escoamento da água e após dois minutos de escoamento contínuo.

MATERIAL E MÉTODOS

A partir dos resultados obtidos por Teixeira⁹, que analisou amostras de água de 100 escolas municipais da cidade de São Paulo, foram solicitadas análises de água pelas Secretarias Municipais da Saúde e da Educação da cidade de São Paulo em doze escolas públicas do município abastecidas com água da Rede Pública, que apresentaram níveis de chumbo acima de 0,01 mg.L⁻¹ na água para o consumo. Todas as amostras foram coletadas pelo Serviço Municipal de Abastecimento (SEMAB) – Departamento de Inspeção Municipal de Alimentos (DIMA), nos períodos de junho de 2002 e junho de 2003, e os ensaios de chumbo foram realizados no Instituto Adolfo Lutz.

As amostras foram coletadas em pontos de maior consumo: cozinha e bebedouros, e para efeito de comparação, foram também tomadas amostras dos cavaletes ou do ponto mais próximo destes. Além disso, em dois estabelecimentos existiam poços já desativados, cujas águas também foram analisadas.

Em cada ponto de saída de água, as amostras foram coletadas em dois frascos de polietileno de 100 mL, que foram previamente descontaminados quimicamente em HNO₃ e enxaguados com água destilada e desionizada. Aos frascos adicionou-se HNO₃ como conservante das amostras, de modo a obter concentração final a 0,2% em ácido.

Em todas as escolas selecionadas, as torneiras foram mantidas fechadas por um período mínimo de sete horas antes da coleta da amostra. Em cada ponto de coleta, foram retiradas amostras em dois frascos identificados como “a” e “b”, de primeiro jato, isto é, sem escoamento prévio do conteúdo estagnado no sistema. As amostras do segundo jato foram tomadas após dois minutos de escoamento, e os dois frascos retirados também foram identificados como “a” e “b”.

Posteriormente, após a implementação de ações corretivas no sistema de distribuição de água das escolas que na primeira avaliação apresentaram chumbo acima do limite estabelecido, novas coletas de amostras foram feitas, com a finalidade de avaliar a eficácia das medidas adotadas.

Para a determinação de chumbo, utilizou-se Espectrômetro de Absorção Atômica com Forno de Grafite (GFAAS), com aquecimento transversal e corretor de fundo com efeito Zeeman, modelo SIMAA 6000, marca Perkin Elmer. O programa térmico utilizado encontra-se na Tabela 1. O método empregado foi previamente validado. Para avaliar a exatidão

utilizou-se o Material de Referência Certificado de água do National Institute of Standards and Technology (NIST), SRM 1643c, Trace Elements in Water. Os valores certificado e obtido foram respectivamente, $0,01815 \pm 0,00064 \text{ mg.L}^{-1}$ e $0,0184 \pm 0,00101 \text{ mg.L}^{-1}$. O limite de quantificação do método foi de $0,001 \text{ mg.L}^{-1}$, calculado como dez vezes o desvio-padrão de dez medições de um branco. As análises foram realizadas diretamente sem tratamento prévio. Como modificador químico utilizou-se uma mistura de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ e $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, com concentrações finais de 0,5% e 0,03%, respectivamente. Os volumes injetados de amostra e modificador químico foram 20 μL e 10 μL , respectivamente. A faixa de trabalho utilizada foi de 0,003 a $0,012 \text{ mg.L}^{-1}$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Teixeira⁹ avaliou os níveis de chumbo em amostras de água para consumo, coletadas em Escolas Públicas do Município de São Paulo, e encontrou níveis de chumbo acima do limite tolerado pela legislação brasileira em vigor, em 11% das amostras analisadas.

Estas escolas são freqüentadas por alunos na faixa etária de 7 a 14 anos, onde recebem merenda escolar preparada no local e consomem água dos bebedouros, constituindo deste modo o subgrupo da população mais sensível à contaminação por chumbo.

Os resultados obtidos para cada amostra analisada no presente trabalho, das escolas selecionadas pelas autoridades municipais, estão descritos na Tabela 2.

Entre as amostras analisadas, somente quatro, tomadas nas escolas 1 e 4, apresentaram concentrações de chumbo que excederam o limite máximo de $0,01 \text{ mg.L}^{-1}$, fixado pela legislação em vigor para água para o consumo. As águas das demais escolas apresentaram-se satisfatórias com relação ao chumbo.

Para a escola 1, as amostras “a”, do primeiro jato, nos três pontos de amostragem apresentaram concentrações de chumbo acima do limite estabelecido pela legislação vigente; na escola 4, somente na amostra “a” do bebedouro foi encontrada concentração de chumbo maior que $0,01 \text{ mg.L}^{-1}$.

Para as escolas 1 e 4, o Órgão Municipal de Saúde encaminhou sugestões para a substituição de componentes

do sistema hidráulico, com a finalidade de reduzir a contaminação por chumbo na água para o consumo. As repetições das análises, feitas para estas escolas, estão inseridas no final da Tabela 2. As concentrações obtidas para o chumbo nesta avaliação encontravam-se abaixo do limite de quantificação do método, indicando que as ações corretivas tomadas foram eficientes.

Nas escolas em que foi detectada a presença de chumbo, observou-se que a amostra “a”, do primeiro jato, referente aos primeiros 100 mL apresentou concentração maior que a amostra “b”. Fato semelhante foi constatado por Gulson et al.¹⁰ que encontraram que a contaminação por chumbo pode estar presente na água estagnada no sistema de encanamento como torneiras, canos, soldas, conexões, entre outros.

Verificou-se que nos três pontos de amostragem de uma mesma escola as concentrações de chumbo foram superiores nos primeiros 100 mL coletados, indicando que o problema estaria muito próximo do ponto de saída. Portanto, no presente estudo, a presença de chumbo poderia ser atribuída aos dispositivos de saída das tubulações, torneiras, bebedouros e soldas.

Conforme pode ser observado na Tabela 2, todas as amostras coletadas após o tempo de dois minutos (2º jato), apresentaram concentrações de chumbo abaixo do limite de quantificação, indicando que o escoamento da água tornou a qualidade da mesma satisfatória.

Segundo o EPA (EUA)¹¹, Environmental Protection Agency, no caso de comprovação ou suspeita de contaminação da água por chumbo nas escolas e construções não-residenciais, recomenda-se como ação imediata a abertura das torneiras, por no mínimo dois minutos, antes do consumo. Desta forma é possível que a água retida nas tubulações por um certo período de tempo seja totalmente escoada, garantindo a segurança no preparo de alimentos ou ingestão. Recomenda-se também que o escoamento seja feito em cada saída de água potável. O reparo do sistema de distribuição seria recomendado em casos analisados particularmente como de maior risco. Esta recomendação poderia ser a solução mais rápida e de baixo custo para a potencial contaminação por chumbo, porém implicaria em desperdício de água tratada, caso a água do escoamento não fosse aproveitada para limpeza ou outra finalidade não potável.

Tabela 1. Programa térmico utilizado para determinação de chumbo em água por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite.

Temperatura (°C)	Rampa (s)	Patamar (s)	Fluxo de gás	Leitura
110	20	40	250	
130	15	45	250	
700	10	20	250	
1500	0	5	0	X
2550	1	5	250	

Tabela 2. Concentração de chumbo em amostras de água coletadas em diferentes pontos das escolas públicas municipais

escola	amostra	Concentração de chumbo (mg.L ⁻¹)					
		cozinha (primeiro jato)	cozinha (segundo jato)	bebedouro (primeiro jato)	bebedouro (segundo jato)	cavalete	poço
1	a	0,019	ND	0,011	ND	0,068	ND
	b	0,004	ND	0,006	ND	ND	ND
2	a	0,001	ND	ND	ND	ND	-
	b	ND	ND	ND	ND	ND	-
3	a	ND	ND	ND	ND	ND	-
	b	ND	ND	ND	ND	ND	-
4	a	0,002	ND	0,026	ND	ND	-
	b	ND	ND	0,002	ND	ND	-
5	a	ND	ND	0,004	ND	ND	-
	b	ND	ND	ND	ND	ND	-
6	a	0,001	ND	0,007	ND	0,002	0,002
	b	ND	ND	0,002	ND	0,004	0,001
7	a	ND	ND	0,002	ND	ND	-
	b	ND	ND	ND	ND	ND	-
8	a	0,008	ND	0,002	ND	ND	-
	b	0,004	ND	ND	ND	ND	-
9	a	ND	ND	ND	ND	ND	-
	b	ND	ND	0,001	ND	ND	-
10	a	ND	ND	ND	ND	ND	-
	b	ND	ND	ND	ND	ND	-
11	a	0,003	ND	ND	ND	ND	-
	b	0,003	ND	ND	ND	ND	-
12	a	ND	ND	0,003	ND	ND	-
	b	0,002	ND	0,002	ND	ND	-
1*	a	ND	ND	ND	ND	ND	-
	b	ND	ND	ND	ND	ND	-
4*	a	ND	ND	ND	ND	ND	-
	b	ND	ND	ND	ND	ND	-

ND (não detectado): abaixo do limite de quantificação do método de 0,001 mg.L⁻¹

a: frasco contendo os primeiros 100 mL de amostra coletados

b: frasco contendo amostra coletada após os primeiros 100 mL de amostra coletados

primeiro jato: amostra coletada sem escoamento prévio

segundo jato: amostra coletada com escoamento prévio de 2 minutos

* após modificações efetuadas no sistema hidráulico

CONCLUSÕES

Das doze escolas avaliadas apenas duas apresentaram concentrações de chumbo acima do limite máximo estabelecido pela legislação vigente. As ações corretivas implementadas foram consideradas adequadas e positivas, tornando a água satisfatória para o consumo, com relação ao chumbo.

As amostras coletadas imediatamente após a abertura das saídas de água apresentaram concentração de chumbo mais elevada. O consumo de água contaminada por chumbo devido ao contato com o material do sistema de distribuição, ou componentes dos pontos de saída, pode ser evitada, utilizando-

se a água para o consumo e preparo de alimentos, após o escoamento prévio por cerca de dois minutos do conteúdo inicialmente contido no sistema.

Um programa de monitorização contínua da presença de metais tóxicos nas águas de creches e escolas privadas e públicas, com o objetivo de recomendar ações corretivas nos pontos contaminados, seria de interesse para avaliar a segurança de consumo de água pela população infantil, mais suscetível à exposição, em idade de desenvolvimento físico e mental. O programa deveria incluir a padronização do procedimento de coleta de amostra, para avaliar comparativamente a potabilidade das águas das escolas.

REFERÊNCIAS

1. Gnaedinger RH. Lead in school drinking water. *J Environ Health* 1993; 55(6): 15-9.
2. Patch SC, Maas RP, Pope JP. Lead leaching from faucet fixtures under residential conditions. *J Environ Res* 1998; 61(3): 18-22.
3. Paoliello MMB, Capitani EM, Cunha FG, Matsuo T, Carvalho MF, Sakuma A et al. Exposure of children to lead and cadmium from a mining area of Brazil. *Environ Res* 2002; 88: 120-8.
4. Associação Brasileira de Normas Técnicas [ABNT]. NBR 5626: Instalação predial de água fria. Normas ABNT sobre documentação. Rio de Janeiro; 1992.
5. Brasil. Resolução nº 105, de 19 de maio de 1999. Aprova os regulamentos técnicos: Disposições gerais para embalagens e equipamentos plásticos em contato com alimentos e seus anexos. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 20 mai. 1999. Seção 1, p. 21-34.
6. Brasil. Portaria nº 518, de 25 de março de 2004. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 26 mar. 2004. Seção 1.
7. Brasil. Portaria nº 1469, de 29 de dezembro de 2000. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 02 jan. 2001. Seção 1, p. 19.
8. Brasil. Portaria nº 36, de 19 de janeiro de 2000. Aprova normas e o padrão de potabilidade da água destinada ao consumo humano, a serem observados em todo o território nacional. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 23 jan. 1990. Seção 1, p. 1651.
9. Teixeira PJ. Determinação de chumbo em amostras de água coletadas em escolas públicas do município de São Paulo [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2001. 73pp.
10. Gulson BL, Law AJ, Korrsch MJ, Mizon KJ. Effect of plumbing systems on lead content of drinking water and contribution to lead body burden. *Sci Total Environ* 1994; 144: 279-84.
11. Environmental Protection Agency [EPA]. Plomo en el agua potable: Lo que usted puede hacer para reducir el plomo en el agua potable. [cited 2005 Mar 16]. Available from: URL: <http://www.epa.gov/safewater/agua/plomo.html>

Determinação simultânea de chumbo e cádmio em sangue por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite

Simultaneous determination of lead and cadmium in blood by graphite furnace atomic absorption spectrometry

RIALA6/1015

Maria de Fátima H. CARVALHO*; Franca D. de MAIO; Maria Cristina DURAN; Carmen S. KIRA; Isaura A. OKADA

* Endereço para correspondência: Instituto Adolfo Lutz, Seção de Equipamentos Especializados
Av Dr. Arnaldo, 355, Cerqueira César, São Paulo/SP, Brasil CEP 01246-902. Tel: (55 11) 3068 2923 e-mail:
mcarvalh@ial.sp.gov.br.
Instituto Adolfo Lutz, Seção de Equipamentos Especializados.
Recebido: 19/08/2004 – Aceito para publicação: 24/06/2005.

RESUMO

O sangue é o indicador biológico mais utilizado para avaliar a exposição humana recente ao chumbo e ao cádmio. A espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GFAAS) é uma escolha apropriada para a determinação desses metais em sangue de crianças, em função da capacidade de detectar baixas concentrações e pequeno consumo de amostra. O objetivo deste estudo foi desenvolver e validar uma metodologia para a determinação simultânea de chumbo e cádmio em sangue por GFAAS. O sangue total foi diluído em uma solução de Triton X-100 em HNO₃ e uma solução de NH₄H₂PO₄ e Mg(NO₃)₂ foi utilizada como modificador químico. As condições analíticas foram otimizadas e as melhores temperaturas de pirólise e atomização foram respectivamente, 500 °C e 1500 °C. Para validação da metodologia foram utilizados os materiais de referência certificados NIST SRM 955b (Lead in bovine blood) e SRM 966 (Toxic metals in bovine blood). Foram avaliados os seguintes parâmetros para o chumbo e o cádmio, respectivamente: linearidade (5,0 a 100,0 µg.L⁻¹ e 0,3 a 3,0 µg.L⁻¹), exatidão (99,9% e 97,7%), precisão (CV = 3% e 13%), limite de detecção (5,4 µg.L⁻¹ e 0,06 µg.L⁻¹) e limite de quantificação (18,4 µg.L⁻¹ e 2,1 µg.L⁻¹). O método proposto é rápido, sensível e adequado para a determinação simultânea de chumbo e cádmio em sangue de trabalhadores e de populações expostas, incluindo crianças.

Palavras-Chave. chumbo, cádmio, sangue, forno de grafite, AAS, validação.

ABSTRACT

Blood lead and cadmium levels have been used to evaluate recent human exposure to these metals. Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry (GFAAS) is the most suitable technique for lead and cadmium determinations in biological fluids due to its ability in detecting low concentrations of metals, and for using small amount of sample. The objective of this study was to establish and to validate a methodology for simultaneous determination of lead and cadmium in blood by GFAAS technique. Blood samples were diluted with Triton X-100 in HNO₃, and a mixture of NH₄H₂PO₄ and Mg(NO₃)₂ solutions was used as chemical modifier. The analytical conditions were optimized and the best pyrolysis and atomization temperatures were 500°C and 1500°C, respectively. For validation, certified reference materials NIST SRM 955b (Lead in bovine blood) and NIST SRM 966 (Toxic metals in bovine blood) were used. The evaluated parameters for lead and cadmium were: linearity (5.0 to 100.0 µg.L⁻¹ and 0.3 to 3.0 µg.L⁻¹), accuracy (99.9% and 97.7%), precision (RSD = 3% and 13%), detection limit (0.54 µg.L⁻¹ and 0.06 µg.L⁻¹), and quantification limit (1.8 µg.L⁻¹ and 0.21 µg.L⁻¹), respectively. The proposed method is fast, sensitive and suitable for simultaneous determination of lead and cadmium in blood samples from populations with occupational or environmental exposure, including children.

Key Words. lead, cadmium, blood, graphite furnace, AAS, validation.

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de metodologias analíticas para a determinação de chumbo e cádmio em alimentos, águas ou fluidos biológicos apresenta grande importância uma vez que estes metais são bastante empregados na indústria, sendo então disseminados no meio ambiente. Além disso, o chumbo é considerado o principal contaminante metálico ambiental em todo o mundo¹. O cádmio pode estar presente nas áreas de mineração de chumbo e zinco como contaminante geológico².

O chumbo é inicialmente absorvido nas células vermelhas do sangue seguindo para os tecidos moles, podendo se acumular nos ossos^{3,4}. O cádmio é acumulativo, nefrotóxico e carcinogênico².

As concentrações de chumbo e cádmio no sangue total são utilizadas como indicadores biológicos de exposição recente a esses metais⁵⁻⁷. Mesmo nos casos de exposição ocupacional e principalmente na exposição ambiental, as concentrações desses contaminantes no sangue são baixas, limitando o número de técnicas analíticas que podem ser utilizadas para essas determinações.

A espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GFAAS) é uma técnica apropriada para a determinação de elementos presentes no sangue em baixos níveis de concentração uma vez que apresenta alta sensibilidade, permitindo a determinação direta, com mínimo consumo de amostra e simplicidade na preparação⁷⁻⁹. Além disso, atualmente a técnica de GFAAS pode ser aplicada à determinação simultânea de elementos, reduzindo o tempo e o custo de análise¹⁰⁻¹³.

Na literatura podemos verificar que a técnica de GFAAS é a mais utilizada rotineiramente pelos Laboratórios de Saúde Pública de outros países, para avaliar a exposição de crianças ao chumbo e, também para atender aos programas de monitoramento de trabalhadores expostos^{4,14}.

Já no Brasil, 50% dos laboratórios que participam do Programa de Ensaio de Proficiência (PEP), organizado pelo Instituto Adolfo Lutz (IAL), utilizam a técnica de GFAAS, enquanto que no Programa Interlaboratórios de Control de Calidad do Gabinete de Seguridad e Higiene en el Trabajo de Zaragoza – Espanha, 74,3% dos laboratórios participantes utilizam esta técnica. A diferença na proporção do uso da GFAAS em relação à técnica com chama, pode ser devido ao maior custo para aquisição do equipamento.

A legislação brasileira¹⁵ estabelece o valor de referência de 40 $\mu\text{g.dL}^{-1}$ e o índice biológico máximo de 60 $\mu\text{g.dL}^{-1}$ para chumbo em sangue de trabalhadores expostos. Para o cádmio, a legislação brasileira não estabelece limites para o sangue, já a American Conference of Governmental Industrial Hygienists - ACGIH adota o valor de 5 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para cádmio em sangue como índice biológico de exposição¹⁶.

Uma vez que as crianças são mais sensíveis aos efeitos tóxicos do chumbo, a Organização Mundial da Saúde (OMS) tem considerado que mesmo níveis menores que 10 $\mu\text{g.dL}^{-1}$ de

chumbo no sangue podem causar efeitos adversos, tais como: alteração no desenvolvimento mental, desordens do sistema nervoso, redução da audição e do crescimento^{1,17-20}.

O objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar uma metodologia empregando a técnica de GFAAS, que possa ser utilizada para a determinação simultânea de chumbo e cádmio em sangue, tanto de populações expostas quanto não-expostas, incluindo crianças.

MATERIAL E MÉTODO

Reagentes

Água desionizada ultrapura (com resistividade de 18,2 $\text{M}\Omega.\text{cm}^{-1}$), HNO_3 ultrapuro e Triton X-100 P.A. foram utilizados na diluição da amostra e na preparação da curva analítica. Como modificador químico, foi utilizada uma mistura de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ e $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ nas concentrações de 0,5% (m/v) e 0,03% (m/v), respectivamente. Para a avaliação da exatidão do método proposto foram utilizados os materiais de referência certificados de sangue do National Institute of Standards and Technology (NIST), SRM 955b níveis 2, 3 e 4; e SRM 966 nível 2. As soluções-padrão de trabalho contendo 10,0 mg.L^{-1} de Pb e 1,0 mg.L^{-1} de Cd foram preparadas a partir de soluções padrão monoelementares Titrisol (Merck) com concentração de 1000,0 mg.L^{-1} . As soluções-padrão da curva analítica para o Pb e o Cd foram preparadas no dia do ensaio, em uma solução de Triton X-100 0,2% (m/v) em HNO_3 0,1% (v/v), e consistiram das seguintes concentrações para Pb: 5,0; 20,0; 60,0; 80,0 e 100,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e para Cd: 0,3; 0,6; 1,2; 2,4 e 3,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$. A vidraria utilizada foi descontaminada quimicamente passando por 2 banhos de HNO_3 20% (v/v) (24 horas cada um) e subsequente enxágüe com água desionizada ultrapura.

Preparação da amostra

Uma alíquota de 100 μL de sangue total previamente homogeneizada foi diluída em 900 μL de uma solução de Triton X-100 0,2% (m/v) em HNO_3 0,1% (v/v), diretamente no copo do autoamostrador. A ponteira foi enxaguada várias vezes com a solução preparada, para assegurar a homogeneidade do sangue com o diluente.

Instrumentação

As análises foram realizadas utilizando-se um espectrômetro de absorção atômica simultâneo com aquecimento transversal e equipado com corretor de fundo Zeeman longitudinal, modelo SIMAA 6000, marca Perkin Elmer. As injeções foram feitas com autoamostrador, modelo AS 72, marca Perkin Elmer. Lâmpadas de cátodo oco foram utilizadas nas determinações de chumbo e cádmio e foram selecionados os comprimentos de onda 283,3 nm e 228,8 nm, respectivamente. Tubos pirolíticos com plataforma integrada foram utilizados em todas as determinações. Os parâmetros analíticos utilizados são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Parâmetros analíticos para a determinação simultânea de chumbo e cádmio.

Tempo de integração	5 s
Volume de amostra	20 µL
Volume do modificador químico	10 µL
Calibração	Linear com interseção calculada
Sinal	Área de pico
Gás	Argônio

RESULTADOS

Otimização das temperaturas de pirólise e atomização

Baseando-se em estudos preliminares realizados com amostras de sangue, foi estabelecido o programa térmico apresentado na Tabela 2. A partir deste programa foram realizados experimentos para a otimização das temperaturas de pirólise e atomização para Pb e Cd, onde foi utilizada uma amostra de sangue adicionada de 100,0 µg.L⁻¹ de Pb e 10,0 µg.L⁻¹ de Cd, que foi diluída na proporção 1:9 em Triton X-100 0,2% (m/v) em HNO₃ 0,1% (v/v), resultando em 10,0 µg.L⁻¹ para Pb e 1,0 µg.L⁻¹ para Cd, como concentrações finais adicionadas na amostra diluída. As determinações foram realizadas utilizando-se uma mistura de NH₄H₂PO₄ 0,5% (m/v) e Mg(NO₃)₂ 0,03% (m/v), como modificador químico.

A curva de pirólise (absorbância integrada “versus” temperatura) foi obtida variando-se a temperatura de pirólise, com incrementos de 100 °C, enquanto a temperatura de atomização era mantida constante em 1500 °C. Da mesma forma, foi obtida a curva de atomização com a temperatura de pirólise fixada em 500 °C. Para cada ponto foi considerada a absorbância integrada média de 3 injeções.

Com base nos perfis obtidos das curvas de pirólise e atomização, e considerando as temperaturas que forneceram o maior sinal de absorbância integrada, as temperaturas selecionadas para pirólise e atomização foram 500 °C e 1500 °C, respectivamente.

Concentração do diluente

O reagente Triton X-100 utilizado para diluição do sangue e preparação da curva de calibração, tem a função de hemolisar as células vermelhas do sangue, facilitando a homogeneização da amostra e evitando a formação de emulsões estáveis^{8,9}.

A concentração de Triton X-100 deve ser otimizada de tal forma que seja suficiente para quebrar as hemáceas do sangue, porém não deve ser tão alta que a formação de espuma inviabilize a utilização do reagente como diluente. Além disso, a utilização de soluções mais concentradas deste diluente pode levar à formação de resíduos de carbono dentro do tubo de grafite¹⁴.

Foi realizado um estudo para verificar o efeito de diferentes concentrações de Triton X-100 em HNO₃ 0,1% (v/v) na curva de calibração para chumbo e cádmio. As concentrações estudadas foram: 0,05%; 0,1%; 0,2%; 0,5%; 1% e 1,5% (m/v). Foi adotado um Modelo de Regressão Linear Múltipla²¹ usando os valores de “absorbância” como variável resposta e “concentração das soluções-padrão” e “concentração de Triton”, como variáveis explicativas. Por meio de um teste de ANOVA foram testados os coeficientes dessas variáveis explicativas e foi concluído que a variável “concentração de Triton” (p = 0,849 e p = 0,983, para Pb e Cd, respectivamente) não é significativa, indicando que a concentração de Triton não interfere na variável resposta “absorbância”. Isto é o mesmo que concluir que todas as retas de regressão linear simples de absorbância “versus” concentração são iguais, não dependendo da concentração de Triton.

Um outro estudo da diluição da amostra de sangue utilizando diferentes concentrações de Triton também foi realizado. Neste estudo fixou-se em 0,2% (m/v) a concentração de Triton X-100 em HNO₃ 0,1% (v/v) para o preparo da curva de calibração. Como amostra de sangue foi utilizado um material de referência certificado, NIST 966 nível 2 e as concentrações testadas de Triton foram: 0,05%; 0,1%; 0,2%; 0,5%; 1% e 1,5% (m/v). Foi observada a formação de resíduo de carbono na plataforma do tubo de grafite quando se utilizou Triton na concentração de 1,5% (m/v), o que diminuiu a precisão da análise. Os valores obtidos para Pb e Cd no material de referência certificado, preparado em diferentes concentrações de Triton,

Tabela 2. Programa térmico para a determinação simultânea de Pb e Cd.

Etapa	Temp (°C)	Rampa (s)	Patamar (s)	Fluxo de gás (mL.min ⁻¹)	Leitura
1	110	20	45	250	
2	130	30	45	250	
3	Tp	10	20	250	
4	Ta	0	5	0	SIM
5	2550	1	5	250	

onde: Tp = temperatura de pirólise

Ta = temperatura de atomização

foram comparados aos valores certificados e verificou-se, por análise de variância (único fator) e posterior aplicação de teste de comparação múltipla de Tukey-Kramer (programa GraphPad InStat – versão 2.01, 1990-1993), que não havia diferença estatisticamente significativa para chumbo e cádmio, ao se utilizar as concentrações de Triton de 0,2% e 0,1% (m/v). Adotou-se a concentração de 0,2% (m/v) de Triton X-100, pois todos os testes de otimização das temperaturas de pirólise e atomização foram feitos utilizando-se esta concentração, mas isso não impede que se utilize a concentração de 0,1% (m/v) de Triton para o preparo da amostra de sangue.

Validação do método

Para a determinação da linearidade da faixa de trabalho foi utilizado o procedimento descrito no documento ISO/CD 13812²², que estabelece como linear uma faixa de concentração quando o fator de linearidade “L” for maior ou igual a 0,7. O fator de linearidade “L” é calculado segundo a equação (1):

$$L = \frac{A_{1,0} - A_{0,8}}{A_{0,2} - A_B}$$

onde:

$A_{1,0}$ = valor da absorbância da solução-padrão com maior concentração

$A_{0,8}$ = valor da absorbância da solução-padrão que corresponde a 80% de $A_{1,0}$

$A_{0,2}$ = valor da absorbância da solução-padrão que corresponde a 20% de $A_{1,0}$

A_B = valor da absorbância da solução do branco

A Tabela 3 mostra os fatores de linearidade obtidos experimentalmente para Pb e Cd. As faixas de concentração estudadas foram consideradas lineares para ambos os elementos.

Considerando que as faixas de trabalho normalmente utilizadas pela técnica de espectrometria de absorção atômica são estreitas, é importante ressaltar que no método proposto as faixas de trabalho estendem-se em uma ordem de magnitude para cádmio e, acima disso para chumbo. Isto é bastante útil, pois, permite monitorar os níveis de concentração desses

Tabela 3. Fator de linearidade (L) experimental para as faixas de concentração testadas para Pb e Cd

Elemento	Faixa de concentração testada ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	“L” experimental
Pb	5,0 – 100,0	1,0
Cd	0,3 – 3,0	1,6

metais em indivíduos com exposição ocupacional, onde as concentrações encontradas são geralmente altas, sendo desnecessária a diluição da amostra e ao mesmo tempo, utilizar o método para avaliar o nível destes metais em indivíduos ambientalmente expostos, onde as concentrações encontradas são geralmente inferiores. Verifica-se, portanto, a utilidade deste método com relação à ampla faixa de trabalho empregada.

Os limites de detecção e quantificação do método obtidos na amostra de sangue total foram para Pb 0,54 e 1,84 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e para Cd 0,06 e 0,21 $\mu\text{g.L}^{-1}$, respectivamente. Esses valores referem-se aos resultados obtidos na amostra diluída 10 vezes, correspondendo a 0,54 e 1,84 $\mu\text{g.dL}^{-1}$ para Pb e 0,6 e 2,1 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para Cd na amostra original. Para a determinação desses limites foram preparadas sete réplicas independentes utilizando uma amostra de sangue. Tendo em vista que a concentração de cádmio no sangue utilizado era muito baixa, foi adicionada uma alíquota de solução-padrão desse elemento à amostra, de tal forma que a concentração final, após a diluição, fosse próxima de 0,5 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Os cálculos para a determinação dos limites de detecção e quantificação foram feitos de acordo com as recomendações da IUPAC²³.

A exatidão do método foi avaliada pelo cálculo de Z-score²⁴, utilizando os seguintes materiais de referência certificados: NIST 966 nível 2, 955b níveis 2, 3 e 4. A concentração de chumbo variou nestes diferentes materiais de referência certificados dentro de uma faixa ampla, contemplando concentrações significativas do ponto de vista clínico, variando de 10 $\mu\text{g.dL}^{-1}$ a 40 $\mu\text{g.dL}^{-1}$. Os valores certificados, os valores obtidos experimentalmente e os Z-score calculados são apresentados na Tabela 4. Verificou-se que todos os valores obtidos para o Z-score foram menores que 2, o que evidencia a exatidão do método.

Além do uso de material de referência certificado, foi utilizado o método de adição de padrão em amostra de sangue

Tabela 4. Valores certificados, valores obtidos e Z-score para Pb e Cd nos materiais de referência.

MRC	Valor certificado Pb ($\mu\text{g.dL}^{-1}$)	Valor obtido Pb ($\mu\text{g.dL}^{-1}$)	Z-score Pb	Valor certificado Cd ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Valor obtido Cd ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Z-score Cd
NIST SRM 966 L2	25,27 ± 0,22	25,20 ± 0,30	0,3	5,22 ± 0,16	5,1 ± 0,5	0,8
NIST SRM 955b L2	10,30 ± 0,10	10,23 ± 0,47	0,7
NIST SRM 955b L3	20,59 ± 0,21	20,43 ± 0,55	0,8
NIST SRM 955b L4	39,36 ± 0,36	40,00 ± 0,75	1,8

para a avaliação da exatidão do método para cádmio, uma vez que o material de referência certificado disponível correspondia apenas a um nível de concentração. A recuperação média obtida para a concentração de cádmio de $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ foi 94%.

Para a avaliação da dispersão dos resultados tomou-se uma amostra de sangue, com a qual foram preparadas 7 réplicas independentes e as medições foram feitas em condições de repetitividade, isto é, as medições foram realizadas pelo mesmo operador, no mesmo laboratório, com o mesmo equipamento, em um curto intervalo de tempo²⁴. Os valores do coeficiente de variação (CV) obtidos para Pb e Cd foram 3% e 13%, para as concentrações de $4,00 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $0,30 \mu\text{g.L}^{-1}$, respectivamente. Para os níveis de concentrações avaliados, faixa de $\mu\text{g.L}^{-1}$, estes valores do coeficiente de variação obtidos para Pb e Cd são bastantes satisfatórios, indicando a boa precisão do método.

A seguir na Figura 1 é apresentada uma carta controle que demonstra o desempenho do nosso laboratório ao longo de 2003, no Programa Interlaboratórios de Control de Calidad do Gabinete de Seguridad e Higiene en el Trabajo de Zaragoza – Espanha, para chumbo em sangue. É possível observar que o método proposto fornece resultados dentro dos intervalos de aceitação estabelecidos pelo programa.

Os valores representados na figura por um losango, correspondem aos valores designados e as linhas abaixo e acima definidas por um quadrado, correspondem aos limites inferior e superior do intervalo de aceitação. Os valores obtidos experimentalmente pelo laboratório estão representados por um x. Não foram detectadas tendências (identificação de erros sistemáticos).

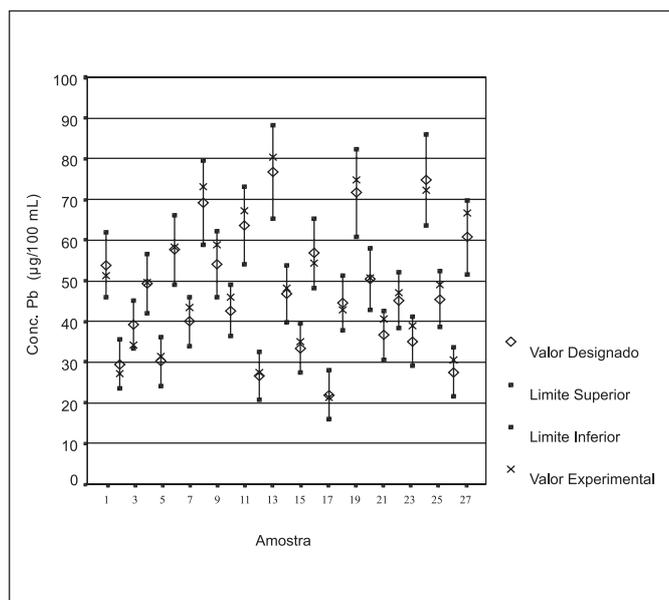


Figura 1. Carta controle da participação em programa interlaboratorial de chumbo em sangue, durante o ano de 2003.

DISCUSSÃO

Na literatura foram encontrados poucos trabalhos aplicados à determinação de chumbo e cádmio em material biológico utilizando a técnica de GFAAS simultâneo com corretor Zeeman.

Deval et al., 1995¹¹ utilizando a técnica de GFAAS simultâneo em equipamento com corretor Smith-Hieftje obtiveram sensibilidade maior para o cádmio, com LD cerca de 3 vezes menor, enquanto que para o chumbo o LD foi cerca de 2 vezes maior, em relação ao obtido neste estudo.

A faixa de trabalho para o cádmio neste estudo é de 0,3 a $3,0 \mu\text{g.L}^{-1}$, enquanto que outros autores mencionam curvas a partir de $1,0 \mu\text{g.L}^{-1}$ ^{8,14}.

Acar, 2001⁸ e Campillo et al., 1999¹⁴ determinaram chumbo e cádmio utilizando GFAAS com corretor Zeeman, porém por análise monoelementar, que emprega as melhores condições para cada elemento para o programa térmico. Já para a determinação simultânea, as condições do programa térmico devem ser adequadas aos elementos a serem determinados. Este fato teoricamente poderia causar uma perda na sensibilidade, porém os resultados obtidos pelos autores citados acima para limite de detecção e limite de quantificação foram maiores que os obtidos em nosso estudo. Verificou-se que, mesmo usando um método multielementar, a sensibilidade no presente estudo é melhor.

O coeficiente de variação (CV) obtido para o chumbo é baixo, se comparado ao declarado por Acar 2001⁸, enquanto que para o cádmio o CV obtido de 13% é aceitável devido à baixa concentração determinada, em níveis de ultra-traços.

Os modificadores químicos utilizados neste estudo são comumente empregados em outros métodos descritos na literatura^{8,11,14,25}.

O diluente Triton X-100 em HNO_3 na concentração selecionada possibilita a preparação simples e rápida da amostra.

CONCLUSÃO

O método desenvolvido é sensível, simples, rápido e direto. Permite a determinação simultânea de chumbo e cádmio em sangue com precisão e exatidão requeridas, sendo desnecessária a digestão da amostra. O método utiliza reagentes e modificadores químicos tradicionalmente utilizados na técnica de absorção atômica com forno de grafite, e calibração sem a necessidade de adição de padrão. Pode ser utilizado para a avaliação de exposição humana tanto ambiental quanto ocupacional a esses metais.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Dra Alice Sakuma pela orientação e à Roberta Okura pela colaboração na análise estatística.

REFERÊNCIAS

1. Falomir P, Alegría A, Barberá R, Farré R, Lagarda, M. Direct determination of lead in human milk by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Food Chem*, 64: 111-13, 1999.
2. ATSDR, Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological Profile for Cadmium, U.S. Department of Health and Human Services. Atlanta, USA, 1998.
3. ATSDR, Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological Profile for Lead, U.S. Department of Health and Human Services. Atlanta, USA, 1999.
4. Parsons PJ, Geraghty C, Verostek MF. An assessment of contemporary atomic spectroscopic techniques for the determination of lead in blood and urine matrices. *Spectrochim Acta Part B*, 56: 1593-604, 2001.
5. Hållen IP, Jorhem L, Lagerkvist BJ, Oskarsson A. Lead and cadmium levels in human milk and blood. *Sci Total Environ*, 166: 149-155, 1995.
6. Sturgeon RE. Graphite furnace atomic spectrometry and environmental challenges at the ultratrace level – a review. *Spectrochim Acta Part B*, 52: 1451-57, 1996.
7. Zhang ZW, Shimbo S, Ochi N, Eguchi M, Watanabe T, Moon CS, et al. Determination of lead and cadmium in food and blood by inductively coupled plasma mass spectrometry: a comparison with graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Sci Total Environ*, 205: 179-87, 1997.
8. Acar O. Determination of cadmium and lead in biological samples by Zeeman ETAAS using various chemical modifiers. *Talanta*, 55: 613-622, 2001.
9. Yen CC, Chen WK, Hu CC, Wei BL, Chung C, Kuo SC. Lead determination in whole blood by graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Atom Spectroscopy*, 18(2): 64-9, 1997.
10. Correia PRM, Oliveira E, Oliveira PV. Simultaneous determination of Cd and Pb in foodstuffs by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Anal Chim Acta*, 405: 205-11. 2000.
11. Deval A, Sneddon J. Determination of cadmium and lead in blood reference samples by simultaneous graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Microchem J*, 52: 96-100, 1995.
12. Freschi GPG, Dakuzaku CS, Moraes M, Nóbrega JA, Neto J A G. Simultaneous determination of cadmium and lead in wine by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Spectrochim Acta Part B*, 56: 1987-93, 2001.
13. Hoening M, Cilissen A. Performances and practical applications of simultaneous multi-element electrothermal atomic absorption spectrometry the case of SIMAA 6000. *Spectrochim Acta Part B*, 52: 1443-49, 1997.
14. Campillo N, Viñas P, García IL, Córdoba MH. Rapid determination of lead and cadmium in biological fluids by electrothermal atomic absorption spectrometry using Zeeman correction. *Anal Chim Acta*, 390: 207-215, 1999.
15. Brasil, Leis, Decretos, etc. Secretaria de Segurança e Saúde no Trabalho. Portaria nº 24, de 29 de dezembro de 1994. Aprova o texto da Norma Reguladora nº 7 (NR-7) – Exames Médicos. *Diário Oficial da União*, Brasília, 30 de dezembro de 1994. Seção I.
16. ACGIH, American Conference of Governmental Industrial Hygienists. Limites de exposição (TLVs) para substâncias químicas e agentes físicos e índices biológicos de exposição (BEIs), Ohio, USA, 2003. tradução ABHO – Associação Brasileira de Higienistas Ocupacionais. São Paulo, SP, 2003. 219 p.
17. CDC, Centers for Disease Control. Screening young children for lead poisoning: guidance for state and local public health officials. [www.cdc.gov/nceh/lead/guide/1997/pdf]. Acesso em: junho 2003.
18. Chaudhary-Webb M, Paschal DC, Elliott WC, Hopkins HP, Ghazi AM, Ting BC, et al. ICP-MS Determination of lead isotope ratios in whole blood, pottery, and leaded gasoline: lead sources in Mexico City. *Atom Spectroscopy*, 19(5): 156-163, 1998.
19. Furman A, Mehmet L. Analysis of lead body burden in Turkey. *Sci Total Environ*, 234: 37-42, 1999.
20. Parsons JP, Slavin W. A rapid Zeeman graphite absorption spectrometric method for the determination of lead in blood. *Spectrochim Acta*, 48B (67): 925-39, 1993.
21. Draoper NR, Smith H. *Applied Regression Analysis*, 3ª ed., New York: John Wiley; 1998. 706 p.
22. ISO/CD 13812: General Guidelines for Atomic Absorption Spectrometry – Graphite furnace analysis, 1996. 63 p.
23. Currie LA. Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities - *Pure Appl Chem*, 67: 1669 – 1723, 1995.
24. Brasil, INMETRO. Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. DOC-CGCRE-008 – revisão 01 – março 2003. [<http://www.inmetro.gov.br>]. Acesso em: junho 2003.
25. Burguera JL, Burguera M, Rondon CE. Determination of lead in whole blood and urine by electrothermal atomic absorption spectrometry using various chemical modifiers. *Atom Spectroscopy*, 18(3): 109-113, 1997.

Avaliação de resíduos de ditiocarbamatos e etilenotiouréia (ETU) em mamão e sua implicação na saúde pública*

Evaluation of dithiocarbamate and ethylenethiourea (ETU) residues in papaya, and their implication for public health

RIALA6/1016

Vera R.R. LEMES^{1*}; Heloisa H. C. BARRETTO¹; Tereza A. KUSSUMI¹; Sérgio COLACIOPPO²

*Endereço para correspondência: ¹Instituto Adolfo Lutz, Divisão de Bromatologia e Química, Av. Dr. Arnaldo, 355, Cerqueira César, 01246-902, São Paulo-SP.

² Departamento de Saúde Ambiental da Faculdade de Saúde Pública-USP

Trabalho originário da Dissertação de mestrado da autora Vera R.R. LEMES, apresentada ao Departamento de Saúde Ambiental da Faculdade de Saúde Pública da USP.

Recebido: 03/11/2004 – Aceito para publicação: 30/06/2005

RESUMO

Etilenotiouréia é uma substância tóxica, formada pela degradação e/ou biotransformação dos fungicidas etilenobisditiocarbamatos (EBDCs), utilizados em alimentos, e pode representar um risco à população consumidora. Os objetivos deste estudo foram: validar métodos analíticos de resíduos de ditiocarbamatos e de ETU em mamão; determinar os resíduos de mancozebe e de ETU em mamão *Carica papaya L.*, avaliar os teores encontrados e o risco à saúde da população. A determinação de ditiocarbamatos foi feita por espectrofotometria e a de ETU, por cromatografia líquida de alta eficiência. Foram analisadas amostras tratadas com mancozebe e testemunhas, procedentes de três localidades representativas da cultura de mamão. Os resultados das recuperações foram de 70 a 110 % para mancozebe e de 80 a 110 % para ETU, com coeficientes de variação de 4,8 a 13,2 % para mancozebe e de 3,7 a 13,3 % para ETU, todos satisfatórios. O limite de quantificação do método foi de 0,5mg/kg para mancozebe, e 0,01mg/kg para ETU. As amostras tratadas apresentaram resíduos de ETU de 0,01mg/kg a 0,32 mg/kg e de mancozebe de 0,5 mg/kg a 2,1 mg/kg. A presença de ETU em mamão alerta para a necessidade do conhecimento dos níveis presentes nos alimentos consumidos pela população.

Palavras-Chave. etilenotiouréia, etilenobisditiocarbamatos, mancozebe, ditiocarbamatos, agrotóxicos, alimentos, mamão, Saúde Pública, meio ambiente.

ABSTRACT

Ethylenethiourea (ETU) is a toxic substance formed during degradation and/or biotransformation of ethylene-bisdithiocarbamate (EBDC) fungicides, which are employed in foods. Presence of this substance may represent a risk to populations who consume fruits and other foods. The objectives of the present study were to validate the analytical methods for determining dithiocarbamates and ETU levels in papaya, and to determine the levels of both mancozeb and ETU residues in papaya *Carica papaya L.*, and also to evaluate the association between the detected levels and the risk to the public health. The levels were determined by means of spectrophotometry, and high performance liquid chromatography was employed for determining ETU samples treated or non-treated with mancozeb were collected from three sites that are representative of papaya cultivation. The recovery studies showed a range from 70 to 110% for mancozeb, and from 80 to 110% for ETU with coefficients of variation ranging from 3.7 to 13.3% for ETU and from 4.8 to 13.2% for mancozeb, being all of them satisfactory. The method quantification limits was 0.5 mg/kg for mancozeb determination, and 0.01 mg/kg for ETU. All samples treated with mancozeb presented ETU residues ranging from 0.01 mg/kg to 0.32 mg/kg, and mancozeb levels ranged from 0.5 mg/kg to 2.1 mg/kg. The presence of ETU in papaya observed in the present study is a warning that it is necessary to be acquainted with the occurrence of this substance in foods consumed by population.

Key Words. ethylenethiourea, ethylene-bisdithiocarbamate, mancozeb, dithiocarbamate, pesticides, foods, papaya, public health, environment.

INTRODUÇÃO

Os ditiocarbamatos são usados, no mundo inteiro, há várias décadas, como fungicidas na agricultura, no cultivo de plantas ornamentais, de grama e no tratamento do solo. São compostos derivados do ácido ditiocarbâmico. São subdivididos em dimetilditiocarbamatos (DMDC), como ferbam, ziram e tiram, etilenobisditiocarbamatos (EBDCs), como mancozebe, manebe, zinebe e metiram, monometildimetilcarbamato como metam sódico e propilenobisditiocarbamato como propinebe.

Os Etilenobisditiocarbamatos (EBDC) são sais orgânicos de manganês, zinco, ou zinco e sódio, insolúveis em água e em solventes orgânicos, instáveis em meio alcalino ou ácido, na presença de oxigênio, bem como em sistemas biológicos, decompõem-se rapidamente em água e possuem um amplo espectro de ação no controle de moléstias que atacam diversos cultivos, tais como cereais, frutas e legumes^{1,2}. Na América Latina, mais de 50% de todos os fungicidas utilizados são do grupo dos EBDCs e, no Brasil, o volume de EBDCs supera os 40% do total utilizado no país, representando o principal produto contra fungos. O mancozebe está entre os 12 agrotóxicos mais vendidos no Brasil, incluindo os Estados de São Paulo, Bahia e Espírito Santo.

O mancozebe e o manebe apresentam classificação toxicológica III, segundo a legislação brasileira, ou seja, são considerados medianamente tóxicos³. Quanto ao potencial de periculosidade ambiental, o mancozebe é da classe II, ou seja, é considerado produto muito perigoso. A toxicidade aguda de EBDCs é alta para algumas espécies de organismos aquáticos como peixes, crustáceos, algas, bactérias².

A decomposição metabólica dos EBDCs é complexa e resulta na formação de dissulfeto de carbono (CS_2), sulfeto de hidrogênio (H_2S), etileno diamina (EDA), etileno bistiouram dissulfeto (ETD), etileno diisocianato (EDI), etilenotriuréia (ETU), etilenouréia (EU) e 2-imidazole².

Etilenotriuréia ou 2-imidazoledinone (ETU) é uma substância formada pela degradação e/ou biotransformação dos EBDCs, solúvel em água, em etanol e metanol e razoavelmente estável em água. Resíduos de ETU podem ser encontrados em plantas e no ambiente, seguido do uso na agricultura de EBDCs, ou em animais e no ser humano quando expostos a esses produtos, podendo ser encontrada como contaminante ou metabólito em mamíferos, plantas e organismos inferiores. Pode também ocorrer durante a manufatura ou o armazenamento do produto formulado e durante o processamento do alimento¹.

A ETU tem a capacidade de induzir tumor na tireóide de roedores e no fígado de camundongo^{4,5,6,7}. O fígado e a tireóide são locais de acúmulo de ETU no organismo⁸. Apresenta evidência suficiente para carcinogenicidade em animais e inadequada em seres humanos².

Segundo IARC⁹, Joint Meeting of the FAO Panel of Experts on Pesticide Residues in Food and the Environmental and the WHO Expert Group on Pesticide Residues (JMPR-FAO/WHO)¹⁰, a ETU é um agente não genotóxico para

mamíferos. ELIA et al.⁴, ao estudarem os possíveis efeitos mutagênicos da ETU, não observaram efeito genotóxico em mamíferos, o que sugere que ela induz tumor hepático em camundongo por um mecanismo não-genotóxico que ainda não foi elucidado.

A exposição da população à ETU pelo consumo de alimentos apresenta várias fontes: os resíduos de ETU já formados antes de serem ingeridos, nas condições de industrialização, os remanescentes da aplicação de EBDCs nas culturas, os formados pelo processamento ou preparo e cozimento de alimentos com resíduos de EBDCs, e/ou os metabolizados no organismo, após ingestão

Limites Máximos de Resíduos (LMR) específicos para ETU não são estabelecidos no Brasil. A Ingestão Diária Aceitável (IDA) estabelecida pelo JMPR-FAO/WHO, grupo assessor do Codex Alimentarius, é de 0,002mg/kg de ETU por peso corpóreo¹¹.

No Codex Alimentarius os LMR são estabelecidos para a classe de ditiocarbamatos: mancozebe, manebe, metiram, zinebe, propinebe, tiram, ziram, ferbam, e os valores são expressos em CS_2 total. A Ingestão Diária Aceitável estabelecida pelo Codex Alimentarius é de 0,003 mg/kg/dia de CS_2 para ferbam, ziram, 0,007 para propinebe e 0,03 mg/kg/dia de CS_2 para mancozebe, manebe, metiram e zinebe¹².

No Brasil, a Resolução RE nº 165, de 29 de agosto de 2003, da ANVISA/MS estabelece LMR para ditiocarbamatos em CS_2 (mg/kg) em função do uso dos ingredientes ativos da classe dos EBDCs: mancozebe, manebe, metiram, além de outros ditiocarbamatos como o propinebe e tiram¹³.

O Brasil está entre os três maiores produtores de frutas do mundo, seguido da China e da Índia, produzindo 42 milhões de toneladas em 2,2 milhões de hectares. A produção mundial de mamão papaia é de mais de cinco milhões de toneladas ao ano, e no Brasil, um milhão e oitocentas mil toneladas ao ano^{14, 15}.

A quantidade de consumo de frutas é expressiva na população brasileira e estas são, na maioria das vezes, ingeridas *in natura*. A média de consumo alimentar domiciliar *per capita* anual de frutas foi de 40,397 kg, em 1996, para o total das regiões metropolitanas, de acordo com a Pesquisa de Orçamentos Familiares^{16,17}. O mamão pode ser consumido *in natura* ou na forma de doces ou através de produtos industrializados contendo mamão como iogurtes, sorvetes.

É importante o conhecimento dos níveis de EBDCs e de ETU presentes nas frutas consumidas pela população, para fornecer subsídios sobre a qualidade das mesmas e dados para avaliação de risco à saúde e ao meio ambiente.

A presente pesquisa foi realizada com os objetivos: validar método analítico para determinação de resíduos de ditiocarbamatos e de etilenotriuréia em mamão; determinar os resíduos de etilenobisditiocarbamato (mancozebe) e de ETU em mamão *Carica papaya L*, determinar a dissipação desses resíduos, após o tratamento com mancozebe e avaliar o risco à saúde da população consumidora.

MATERIAL E MÉTODOS

A metodologia científica utilizada foi um estudo de caso controle analítico, onde a hipótese é a presença de resíduos de etilenotiouréia em mamão tratado com etilenobisditiocarbamato (mancozebe).

Amostras

Foram analisadas amostras tratadas e não tratadas (testemunhas) provenientes de três regiões representativas da cultura de mamão: Lins-SP, Linhares-ES e extremo sul da Bahia. As amostras foram tratadas com mancozebe na forma de pó molhável na dose normal (160 g/ha) recomendada - tratamento 1 e na dose dupla(320g/ha) – tratamento 2. Foram feitas seis aplicações de mancozebe de 15 em 15 dias antes da colheita, realizada no verão, por profissional experiente.

O método de amostragem utilizado foi ao acaso. Os frutos foram coletados aleatoriamente, de diversas partes de mamoeiros individuais, simulando o procedimento normal de colheita, de uma forma representativa, segundo o estabelecido pelo Codex Alimentarius¹⁸. As amostras foram embaladas em saco de polietileno, identificadas, armazenadas e enviadas congeladas ao laboratório.

As amostras foram reduzidas a sub amostras e estocadas em freezer à temperatura de -20° C, até o momento das análises.

Para os estudos de recuperação de ETU foram preparadas amostras controle de mamão com adição de solução-padrão nos níveis de 1 vez o limite de quantificação (LOQ), 2LOQ e 10LOQ e para EBDCs ½, 1,2 e 6 LOQ, sendo utilizadas três amostras para cada nível estudado.

Foram analisadas 41 amostras, sendo 27 para a realização dos ensaios de conformidade de validação, 9 amostras para os estudos de resíduos remanescentes da aplicação de EBDC (mancozebe), e mais 5 amostras para os estudos de dissipação de mancozebe e de ETU, totalizando 55 determinações.

Método para determinação de resíduos de etilenotiouréia (ETU)

O método utilizado para determinação de resíduos de ETU foi o preconizado por DISERENS¹⁹. A ETU é extraída com metanol da amostra de fruta devidamente homogeneizada. O extrato orgânico é concentrado e após ajuste do pH é feita uma purificação em coluna de Extrelut. O eluato é concentrado e filtrado. A determinação é feita por cromatografia a líquido de alta eficiência com detector de ultravioleta (UV).

As condições cromatográficas foram: Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência HPLC 1100, com detector de UV (comprimento de onda: $\lambda = 240$ nm), bomba quaternária, amostrador automático, microcomputador com *Workstation*, coluna spherisorb ODS 2, 5 μ m, 125 mm x 4 mm, em aço inox, fase móvel a 2% de acetonitrila em água purificada para HPLC, com fluxo de 0,75 mL, temperatura de 30° C.

A análise qualitativa foi feita por padronização externa, através da comparação do tempo de retenção da ETU e a quantitativa através da curva de calibração, por

comparação de área. A concentração de ETU foi determinada, levando em consideração o fator de diluição e a quantidade de amostra.

Método para determinação de resíduos de ditiocarbamatos

O método analítico utilizado para determinação de resíduos de mancozebe foi o proposto por Keppel, apropriado para as análises de monitoramento dos resíduos dos ditiocarbamatos em alimentos. Os ditiocarbamatos, incluindo os EBDCs, são determinados pelo método de evolução de CS₂. Consiste na decomposição de ditiocarbamatos em meio de solução de cloreto estanoso e ácido clorídrico, gerando dissulfeto de carbono, que, após purificação é coletado em uma solução etanólica de acetato de cobre e dietanolamina. Dois complexos cúpricos de ditiocarbamatos [cúprico-N,N-bis(2-hidroxi etil)] são formados e medidos em conjunto por espectrofotometria na região do visível em comprimento de onda de 435 nm contra o reagente de cor em solução etanólica²⁰.

A curva-padrão foi traçada pelos valores das absorvâncias *versus* concentração de CS₂ das soluções de trabalho, sendo que o fator de correção do CS₂ para mancozebe é de 1,776.

Avaliação da conformidade dos métodos analíticos estudados

Foram calculados as recuperações, a média, o desvio-padrão e o coeficiente de variação para cada nível estudado.

A avaliação dos métodos propostos foi feita conforme parâmetros de conformidade de validação de métodos. O intervalo de aceitabilidade para os valores individuais de recuperação é de 70 a 110%^{21,22}. A EPA²³ considera valores de variabilidade para determinação da aceitabilidade de métodos, recuperações entre 70 e 120%. O coeficiente de variação percentual (CV%) em relação à média para cada nível de fortificação deve ser de até 15%²¹.

Avaliação de risco de ingestão de mancozebe através do consumo de mamão

Com os valores de resíduos de mancozebe e ETU, encontrados nas amostras de mamão com tratamento 1, dose normal de uso, considerando o maior valor encontrado, foi verificada a contribuição do risco, pelo consumo de mamão em comparação com a Ingestão Diária Aceitável (IDA).

Comparação da Ingestão Diária Máxima Teórica (IDMT) de EBDCs com a Ingestão Diária Aceitável

Como não existem dados de monitoramento de resíduos para todas as culturas onde é permitido o uso de EBDCs, foi feita uma estimativa de ingestão pelo cálculo da Ingestão Diária Máxima Teórica. A IDMT foi calculada pela equação: $IDMT = \sum C_i \times LMR_j$; considerando C_i o maior consumo médio *per capita* de cada alimento do total das regiões metropolitanas pesquisadas no Brasil^{16,17} e LMR_j¹³ como o nível de resíduo em cada alimento.

Com os dados, foi estimada a IDMT de resíduos de EBDC para o total das culturas onde é autorizado o uso de EBDCs, e foi comparada com a Ingestão Diária Aceitável (IDA). Os resultados foram expressos em percentagem (%) da IDA¹².

Conversão da IDMT de EBDC para ETU e comparação com a IDA

Como não foram estabelecidos LMR para ETU na legislação, foi estimado um valor da IDMT para ETU, através da conversão da IDMT de EBDCs para IDMT de ETU. Os fatores de conversão foram baseados nos estudos de metabolização e excreção de ETU.

Estudos realizados por Nelson²⁴, em 1986, demonstram que 23 % de 100 mg/kg de mancozebe podem ser convertidos a ETU em ratos. Didonato²⁴, em 1986, concluiu que 6,4 % de 100 mg/kg de mancozebe, 13,6 % de 25 mg/kg de manebe, 9,5% de 5 mg/kg de metiram, 22 % de 50 mg/kg de zinebe, são transformados a ETU em plasma de rato. Porém, estes dados foram todos baseados no C¹⁴ total, sem conversão para o respectivo peso molecular²⁴. Aplicando o fator de conversão para o peso molecular, considerando a máxima conversão *in vivo*, nos estudos citados, a porcentagem de mancozebe que se transforma em ETU é de 8,7% e de manebe é de 5,2%. Com estes fatores de conversão foram calculados os valores de ETU a partir das IDMT de mancozebe e manebe, e então comparados com a IDA.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os métodos analíticos avaliados apresentaram exatidão e precisão satisfatórias e foram utilizados para determinação dos resíduos de mancozebe e de etilenotiouréia nesta pesquisa. Tanto as recuperações de mancozebe quanto às de ETU estavam dentro do limites aceitáveis para resíduos, de 70% a 110%, com coeficientes de variação menores que 15%, conforme pode ser observado nas Tabelas 1 e 2.

O método para determinação de resíduos de ETU em amostras de mamão apresentou uma boa precisão com coeficiente de variação de 3,7 a 13,3% e recuperações de 80-110%, conforme pode ser observado na Tabela 1. Não foram encontrados resíduos de ETU nas amostras testemunhas no limite de quantificação do método, que foi de 0,01 mg/kg. O limite de detecção foi de 0,005mg/kg.

O método para determinação de resíduos de mancozebe em amostras de mamão apresentou uma boa precisão, com coeficiente de variação de 4,8 a 13,2%, conforme pode ser observado na Tabela 2.

O limite de detecção do método foi de 0,1 mg/kg de CS₂ e o limite de quantificação foi de 0,3 mg/kg de CS₂, correspondente a 0,5 mg/kg de mancozebe.

A hipótese da presença de resíduos de etilenotiouréia em mamão tratado com etilenobisditiocarbamato (mancozebe) foi confirmada pelo presente estudo analítico, pois todas apresentaram resíduos de ETU em níveis que variaram de

Tabela 1. Distribuição dos resultados das recuperações de ETU, desvio-padrão e coeficiente de variação de acordo com o nível de fortificação.

Nível de fortificação (mg/Kg)	Recuperação(%) variação(%)	Média recuperação(%)	Desvio-padrão	Coeficiente de variação(%)
0,01(LOQ)	80-103	90	11,9	13,3
0,02(2xLOQ)	100-110	107	5,8	5,4
0,10(10xLOQ)	98-105	102	3,8	3,7

Nível de fortificação: quantidade de padrão adicionado na amostra controle; Recuperação: relação entre a concentração encontrada e a concentração adicionada para cada amostra fortificada (em porcentagem); LOQ: limite de quantificação do método.

Tabela 2. Distribuição dos resultados das recuperações de mancozebe, desvio - padrão e coeficiente de variação de acordo com o nível de fortificação.

Nível de fortificação (mg/Kg)	Recuperação(%) variação(%)	Média recuperação(%)	Desvio-padrão	Coeficiente de variação(%)
0,2(1/2LOQ)	95-110	102	8,7	8,5
0,5(LOQ)	84-88	83	5,0	6,0
1,0(2xLOQ)	79-87	83	4,0	4,8
3,0(6xLOQ)	70-89	77	10,2	13,2

Nível de fortificação: quantidade de padrão adicionado na amostra controle; Recuperação: relação entre a concentração encontrada e a concentração adicionada para cada amostra fortificada (em porcentagem); LOQ: limite de quantificação do método.

0,01 a 0,32 mg/kg, conforme pode ser observado nas Figuras 1, 2 e 3.

Observa-se na Figura 1, que os resíduos de ETU presentes nas amostras de mamão com tratamento 1 (160g i.a.ha), diferem bastante de local para local. As amostras de Linhares-ES apresentaram valores mais baixos o que não se explica apenas pela temperatura, outros fatores devem ter interferido nos níveis de resíduos encontrados.

Observa-se que apesar dos níveis de mancozebe nas amostras de mamão serem praticamente iguais, dentro do coeficiente de variação do método, no tratamento 1, os níveis de ETU apresentaram uma diferença significativa. Considerando o nível de precisão do método (coeficiente de variação de 15%), tem-se o mesmo resultado para mancozebe, em Lins e no Sul da Bahia. Porém, para ETU difere consideravelmente (55%) (Figura 1).

Foram encontrados resíduos de CS₂ em todas as amostras tratadas de mamão em níveis que variaram de 0,5 mg/kg a 2,1 mg/kg calculados em mancozebe (Figura 2).

Em relação aos resíduos de ETU, observou-se um aumento considerável do nível no tratamento 2 em Lins-SP, cerca de 3,5 vezes o valor encontrado na dose de 160g i.a.ha, enquanto que os valores encontrados em Linhares e no Sul da Bahia são praticamente os mesmos, conforme Figura 2.

Os níveis de mancozebe e ETU nas amostras de mamão tratado (tratamento 2) foram iguais ou mais altos do que nas amostras com tratamento 1. Nas amostras provenientes de Linhares e do Sul da Bahia têm-se praticamente os mesmos resultados, quando se compara o tratamento 1 e 2. (Figuras 1 e 2).

Os resultados do estudo de dissipação de mancozebe e ETU, realizado na cidade de Lins-SP, encontram-se na Figura 3. Foram encontrados resíduos de mancozebe e ETU em todas as amostras de mamão tratado. Houve uma diminuição significativa dos níveis de ETU após 3 dias da aplicação, permanecendo praticamente inalterado até 9 dias, e uma diminuição mais acentuada ocorreu após 12 dias (Figuras 1, 2 e 3).

Com os valores de resíduos de mancozebe e ETU, encontrados nas amostras de mamão com tratamento 1, dose normal de uso, considerando o maior valor encontrado de 1,8 mg/kg e 0,09 mg/kg, respectivamente, foi verificada a contribuição do risco, pelo consumo de mamão em comparação com a Ingestão Diária Aceitável, e os resultados encontram-se na Tabela 3.

A contribuição da estimativa da ingestão de resíduos de mancozebe e de ETU pelos valores encontrados e o consumo de mamão¹⁶ foi de 0,6 % da IDA e 0,7% da IDA, respectivamente (Tabela 3).

A Tabela 4 apresenta a comparação da Ingestão Diária Máxima Teórica de etilenobisditiocarbamato com a Ingestão Diária Aceitável.

A IDMT para EBDCs (Tabela 4) representa 47% da IDA, e se os resíduos presentes nos alimentos não excederem os LMR, aparentemente o consumo dos mesmos não representa

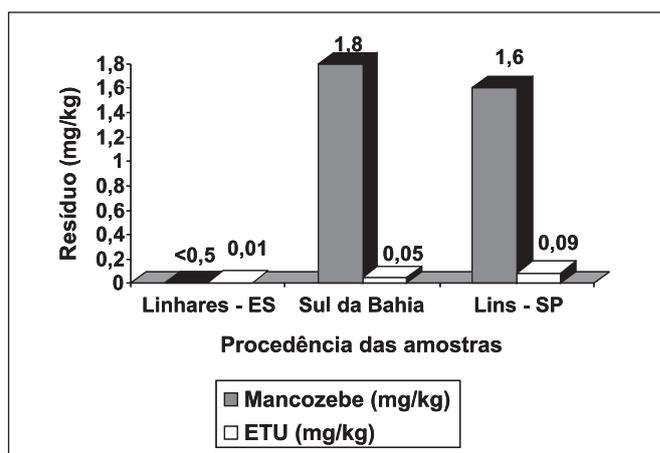


Figura 1. Resultado do estudo de resíduos de EBDC (mancozebe) e etilenotiuréia nas amostras de mamão tratado com mancozebe, tratamento 1 (160g ia/ha), de acordo com a procedência.

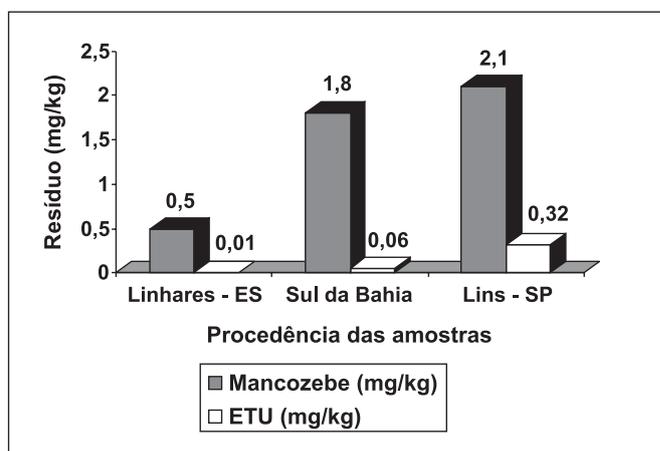


Figura 2. Resultado do estudo de resíduos de EBDC (mancozebe) e etilenotiuréia nas amostras de mamão tratado com mancozebe, tratamento 2 (320 g ia/ha), de acordo com a procedência.

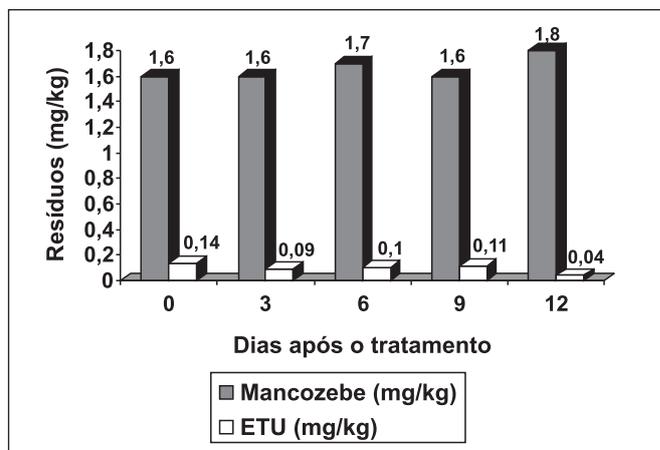


Figura 3. Resultado do estudo de dissipação dos resíduos de EBDC (mancozebe) e etilenotiuréia nas amostras de mamão tratado com mancozebe, tratamento 1 (160 g i.a/ha), realizado em Lins-SP.

um risco à saúde da população. Portanto, é improvável que a ingestão diária seja excedida na prática, desde que os LMR sejam estabelecidos para os principais usos do agrotóxico e utilizadas as Boas Práticas Agrícolas (Tabelas 3 e 4).

Pela dificuldade de se analisar os princípios ativos de ditiocarbamatos separadamente, vários países no mundo, incluindo o Brasil, têm monitorado seus resíduos como CS₂ total.

De 196 amostras de morango analisadas na Holanda, em 1998, 179 (91%) apresentaram resíduos de ditiocarbamatos em níveis que variaram de 0,1 a 0,6 mg/kg, sendo que 15 (68%) amostras de uva tinham resíduos em concentrações que variaram de 0,2 a 0,4 mg/kg, abaixo do LMR de 3mg/kg, e não foram encontrados resíduos nas 9 laranjas estudadas²⁵.

No Brasil, um trabalho realizado no Estado de Minas Gerais, mostra que 19,3% das hortaliças e 17,1% das frutas analisadas apresentaram resíduos de ditiocarbamatos em níveis de até 1,7 mg/kg²⁶.

Em Belo Horizonte-MG, resíduos de ditiocarbamatos foram pesquisados em 87 amostras de frutas e 11 de hortaliças. Constatou-se a presença de ditiocarbamatos em CS₂ em 24 (48%) das 98 amostras, tendo sido mais freqüentes em frutas como pêssego (100%), ameixa (60%), nectarina (50%) e morango (37,5%)²⁷.

Reis e Caldas²⁸ estudaram resíduos de ditiocarbamatos em 466 amostras de vegetais e frutas comercializadas na cidade do Rio de Janeiro. Observou-se que 63% das amostras apresentaram resíduos de ditiocarbamatos, sendo que 24% com concentrações superiores ao limite máximo permitido por lei. Alface, cenoura e tomate foram os produtos que apresentaram os maiores níveis de resíduos, com 50%, 47,4% e 38,2% das amostras acima do LMR, respectivamente.

Conceição²⁹ analisou resíduos de ditiocarbamatos em 80 amostras de tomate do Distrito Federal e 59% apresentaram resíduos em níveis que variaram de 0,2 a 1,2 mg/kg de CS₂.

Amostras de frutas e de outros vegetais têm sido analisadas no Brasil pelo Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos – PARA. Nos resultados obtidos, de junho de 2001 a junho de 2002, foram encontrados resíduos de ditiocarbamatos (resultados expressos mg de CS₂ por Kg de amostra), em 68 (69%) das 99 amostras de maçã, em níveis que variaram de 0,04 a 2,10 mg/kg; em 58 (40%) das 144 amostras de mamão, de 0,10 a 2,14 mg/kg; em 85 (60%) das 141 amostras de morango, de 0,10 a 1,03 mg/kg; em 1 (1,1%) das 92 amostras de banana em nível de 0,01 mg/kg e em 1 (0,7%) das 141 amostras de laranja em nível de 0,31 mg/kg. Foram também encontrados resíduos de ditiocarbamatos em 100 (53%) das 189 amostras de tomate em níveis que variaram de 0,07 a 1,50 mg/kg; em 57

Tabela 3. Risco de ingestão de mancozebe (em CS₂) através do consumo de mamão, em % IDA.

Substância	Valor encontrado (mg/kg)	Ingestão mg/pessoa/dia ^{a,b}	IDA (mg/kg pc/dia)	IDA ^a (mg/pessoa/dia)	% IDA
Mancozebe	1,8*	0,01015	0,03 ^c	1,8	0,6
ETU	0,09*	0,00091	0,002 ^d	0,12	0,7

* considerando o maior valor encontrado no tratamento 1 (uso normal); a = considerando como o consumo de mamão= 0,01015kg/dia¹⁶; b = peso médio de uma pessoa igual a 60 kg; c= valor estabelecido pelo CODEX ALIMENTARIUS¹²; d= valor estabelecido pelo CODEX ALIMENTARIUS¹¹; EBDC= etilenobis-ditiocarbamatos (mancozebe, manebe, metiram e zinebe); IDA= Ingestão Diária Aceitável; pc = peso corpóreo.

Tabela 4. Comparação da Ingestão Diária Máxima Teórica de etilenobisditiocarbamato com a Ingestão Diária Aceitável¹²

	IDA (mg/kg pc/dia)	IDA ^a (mg/pessoa/dia)	Ingestão Diária Máxima Teórica (mg/pessoa/dia) ^c	% IDA
Ditiocarbamatos				
Mancozebe	0,03 ^b	1,80	1,47 _{mancozebe}	82
			0,66 _{frutas-mancozebe}	37
Manebe	0,03 ^b	1,80	0,04 _{manebe}	2
Etilenobisditiocarbamatos EBDC-CS ₂	0,03 ^b	1,80	0,85 _{CS2}	47
			0,37 _{CS2-frutas}	20

a = considerando o peso médio de uma pessoa igual a 60 kg; b= valor estabelecido pelo CODEX ALIMENTARIUS¹² para o grupo dos EBDC; c= ; LMR pela RE 165 de 02/09/03¹³; EBDCs= etilenobisditiocarbamatos (mancozebe, manebe, metiram e zinebe); IDMT= Ingestão Diária Máxima Teórica; IDA= Ingestão Diária Aceitável; pc = peso corpóreo.

(35%) das 162 amostras de alface em níveis que variaram de 0,10 a 3,50 mg/kg; e em nenhuma das 176 amostras de batata e em nenhuma das 134 amostras de cenoura³⁰. Considerando o nível mais alto encontrado em amostra de mamão (2,14 mg/kg de CS₂) verifica-se que está abaixo do LMR que é de 3,0 mg/kg de CS₂³¹.

Como não são estabelecidos LMR para ETU, os valores da IDMT de ETU foram estimados a partir dos valores das IDMT dos EBDCs, considerando dados de estudos da metabolização e excreção de ETU, realizados por Nelson e Didonato²⁴. Com fatores de conversão de 8,7% para mancozebe e de 5,2% para manebe foram calculados os valores de ETU a partir das IDMT de mancozebe e manebe e os dados encontram-se na Tabela 5.

A Ingestão Diária Máxima Teórica calculada para ETU representa 106,5% da IDA, pela conversão da IDMT de mancozebe e 1,7% da IDA, pela conversão de manebe. Para o EBDCs total a IDMT calculada para ETU representa 108,2% da IDA, conforme Tabela 5.

No Brasil, existem poucos trabalhos de pesquisa de ETU em alimentos. Araujo³², em 1998, analisou amostras de tomate no Estado de Pernambuco e o ETU foi detectado em 25 (78,1%) das 32 amostras de tomate de mesa e em 15 (55,5%) das 27 amostras de tomate industrial. Porém, 3 (11,1%) amostras de tomate industrial e apenas 1 (3,1%) de mesa apresentaram resultados acima do limite de quantificação do método, que foi de 0,025mg/kg.

Tem-se uma preocupação maior com alimentos consumidos cozidos e industrializados, pois os processos de preparo e de manufatura dos mesmos podem favorecer a decomposição dos EBDCs a ETU, levando a um aumento dos níveis de ETU nestes produtos. Pesquisadores encontraram resíduos de ETU em amostras de alimentos infantis, sendo 38 (12 %) de 310 amostras à base de frutas ou suco de frutas; em 11 (6%) de 167 amostras originárias de vegetais; 6 (9%) de 65 amostras de cereais e 9 (13%) das 70 amostras de sobremesas³³.

Se a população estivesse ingerindo todos os alimentos com níveis iguais aos LMR permitidos, e considerando a conversão de 8,7% de mancozebe e de 5,2% de manebe, poderia estar correndo risco de efeito adverso à saúde pela ingestão de ETU, uma vez que o valor da IDMT de EBDC

ultrapassou a IDA (108,2%), conforme pode ser observado na Tabela 5. Merecem uma maior atenção os subgrupos: pessoas que consomem mamão diariamente ou que consomem apenas vegetais e crianças que podem consumir mamão e frutas *in natura* e legumes cozidos e industrializados desde os primeiros meses de vida. Por apresentarem menor peso corpóreo, o risco de ingestão de ETU pelo consumo de alimentos é maior na criança do que no adulto. Porém, a IDMT é uma superestimativa e são necessárias estimativas mais precisas para a ingestão de resíduos de ETU. Estas estimativas só poderão ser feitas quando informações dos níveis desses resíduos em produtos comercializados estiverem disponíveis. Portanto, destaca-se que é importante o estudo dos níveis de resíduos de ETU em alimentos consumidos pela população para que se possa fazer uma avaliação de risco mais condizente com a realidade.

CONCLUSÕES

1. Os métodos estudados em amostra de mamão, apresentaram resultados dentro dos níveis aceitáveis, com boa exatidão e precisão propiciando implantação da metodologia para análise de ETU em mamão no laboratório.
2. O conhecimento dos níveis do metabólito ETU, presentes em mamão tratado com EBDCs, alerta para a necessidade de conhecimento dos níveis presentes nos alimentos consumidos pela população.
3. Os dados do estudo de dissipação de resíduos de ETU fornecem subsídios para estabelecimento de períodos de carência na legislação, ou seja, dias que se deve aguardar, após a aplicação, para consumo.
4. IDMT é uma superestimativa, e deve-se realizar monitoramento de resíduos de ETU, nos alimentos consumidos pela população, para cálculo da exposição real e avaliação de risco.

REFERÊNCIAS

1. Mestres R, Mestres G. Ethylenebisdithiocarbamate and ethylenethiourea residues in food. *Rev Bras Toxicol* 1991; 4(1/2): 11-8
2. [WHO] World Health Organization. Environmental Health Criteria 78. Dithiocarbamate pesticides, ethylenethiourea, and propylenethiourea: a

Tabela 5. Comparação dos valores calculados de ETU, baseados na conversão de mancozebe e manebe para ETU, com a IDA¹¹

EBDC	IDMT (mg/pessoa/dia)	IDMT ETU calculada (mg/pessoa/dia)	IDA ^a ETU (mg/kg pc/dia)	IDA ETU (mg/pessoa/dia)	% IDA ETU
Mancozebe	1,47 ^b	0,1278 ^c	0,002	0,12	106,5
Manebe	0,04 ^b	0,0020 ^d	0,002	0,12	1,7
EBDC	1,51 ^b	0,1328	0,002	0,12	108,2

a= valor estabelecido pelo Codex Alimentarius¹¹; b= LMR pela RE 165, de 02/09/03¹³; c= conversão do valor da IDMT de mancozebe encontrado pelo fator de 8,7% ; d= conversão do valor da IDMT de manebe encontrado pelo fator de 5,2%.

- general introduction. Geneva; 1988.
3. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria n° 03, de 16 de janeiro de 1992. Ratifica os termos das "Diretrizes e orientações referentes à autorização de registros, renovação de registro e extensão de uso de produtos agrotóxicos e afins n° de 09 de dezembro de 1991". Diário Oficial da União, Brasília, 04 fev. 1992 p.1356.
 4. Elia MC, Arce G, Hurt SS, Neill PJ, Scribner HE. The genetic toxicology of ethylenethiourea: a case study concerning the evaluation of a chemical's genotoxic potential. *Mut Res* 1995; 341:141-9.
 5. Triverdi N, Kakkar R, Srivastava MK, Mithal A, Rauzadam RB. Effect of oral administration of fungicide-mancozeb on thyroid gland of rat. *Indian J Exp Biol* 1993; 31: 564-6.
 6. Yoshida A, Harada T, Maita K. Tumor induction by concurrent oral administration of ethylenethiourea and sodium nitrite in mice. *Toxicol Pathol* 1993; 21:303-1.
 7. Yoshida A, Harada T, Hayashi S, Mori I, Miyajima H, Maita K. Endometrial carcinogenesis induced by concurrent oral administration of ethylenethiourea and sodium nitrite in mice. *Carcinogenesis* 1994; 15:2311-8.
 8. Nebbia C, Ferrero E, Valenza F, Castagnaro M, Re G, Soffietti MG. Pathologic changes, tissue distribution and extent of conversion to ethylenethiourea after subacute administration of zinc ethylene-bis-dithiocarbamate (zineb) to calves with immature rumen function. *Am J Vet Res* 1991; 52:1717-22.
 9. [IARC] International Agency for Research on Cancer. Genetic and related effects. *IARC Monogr Eval Carcinog Risk Hum Suppl* 1987; 6:304-7.
 10. [JMPR] Joint Meeting of the FAO Panel of Experts on Pesticide Residues in Food and the Environment and the WHO Expert Group on Pesticide Residues; 1993 Sept 20-29; Geneva. Report. Geneva: FAO; 1994. (FAO Plant Production and Protection).
 11. [FAO/WHO] Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization. Food Standards Programme Codex Alimentarius Commission. Pesticide residues in food. Rome; 1994. v.2.
 12. [FAO/WHO] Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization. Food Standards Programme Codex Alimentarius Commission. Pesticide residues in food: maximum residue limits. Rome; 1998 v. 2B.
 13. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução-RE n° 165, de 29 de agosto de 2003. Diário Oficial da União, Brasília, 02 de set. 2003. p.48-50.
 14. [SEAGRI] Secretaria da Agricultura, Irrigação e Reforma Agrária da Bahia. Cultura mamão. Disponível em <URL: <http://www.seagri.ba.gov.br>> [2003 abr 6]
 15. Silva EMF da, coordenador. Estudo sobre o mercado de frutas. Brasília: FIPE, 1999.
 16. [IBGE] Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa de orçamentos familiares 1995-1996. Rio de Janeiro: Ministério do Planejamento e Orçamento; 1998. v.2.
 17. [IBGE] Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Sistema IBGE de Recuperação Automática – SIDRA. Disponível em <URL: <http://www.sidra.ibge.gov.br>> [2003 maio 7]
 18. Toledo HHB, Steling CM, Gojtan Jr E, Baptista GC, Aleluia I, Lange Jr L et al. Manual: critérios mínimos para a condução de estudos de resíduos. São Paulo: GARP; 2002. 2 Pt.
 19. Diserens H. Determination of ethylenethiourea in various foods. *Lab News* 1991; 62:69-80.
 20. Thier H, Zeumer H, editores. Multiresidue method S15 - dithiocarbamate and thiuram disulfide fungicides photometric determination. In: Manual of pesticide residues analysis. Deutsche. Forschungsgemeinschaft, Pesticides Comm. Weinheim: Verlag; 1987. v. I. p. 353-60.
 21. European Commission. Directorate General health and Consumer Protection. Guidance document on residual analytical methods: SANCO/825/00 rev. 6. 2000.
 22. [FAO/WHO] Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization. Food Standards Programme Codex Alimentarius Commission. Good laboratory practice on pesticide residue in food. Rome; 1993. Suppl 1. v. 2. Section 4.2, 164.
 23. [EPA] Environmental Protection Agency. Office of Prevention, Pesticide and Toxic Substances. Residue chemistry test guidelines. Washington; 1996.
 24. [MAFF] Ministry of Agriculture, Fisheries & Food. Advisory Committee on Pesticides. Position document on consumer risk arising from the use of ethylene bisdithiocarbamates. London: 1990.
 25. De Kok A. Control of pesticide residues in food European model. In: Proceedings of Workshop Control of Pesticide Residues in Food European Model; 1999 out 4-6; Araraquara, (BR). São Paulo: GARP; 1999.
 26. Soares IAA, Goulart MCP, Queiroz RL, Mello SMM, Ávila JT, Azevedo SF. Resíduos de fungicidas orgânicos do grupo dos ditiocarbamatos em frutas e hortaliças. Minas Gerais: Secretaria de Estado da Agricultura e Pecuária; 1987. p. 99-100.
 27. Pereira EC. Resíduos de fungicidas orgânicos do grupo dos ditiocarbamatos em frutas e outros produtos de origem vegetal. *Rev Soc Bras Toxicol* 1988; 1(1/2):41-3.
 28. Reis MRCS, Caldas LQA. Dithiocarbamate residues found on vegetables and fruit marketed in the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Ciênc Cult* 1991; 43 (3):212-8.
 29. Conceição MH. Resíduos de pesticidas em tomates: metodologia analítica e avaliação da exposição humana. Brasília; 2002. [Tese de Doutorado – Instituto de Química da Universidade de Brasília].
 30. [ANVISA] Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos – PARA. Resultados analíticos de 2002. Brasília; 2003. Disponível em URL: http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/residuos/resl_anual_2002_an2.pdf [2003 nov 15]
 31. [ANVISA] Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Toxicologia. Disponível em <URL: <http://www.anvisa.gov.br>> [2003 jun 13]
 32. Araújo ACP. Importância da análise de resíduos de praguicidas para ações de saúde pública: estudo da cultura do tomate no Estado de Pernambuco. São Paulo; 1998. [Tese de Doutorado - Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo].
 33. Richardson M. Pesticides - friend or foe? *Wat Sci Technol* 1998; 37(8):19-25.

Qualidade física e química de ovos de codornas alimentadas com dietas modificadas

Physical and chemical quality of eggs from quails fed with modified diets

RIALA6/1017

Neusa Fátima SEIBEL^{1*}; Lisiane das Neves BARBOSA¹; Paulo Machado GONÇALVES¹; Leonor Almeida de SOUZA-SOARES²

* Endereço para correspondência: ¹Engenharia de Alimentos, FURG, Rua Engenheiro Alfredo Huch, 475. Caixa Postal 474. CEP 96201-900, Rio Grande/RS, e-mail: nseibel@pop.com.br.

² Professora Doutora Visitante do Departamento de Química, FURG, Rio Grande/RS.

Recebido: 14/11/2003 – Aceito para publicação: 30/06/2005.

RESUMO

O objetivo do trabalho foi de verificar as mudanças físicas e químicas em ovos de codornas, alimentadas com dietas controle e contendo a fração sólida de silagem química de resíduos de pescado, nas porcentagens de 3,3%, 6,6% e 9,9%, durante 30 dias. O experimento foi realizado utilizando-se 80 codornas com 35 semanas de idade, as quais foram divididas em blocos aleatórios em 5 gaiolas/dieta e 4 animais/gaiola. Os ovos foram coletados e selecionados por pesos variando de 10,5g a 12,0g. Para a avaliação da composição foi utilizada a metodologia oficial para ovos, determinando-se a umidade, as proteínas e cinzas em gemas e claras e os lipídios somente em gemas. Quanto às análises físicas foram determinados a perda de peso, as relações clara/ovo, gema/ovo e casca/ovo, a massa específica de claras e gemas, a Unidade Haugh e o índice gema. Ao final do experimento foi observado que as alterações ocorridas nos ovos são físicas e estão mais relacionadas com o tempo de armazenamento do que com a mudança na dieta das aves. A maior perda de peso dos ovos foi de 2,64% no 30º dia; a queda na qualidade da clara passou de 76 para 72 Unidades Haugh e não houveram diferenças estatísticas nas análises químicas dos ovos.

Palavras-Chave. ovos de codornas, composição, qualidade interna, silagem química, resíduo de pescado.

ABSTRACT

The objective of this work was to verify the physical and chemical changes in quail eggs fed with control diet and diets containing percentages of 3.3%, 6.6% and 9.9% of solid fraction of fish residues chemical silage, for 30 days. The experiment was performed using 80 quails of 35 weeks old. They were divided at random into blocks in five cages/diets and four birds/cage. The eggs were selected according to weights varying from 10.5g to 12.0g. For egg composition analysis was used the official methodology, evaluating the moisture, proteins and ashes in yolks and albumens and lipids in yolks. The physical analyses consisted of weight loss, albumen/egg ratio, yolk/egg ratio and shell/egg ratio, specific mass of albumens and yolks, Haugh Units, and yolk index. The data of the present study showed that alterations occurred eggs physical features were rather more correlated with storage time than the change in bird diets. The major egg weight loss was 2.64% at 30th day; and albumen quality decayed from 76 to 72 Haugh Units. No statistically significant differences in quail eggs chemical analyses were observed.

Key-words. quail eggs, composition, internal quality, chemical silage, fish residue.

INTRODUÇÃO

Praticamente em todas as culturas, os ovos têm sido apreciados tanto por suas propriedades nutritivas quanto funcionais. Nas sociedades ocidentais o maior consumo se dá para ovos de galinha¹, porém isto está se modificando, os ovos de codornas estão ganhando mercado, principalmente em restaurantes como acompanhamento de diferentes pratos.

Há 50 anos os problemas que envolviam ovos diziam respeito à sua produção e armazenamento, por isso a qualidade dos mesmos estava relacionada com as condições da casca, gema e clara. Hoje o termo “qualidade” é sinônimo das propriedades físicas e das modificações químicas e nutricionais que o ovo pode sofrer².

Vários fatores, tais como: tamanho do ovo, idade e raça das aves, estação do ano, composição da dieta e tempo de armazenamento podem influenciar na qualidade dos ovos. O peso dos ovos e de seus componentes, clara e gema, é muito influenciado, principalmente pela dieta, pois se esta possui altos níveis de gordura, o peso dos ovos aumentará^{3,4,5}. A qualidade da clara, medida em Unidades Haugh diminui gradativamente com o passar do tempo^{6,7}.

Em relação a influência exercida pelas dietas, vários autores mencionam as mudanças em vitaminas⁸, lipídios⁹, cinzas¹⁰ e minerais¹¹. Outra mudança que pode ser feita é a incorporação da fração sólida de silagem química de resíduos de pescado nas rações a serem elaboradas, e deste modo, contribuir efetivamente para um acréscimo na qualidade nutricional do produto final, que será fornecido aos animais.

A silagem pode ser definida como um produto líquido preparado com pescado inteiro ou seus resíduos moídos, por meio de processos que causem a solubilização de seus componentes. A liquefação é feita por enzimas do próprio pescado, dependendo da temperatura de hidrólise, o tempo de separação das frações líquida e sólida pode variar de um a vários dias¹².

O objetivo do trabalho foi verificar as mudanças físicas e químicas em ovos de codornas alimentadas com dietas controle e contendo a fração sólida de silagem química de resíduos de pescado, nas porcentagens de 3,3%, 6,6% e 9,9%, durante 30 dias.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado utilizando-se 80 codornas com 35 semanas de idade, as quais foram divididas em blocos casualizados em 5 gaiolas/dieta e 4 animais/gaiola, sendo que água e dieta foram ofertadas *ad libitum*. As codornas permaneceram em ambiente climatizado no laboratório de Experimentação Animal do Biotério Central da UFPel, com temperatura de 22°C±1 e com foto-período controlado por temporizador, com ciclo de claro/escuro de 16h e 8h. As aves foram alimentadas durante 21 semanas com dietas controle e contendo a fração sólida de silagem química de resíduos de pescado nos níveis de 3,3%, 6,6% e 9,9% (Tabela 1).

Preparo das amostras: Os ovos foram coletados e apenas selecionados aqueles com peso entre 10,5g e 12,0g. As amostras foram armazenadas em caixas de isopor para 30 unidades, sob temperatura de refrigeração (7,3°C±0,5) e umidade relativa de 77%±5, com exceção das que foram imediatamente analisadas. As análises foram realizadas de 10 em 10 dias, num total de 30 dias.

Perda de peso: Os ovos foram pesados individualmente no primeiro dia e armazenados. No dia das análises foram novamente pesados, onde calculou-se o percentual de perda de peso durante o armazenamento.

Relações clara/ovo, gema/ovo e casca/ovo: Após os ovos serem quebrados e terem seus constituintes separados, fez-se os cálculos tomando-se o peso de cada componente em relação ao peso do ovo inteiro.

Tabela 1. Formulação das dietas para alimentação das aves, em gramas.

Componentes	Controle	3,3% da fração sólida	6,6% da fração sólida	9,9% da fração sólida
Milho moído	2833	2886	2909	2746
Farelo de Soja	1555	1413,5	1277	1171
Areia	-	-	14	118
Suplemento vitamínico e mineral	25	25	25	25
Calcário	338	338	338	339
Fosfato Bicalcítico	80	80	82	84
Sal Comum	23	23	23	23
Metionina	8	6	3	-
Óleo de Arroz	135	64	-	-
Fração sólida da Silagem	-	165	330	495
Total	4997	5000,5	5001	5001

As dietas foram formuladas através do Programa User Friendly Feed Formulation- UFFF 1.11^{13,14}.

Massa específica da clara e da gema: foram determinadas através dos respectivos pesos e volumes.

Qualidade da clara: os ovos foram pesados individualmente em balança de precisão, em seguida a casca foi serrada e seus constituintes, clara e gema, foram colocados sobre uma superfície de vidro para que suas alturas fossem determinadas com o auxílio de um paquímetro. De posse dos dados de peso e altura, calculou-se a Unidade Haugh (HU), utilizando a seguinte equação: $HU = 100 \log (H + 7,57 - 1,7W^{0,37})$, (H = altura da clara em milímetros e W = peso do ovo em gramas).

Qualidade da gema: foi avaliada através das medidas de altura (AG) e largura (LG) da gema. A relação entre os dois parâmetros forneceu o índice gema IG = AG/LG.

Determinações químicas: as determinações realizadas foram: umidade, proteínas e cinzas em gemas e claras e lipídios somente nas gemas. Estas determinações também foram realizadas nas diferentes rações. As análises foram segundo a A.O.A.C.¹⁵, para os lipídios foi utilizada hidrólise ácida, para as proteínas o método de Microkjeldahl, com fator de correção para ovos (6,68), as cinzas foram determinadas em mufla a 600°C e as umidades em estufa a 105°C, ambas através de métodos gravimétricos.

Análise estatística: o tratamento dos dados foi por análise de variância (ANOVA two-way) e a comparação das médias pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%, através do programa STATISTICA 98.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A perda de peso aumentou gradualmente com o decorrer do período de armazenamento, chegando a 2,64% no final dos 30 dias de análise. Embora não tenha havido uma relação entre as dietas, a que continha 3,3% da fração sólida de silagem nos últimos dez dias perdeu mais peso do que as demais (Tabela 2). Logo que o ovo é posto começam a ocorrer mudanças que

baixam a qualidade interna, estas mudanças podem ser retardadas por resfriamento, mas não evitadas totalmente. Durante a maturação dos ovos, o tamanho da câmara de ar aumenta proporcionalmente com o aumento da perda de umidade; a gema se alarga e a clara torna-se menos espessa. Há também a perda de água através da casca, pois existe um movimento de água da clara para a gema por causa da pressão osmótica maior da gema¹⁶. Estas mudanças são percebidas e quantificadas quando análises físicas são determinadas.

Nas relações gema/ovo foi observado um aumento nas médias quando o primeiro dia foi comparado com os outros dias de análise (Tabela 2), isto foi devido ao movimento da água da clara para a gema, durante o período de armazenamento¹⁶. O menor valor no primeiro dia também ocorreu nas amostras oriundas de aves alimentadas com dietas contendo a fração sólida de silagem, concordando com Beyer e Jensen¹⁷, que observaram redução de peso das gemas, quando as dietas foram modificadas. No entanto, quando os mesmos autores avaliaram a idade das aves, observaram que houve um aumento de peso das gemas conforme aumentava a idade da ave⁹.

Para as relações clara/ovo e casca/ovo, não foi verificada diferença estatística entre as amostras provenientes de diferentes dietas (Tabela 3), corroborando com os resultados obtidos por Vilchez et al¹⁸, quando estes analisaram ovos provenientes de diferentes dietas, porém Hussein et al³ observaram diferença no peso das cascas, quando analisaram ovos de aves de diferentes raças e idades.

A massa específica das claras e gemas é uma medida que relaciona o peso com o volume. Os resultados desta determinação (Tabela 4) foram influenciados pelo peso, pois o volume permaneceu praticamente constante nas diferentes dietas, durante o tempo do experimento. As claras com 20 dias de armazenamento apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação aos demais dias, pois tiveram as menores médias. Com relação à gema, não houve diferença estatística entre as amostras.

Tabela 2. Perdas de peso (%) e relações gema/ovo de amostras provenientes de ovos de codornas alimentadas com dietas contendo diferentes percentuais da fração sólida da silagem de resíduo de pescado.

Dietas	Perda de peso			Relações gema/ovo			
	10dias	20dias	30dias	1 dia	10 dias	20 dias	30 dias
Controle	0,53 ^a	1,21 ^b	1,58 ^c	29,90 ^a	31,88 ^b	31,77 ^b	31,80 ^b
	±0,17	±0,55	±0,49	±3,12	±1,68	±1,82	±1,92
3,3% da fração sólida	0,54 ^a	1,11 ^b	2,64 ^c	29,80 ^a	31,11 ^b	31,11 ^b	31,75 ^b
	±0,17	±0,43	±1,39	±1,44	±1,66	±1,55	±1,57
6,6% da fração sólida	0,44 ^a	0,94 ^b	1,57 ^c	29,45 ^a	29,75 ^b	31,08 ^b	30,56 ^b
	±0,17	±0,40	±0,66	±1,78	±1,74	±2,48	±1,56
9,9% da fração sólida	0,52 ^a	1,15 ^b	1,44 ^c	30,02 ^a	30,83 ^b	31,54 ^b	31,53 ^b
	±0,22	±0,41	±0,34	±1,35	±1,85	±1,97	±2,66

Média ± desvio padrão, n = 12.

Médias seguidas pelas mesmas letras, nas linhas, não diferiram entre si, segundo o teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

Durante o armazenamento dos ovos há a transformação da ovoalbumina em S-ovoalbumina e a dissociação do complexo ovomucina-lisozima com a destruição do gel de ovomucina. São reações importantes no plano tecnológico, pois provocam a perda, ao menos parcial, das propriedades gelificantes e espumantes e da viscosidade das claras, tornando-as liquefeitas¹⁹. A Unidade Haugh é a medida utilizada para determinar esta transformação, pois relaciona o peso do ovo com a altura da clara. A qualidade da clara apresentou diferença estatística quando as dietas e os dias foram analisados separadamente. As amostras de aves alimentadas com a dieta controle apresentaram maior média em relação às demais dietas, e as amostras com 30 dias de armazenamento, nas quatro dietas avaliadas, foram estatisticamente diferentes devido às médias serem menores em relação aos demais dias (Tabela 5), concordando com Souza et al⁶, que em seu experimento observou o mesmo comportamento. Este decréscimo na Unidade Haugh ao longo do tempo e em função das dietas, também foi descrito por Ahn et al⁷, quando analisou ovos oriundos de diferentes raças de galinhas alimentadas com dietas controle e contendo ácido linolênico, por 28 dias.

As condições das gemas são avaliadas através do índice gema, que relaciona a altura e o diâmetro das mesmas. Esta determinação não apresentou diferença estatística entre as amostras quando dias e dietas foram avaliados (Tabela 6), sendo assim, deve-se mencionar que as trocas, principalmente de umidade, que proporcionam um alargamento das gemas, não tiveram influência sobre este parâmetro. Souza et al⁶, relatam que o índice gema foi menor nas amostras controle quando analisaram a influência de diferentes níveis de ácido ascórbico na qualidade dos ovos, porém esta diferença não foi estatisticamente significativa.

Com as análises de composição centesimal das diferentes dietas oferecidas às codornas (Tabela 7), percebe-se que a umidade e o teor de proteínas foram semelhantes para todas as dietas, já as cinzas das dietas contendo 6,6% e 9,9% da fração sólida de silagem apresentaram-se em maior quantidade, isto foi devido à areia adicionada e as cinzas da própria silagem. Quanto aos lipídios, notou-se que as dietas controle e 3,3% tiveram um percentual maior, isto porque nestas foi acrescentado óleo de arroz para suprir as necessidades nutricionais das aves.

Tabela 3. Relações clara/ovo e casca/ovo de ovos de codornas alimentadas com dietas contendo diferentes percentuais da fração sólida da silagem de resíduo de pescado.

Dieta	Relações clara/ovo				Relações casca/ovo			
	1 d	10 d	20 d	30 d	1 d	10 d	20 d	30 d
Controle	54,44 ^a ±3,78	55,11 ^a ±2,18	53,61 ^a ±2,86	54,40 ^a ±2,57	15,65 ^a ±3,15	13,00 ^a ±1,61	14,35 ^a ±1,97	13,80 ^a ±2,13
3,3% da fração sólida	54,87 ^a ±2,34	55,24 ^a ±1,49	54,45 ^a ±1,80	54,60 ^a ±1,78	15,20 ^a ±2,08	13,64 ^a ±1,56	14,44 ^a ±1,22	13,64 ^a ±1,22
6,6% da fração sólida	56,05 ^a ±2,56	55,64 ^a ±2,06	55,33 ^a ±3,16	55,88 ^a ±1,69	14,50 ^a ±1,66	14,60 ^a ±1,46	13,59 ^a ±1,06	13,55 ^a ±1,04
9,9% da fração sólida	55,90 ^a ±2,89	55,89 ^a ±2,54	55,93 ^a ±1,63	55,91 ^a ±2,97	14,08 ^a ±2,23	13,28 ^a ±1,49	12,53 ^a ±1,06	12,56 ^a ±0,92

Média ± desvio padrão, n = 12.

Médias seguidas pelas mesmas letras, nas colunas, não diferiram entre si pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

Tabela 4. Massa específica das claras e gemas dos ovos de codornas alimentadas com as diferentes dietas.

Dieta	Claras				Gemas			
	1 d	10 d	20 d	30 d	1 d	10 d	20 d	30 d
Controle	0,94 ^a ±0,10	0,94 ^a ±0,05	0,88 ^b ±0,06	0,91 ^a ±0,08	1,07 ^a ±0,12	1,14 ^a ±0,10	1,11 ^a ±0,06	1,05 ^a ±0,08
3,3% da fração sólida	0,92 ^a ±0,08	0,91 ^a ±0,07	0,86 ^b ±0,05	0,91 ^a ±0,04	1,15 ^a ±0,07	1,11 ^a ±0,09	1,15 ^a ±0,10	1,05 ^a ±0,06
6,6% da fração sólida	0,94 ^a ±0,06	0,94 ^a ±0,06	0,88 ^b ±0,03	0,90 ^a ±0,05	1,16 ^a ±0,06	1,11 ^a ±0,09	1,12 ^a ±0,06	1,09 ^a ±0,06
9,9% da fração sólida	0,91 ^a ±0,04	0,93 ^a ±0,05	0,86 ^b ±0,05	0,90 ^a ±0,04	1,12 ^a ±0,04	1,10 ^a ±0,07	1,12 ^a ±0,07	1,18 ^a ±0,07

Média ± desvio padrão, n = 12.

Médias seguidas pelas mesmas letras, nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

Tabela 5. Unidade Haugh de ovos de codornas alimentadas com dietas contendo diferentes percentuais da fração sólida da silagem de resíduo de pescado.

Dietas	1 dia	10 dias	20 dias	30 dias
Controle	76,55 ^{a1} ±3,29	79,42 ^{a1} ±4,29	79,54 ^{a1} ±2,38	73,48 ^{b1} ±2,93
3,3% da fração sólida	73,18 ^{a2} ±3,43	77,73 ^{a2} ±3,24	76,26 ^{a2} ±3,41	72,46 ^{b2} ±2,65
6,6% da fração sólida	76,63 ^{a2} ±4,18	77,73 ^{a2} ±3,24	76,26 ^{a2} ±2,64	72,12 ^{b2} ±2,76
9,9% da fração sólida	76,63 ^{a2} ±4,18	77,73 ^{a2} ±3,24	75,50 ^{a2} ±3,34	72,54 ^{b2} ±2,58

Média ± desvio padrão, n = 12.

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferiram nas linhas e seguidas pelos mesmos números não diferiram nas colunas, segundo o teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

Tabela 6. Médias dos índices gemas de ovos de codornas alimentadas com dietas contendo diferentes percentuais da fração sólida da silagem de resíduo de pescado.

Dietas	1 dia	10 dias	20 dias	30 dias
Controle	0,50 ^{a1} ±0,06	0,45 ^{a1} ±0,06	0,49 ^{a1} ±0,05	0,47 ^{a1} ±0,03
3,3% da fração sólida	0,50 ^{a1} ±0,04	0,49 ^{a1} ±0,03	0,48 ^{a1} ±0,03	0,46 ^{a1} ±0,03
6,6% da fração sólida	0,47 ^{a1} ±0,06	0,50 ^{a1} ±0,04	0,49 ^{a1} ±0,03	0,48 ^{a1} ±0,03
9,9% da fração sólida	0,48 ^{a1} ±0,03	0,48 ^{a1} ±0,03	0,47 ^{a1} ±0,03	0,49 ^{a1} ±0,03

Média ± desvio padrão, n = 12.

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferiram nas linhas e seguidas pelos mesmos números não diferiram nas colunas, segundo o teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

Tabela 7. Composição centesimal (%) das dietas utilizadas na alimentação das codornas.

Dieta	Umidade	Cinzas	Proteínas	Lipídios
Controle	11,86 ^a ±0,15	10,24 ^a ±0,28	15,48 ^a ±0,58	6,18 ^a ±0,19
3,3% da fração sólida	12,18 ^a ±0,02	9,48 ^a ±0,08	16,92 ^a ±0,37	5,36 ^a ±0,80
6,6% da fração sólida	11,88 ^a ±0,21	11,34 ^b ±0,79	16,79 ^a ±0,70	3,67 ^b ±0,21
9,9% da fração sólida	11,61 ^a ±0,15	13,38 ^b ±1,74	17,43 ^a ±0,41	3,98 ^b ±0,62

Média ± desvio padrão, n = 3.

Médias seguidas pelas mesmas letras, nas colunas, não diferiram pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

Tabela 8. Média dos percentuais de umidades nas claras e gemas dos ovos de codornas alimentadas com diferentes dietas.

Dieta	Claras				Gemas			
	1 d	10 d	20 d	30 d	1 d	10 d	20 d	30 d
Controle	88,31 ^{a1}	88,06 ^{a1}	88,27 ^{a1}	88,07 ^{a1}	49,87 ^{a1}	50,16 ^{a1}	51,29 ^{a1}	51,93 ^{a1}
	±0,38	±0,11	±0,37	±0,53	±0,40	±2,34	±1,51	±1,13
3,3% da fração sólida	88,50 ^{a1}	88,53 ^{a1}	88,32 ^{a1}	88,28 ^{a1}	49,66 ^{a1}	49,53 ^{a1}	51,40 ^{a1}	50,35 ^{a1}
	±0,28	±0,39	±0,12	±0,59	±0,17	±1,38	±1,06	±0,45
6,6% da fração sólida	87,85 ^{a1}	88,04 ^{a1}	87,64 ^{a1}	87,69 ^{a1}	49,49 ^{a1}	50,32 ^{a1}	51,25 ^{a1}	50,71 ^{a1}
	±0,59	±0,56	±0,42	±0,41	±0,17	±2,18	±2,05	±1,34
9,9% da fração sólida	88,51 ^{a1}	88,27 ^{a1}	88,37 ^{a1}	88,87 ^{a1}	49,87 ^{a1}	51,40 ^{a1}	50,67 ^{a1}	50,65 ^{a1}
	±0,32	±0,33	±0,11	±0,20	±0,35	±2,55	±1,68	±1,72

Média ± desvio padrão, n = 3.

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferiram nas linhas e seguidas pelos mesmos números não diferiram nas colunas, segundo o teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

Em relação à umidade das claras e das gemas (Tabela 8), percebeu-se que os percentuais, entre todas as amostras, foram muito próximos, não apresentando diferença estatisticamente significativa quando as dietas foram analisadas, igualmente ao que foi observado na composição das rações. Entretanto, para as gemas houve um leve acréscimo nas amostras avaliadas após o primeiro dia, mas não apresentaram diferença estatística, isto também foi consequência da transferência de água da clara para a gema.

Estatisticamente não foi verificada diferença nas médias das proteínas das claras e das gemas nos quatro tipos de dietas (Tabela 9), isto foi consequência de que as características das proteínas não são influenciadas pela dieta das aves²⁰. Cobos et al¹⁰ também não verificaram diferença no teor de proteínas quando avaliaram ovos de galinhas alimentadas com diferentes rações. O mesmo foi relatado por Li et al²¹ quando analisaram ovos de galinhas de diferentes raças.

A quantidade média de lipídios presentes nas gemas não diferiu estatisticamente ao nível de significância de 5%, para as diferentes dietas (Tabela 10), estando de acordo com o trabalho de Cobos et al¹⁰. Entretanto Hall e McKay⁹ comentam que ovos oriundos de aves com idades heterogêneas apresentam diferente teor lipídico. Chwalibog²² relata que conforme aumenta a idade da ave aumenta a quantidade de lipídios e diminui a de proteínas.

Nas quantidades médias de cinzas das claras e das gemas, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre as amostras (Tabela 11), diferindo do estudo

de Cobos et al¹⁰, que ao avaliar as cinzas de gemas oriundas de galinhas alimentadas com diferentes dietas, observou variação estatística nos percentuais. Manson et al¹¹ analisaram a composição das cinzas de ovos de galinhas e relataram que nas claras o constituinte majoritário é o enxofre, seguido por cloro, sódio, potássio, cálcio, fósforo e magnésio. Nas gemas a maior quantidade foi expressa sob a forma de fósforo, seguido de cloro, enxofre, cálcio, potássio, sódio, magnésio e ferro.

A composição química dos ovos foi determinada em base úmida (dados não apresentados) e calculada em base seca, como apresentada neste trabalho. Os resultados médios, para todas as dietas no primeiro dia de análise e em base úmida, foram: 88,16% de umidade, 0,71% de cinzas e 11,16% de proteínas nas claras e 29,96% de lipídios nas gemas. Comparando estes resultados com os valores obtidos por Sotelo e Gonzáles²³ nota-se que são semelhantes, pois os autores determinaram 87,93% de umidade, 0,74% de cinzas, 10,48% de proteínas e 29,63% de lipídios. No entanto, os percentuais médios deste trabalho diferiram dos encontrados por Torres et al²⁴.

CONCLUSÕES

Ao final do experimento foi observado que as alterações ocorridas nos ovos são físicas e estão mais relacionadas com o tempo de armazenamento do que com a mudança na dieta das aves. Houve perda de peso dos ovos de todas as dietas, chegando a 2,64% no final do período; a massa específica das

Tabela 9. Percentuais médios das proteínas das claras e gemas de ovos de codornas alimentadas com diferentes dietas.

Dieta	Claras				Gemas			
	1 d	10 d	20 d	30 d	1 d	10 d	20 d	30 d
Controle	93,73 ^a ±1,22	94,13 ^a ±0,82	94,56 ^a ±1,83	92,76 ^a ±9,84	34,88 ^a ±0,82	31,91 ^a ±5,20	33,82 ^a ±3,44	28,58 ^a ±6,59
3,3% da fração sólida	93,44 ^a ±4,08	90,58 ^a ±16,29	87,62 ^a ±12,64	86,99 ^a ±2,30	35,67 ^a ±4,72	32,41 ^a ±8,18	34,94 ^a ±2,30	32,93 ^a ±2,19
6,6% da fração sólida	92,58 ^a ±4,19	89,32 ^a ±16,91	84,07 ^a ±9,18	94,49 ^a ±8,80	33,93 ^a ±2,03	33,80 ^a ±4,43	31,96 ^a ±8,54	36,36 ^a ±4,84
9,9% da fração sólida	95,42 ^a ±3,05	92,89 ^a ±10,74	84,10 ^a ±9,50	90,55 ^a ±14,71	35,83 ^a ±1,34	35,41 ^a ±4,74	29,40 ^a ±7,19	33,08 ^a ±9,06

Média ± desvio padrão, n = 3, em base seca.

Médias seguidas pelas mesmas letras, nas colunas, não diferiram pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

Tabela 10. Percentuais médios dos lipídios das gemas de ovos de codornas alimentadas com diferentes dietas.

Dieta	1 dia	10 dias	20 dias	30 dias
Controle	62,82 ^a ±1,81	60,48 ^a ±0,92	64,07 ^a ±3,11	56,82 ^a ±6,86
3,3% da fração sólida	60,88 ^a ±4,48	55,17 ^a ±4,90	52,15 ^a ±1,81	58,14 ^a ±2,37
6,6% da fração sólida	60,92 ^a ±5,30	59,07 ^a ±3,24	60,74 ^a ±0,97	59,53 ^a ±4,72
9,9% da fração sólida	61,63 ^a ±4,02	59,84 ^a ±6,39	63,34 ^a ±8,65	62,85 ^a ±1,64

Média ± desvio padrão, n = 3, em base seca.

Médias seguidas pelas mesmas letras, nas colunas, não diferiram pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

Tabela 11. Percentuais médios das cinzas das claras e gemas de ovos de codornas alimentadas com diferentes dietas.

Dieta	Claras				Gemas			
	1 d	10 d	20 d	30 d	1 d	10 d	20 d	30 d
Controle	6,14 ^a	5,78 ^a	5,98 ^a	6,23 ^a	3,61 ^a	3,68 ^a	3,39 ^a	3,39 ^a
	±0,22	±0,78	±1,02	±0,38	±0,13	±0,22	±0,17	±0,14
3,3% da fração sólida	5,82 ^a	6,68 ^a	5,88 ^a	5,84 ^a	3,57 ^a	3,72 ^a	3,42 ^a	3,39 ^a
	±0,70	±1,42	±0,30	±0,36	±0,38	±0,25	±0,07	±0,17
6,6% da fração sólida	4,85 ^a	6,26 ^a	5,99 ^a	5,63 ^a	3,61 ^a	3,46 ^a	3,64 ^a	3,52 ^a
	±0,96	±0,52	±0,59	±0,36	±0,38	±0,12	±0,13	±0,07
9,9% da fração sólida	5,55 ^a	6,66 ^a	5,34 ^a	6,20 ^a	3,47 ^a	3,80 ^a	3,57 ^a	3,40 ^a
	±0,88	±0,27	±1,47	±0,46	±0,07	±0,12	±0,43	±0,12

Média ± desvio padrão, n = 3, em base seca.

Médias seguidas pelas mesmas letras, nas colunas, não diferiram pelo teste de Tukey ao nível de significância de 5%.

claras foi menor no 20º dia de análise; a relação gema/ovo foi menor no primeiro dia de avaliação; a qualidade da clara diminuiu ao final do tempo analisado, passando de 76 para 72 Unidades Haugh e as claras cujas aves receberam dietas modificadas apresentaram menores médias, em relação a controle. Não foi observada influência das diferentes dietas ingeridas pelas aves na composição centesimal dos ovos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FAPERGS, CNPq e CAPES pelo suporte financeiro, às indústrias TORQUATO-PONTES PESCADOS e ALBANO PESCADOS pelo fornecimento dos resíduos e aos estudantes da UFPel: Cibelem, Marcele, Cláudia, Leandro e Viviane, pela condução dos experimentos com as codornas.

REFERÊNCIAS

- Muller HG, Tobin G. Alimentos de origen animal. In: Muller HG, Tobin G. *Nutricion y Ciencia de los Alimentos*. Zaragoza: Ed Acribia, 1996. p. 221-6.
- Stadelman WJ. The incredibly functional egg. *Poult Sci* 1999; 78: 807-11.
- Hussein SM, Harms RH, Janky DM. Effect of age on the yolk to albumen ratio in chicken eggs. *Poult Sci* 1993; 72: 594-7.
- Peebles ED, Zumwalt CD, Doyle SM, Gerard PD, Latour MA, Boyle CR et al. Effects of breeder age and dietary fat source and level on broiler hatching egg characteristics. *Poult Sci* 2000; 79: 698-704.
- Yannakopoulos AL, Tserveni-Gousi AS, Christaki E. Effect of natural zeolite on yolk: albumen ratio in hen eggs. *Br Poult Sci* 1998; 39: 506-10.
- Souza PA, Souza HBA, Oba A, Gardini CHC. Influence of ascorbic acid on egg quality. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 2001; 21: 273-5.
- Ahn DU, Sunwoo HH, Wolfe FH, Sim JS. Effects of dietary α -linolenic acid and strain of hen on the fatty acid composition, storage stability, and flavor characteristics of chicken eggs. *Poult Sci* 1995; 74: 1540-7.
- Surai PF, Sparks NHC. Designer eggs: from improvement of egg composition to functional food. *Trends in Food Science & Technology* 2001; 12: 7-16.
- Hall LM, Mckay JC. The relationship between yolk cholesterol and total lipid concentration throughout the first year of egg production in the domestic fowl. *Br Poult Sci* 1993; 34: 487-95.
- Cobos A, Hoz L, Cambero MI, Ordóñez JA. Dietary modification and hen strain dependence of egg yolk lipids. *Food Research International* 1995; 28: 71-6.
- Manson JM, Picken KJ, Draper MH, Thompson R. Variation among individual white-leghorn hens in the concentration of minerals in the albumen and yolk content of their eggs. *Br Poult Sci* 1993; 34: 899-909.
- Nunes ML. Silagem de pescado. In: Ogawa M, Maia EL. *Manual de Pesca – Ciência e Tecnologia do Pescado*. São Paulo: Ed Varela; 1999. v. 1. p. 371-6.
- Pesti GM, Miller BR, Chambers R. *User Friendly Feed Formulation Program 1.11*. University of Georgia, Department of Poultry Science and Department of Agriculture Economics, 1986.
- Nutrient Research Council (NRC). *Nutrient Requirements of Poultry*, 9 ed. Washington: Nat. Acad. Press; 1994.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. 16ed., vol. II, Washington, 1995.
- Griswold RM. Estágio atual da ciência de alimentos - Ovos. In: Griswold RM. *Estudo Experimental dos Alimentos*. Rio de Janeiro: Ed Edgard Blücher; 1972. p. 35-67.
- Beyer RS, Jensen LS. Cholesterol concentration of egg yolk and blood plasma and performance of laying hens as influenced by dietary α -ketoisocaproic acid. *Poult Sci* 1992; 71: 120-7.
- Vilchez C, Touchburn SP, Chavez ER, Lague PC. Eggshell quality in Japanese quail fed different fatty acids. *Poult Sci* 1992; 71: 1568-71.
- Powrie WD, Nakai S. Características de los alimentos líquidos de origen animal: huevos. In: Fennema OR. *Química de los alimentos*. Zaragoza: Ed Acribia; 1993. p. 931-959.
- Naber EC. The effect of nutrition on the composition of eggs. *Poult Sci* 1979; 58: 518-28.
- Li X, Nakano T, Sunwoo HH, Paek BH, Chae HS, Sim JS. Effects of egg and yolk weights on yolk antibody (IgY) production in laying chickens. *Poult Sci* 1998; 77: 266-70.
- Chwalibog A. Factorial estimation of energy requirement for egg production. *Poult Sci* 1992; 71: 509-15.
- Sotelo A, González L. Huevo em polvo con bajo contenido de colesterol. Características nutricias y sanitarias del producto. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 2000; 50: 134-41.
- Torres EAFS, Campos NC, Duarte M, Garbelotti ML, Philippi ST, Rodrigues RSM. Composição centesimal e valor calórico de alimentos de origen animal. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 2000 Mai-Ago; Available from: URL: <http://www.scielo.com.br>.

Determinação de quinolonas por cromatografia líquida de alta eficiência empregando coluna monolítica de fase reversa

Determination of quinolones by high performance liquid chromatography using a monolithic reversed-phase column

RIALA6/1018

Blanca Elena O. MARKMAN^{1*}; Maria Regina W. KOSCHTSCHAK¹; Helena M. YANO¹.

* Endereço para correspondência: ¹Instituto Adolfo Lutz, Seção de Antibióticos do Serviço de Medicamentos, Divisão de Bromatologia e Química, Av. Dr. Arnaldo 355, Cep 01246-902, São Paulo, SP, e-mail: bmarkman@ial.sp.gov.br
Recebido: 13/04/2004 – Aceito para publicação: 25/06/2005.

RESUMO

As quinolonas são potentes antibacterianos sintéticos de terceira geração, que são indicadas para tratamento de diversas infecções do trato urinário, gastrointestinal e da pele. Este trabalho tem como objetivo propor um método por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para determinação das quinolonas: ciprofloxacina, análogo da ciprofloxacina etilenodiamina (substância relacionada) e norfloxacina. Estes compostos foram separados em coluna monolítica de fase reversa, sistema isocrático, detecção no comprimento de onda 275 nm, fase móvel contendo uma mistura de ácido fosfórico 0,042 mol/L, pH 3,0 ± 0,1 (ajustado com trietilamina): acetonitrila (87:13), vazão 1,6 mL/min, a temperatura ambiente. A curva analítica para ciprofloxacina compreendeu a faixa de 20,0-125,0 µg/mL e para norfloxacina de 20,0-100,0 µg/mL com coeficientes de correlação de 0,9999 e 0,9999, respectivamente. O tempo de retenção obtido para a ciprofloxacina foi de 3,4 min, para o análogo ciprofloxacina etilenodiamina, 2,4 min, e para a norfloxacina, 2,9 min. A resolução entre a ciprofloxacina e o análogo foi de 1,1. O método proposto é rápido, simples, exato, preciso e reprodutível e pode ser aplicado na análise de matérias-primas e na determinação de ciprofloxacina, ciprofloxacina etilenodiamina e norfloxacina, em cápsulas, comprimidos e soluções para infusão.

Palavras-Chaves. quinolonas; ciprofloxacina, norfloxacina, CLAE.

ABSTRACT

Quinolones are synthetic antibacterial agents used for treating a wide variety of infections of urinary tract, gastrointestinal tract, and skin. The aim of this study was to develop a method for performing the determination of ciprofloxacin, ciprofloxacin ethylenediamine analog (a related compound), and norfloxacin by means of high performance liquid chromatographic (HPLC) technique. The compounds were separated on a Chromolith RP18 column, with isocratic system. The mobile phase was a mixture of phosphoric acid 0.042 mol/L, pH 3.0 ± 0.1: acetonitrile (87:13), flow rate of 1.6 mL/min and UV detection at 275nm. The range of calibration curve was 20.0–125.0 µg/mL for ciprofloxacin and 20.0–100.0 µg/mL for norfloxacin. The correlation coefficient was 0.9999 for ciprofloxacin and 0.9999 for norfloxacin. The retention time for ciprofloxacin was 3.4 min, for ethylenediamine ciprofloxacin was 2.4 min, and 2.9 min for norfloxacin. Resolution between ciprofloxacin and ciprofloxacin ethylenediamine analog was 1.1. The proposed HPLC method is rapid, simple, accurate, reproducible, and it can be applied in analyzing raw-materials, as well as in determining ciprofloxacin, ciprofloxacin ethylenediamine and norfloxacin in diverse formats as capsules, tablets, and in solution for infusion.

Key Words. quinolones; ciprofloxacin; norfloxacin, HPLC

INTRODUÇÃO

Quinolonas (Figura 1) são substâncias antibacterianas sintéticas de terceira geração, relacionadas com a estrutura química do ácido nalidíxico, e que agem por mecanismo de ação similar, ou seja, por inibição da enzima DNA girase de bactérias. A presença da molécula piperazina e do átomo de flúor nas quinolonas aumenta a potência e o espectro antimicrobiano, inclusive para bactérias resistentes¹. A qualidade e a segurança de uso destes antibacterianos é garantida tanto pela quantificação das quinolonas quanto pela identificação e quantificação das chamadas substâncias relacionadas, que são contaminantes de síntese ou de degradação, cujos limites permitidos constam em monografias oficiais.

A literatura reporta vários métodos para quantificação de quinolonas, por espectrofotometria: na região do ultravioleta², espectrofotometria derivada³, espectrofotometria na região do visível com o uso de nitrato de ferro III⁴, com o uso de púrpura de bromocresol e azul de bromofenol⁵, com Sudam III como reagente cromogênico⁶, com o uso de 2,4-dinitrofluorbenzeno⁷, por espectrofluorometria⁸, por titulação em meio não aquoso com ácido perclórico como titulante⁹, por eletroforese capilar^{10, 11} e por cromatografia líquida de alta eficiência^{12, 13, 14, 15, 16}. Para a análise das substâncias relacionadas, no entanto, as técnicas mais adequadas são as cromatográficas.

Considerando-se a importância das quinolonas no combate às infecções do trato urinário, respiratório, gastrointestinal e da pele, este trabalho tem como objetivo propor um método por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em sistema isocrático, rápido, simples e reproduzível, utilizando coluna (Chromolith RP18) monolítica em fase reversa para a determinação de ciprofloxacina, do análogo ciprofloxacina etilenodiamina (substância relacionada) e de norfloxacina, em diferentes tipos de formulações farmacêuticas (pó, comprimidos, cápsulas e solução para infusão).

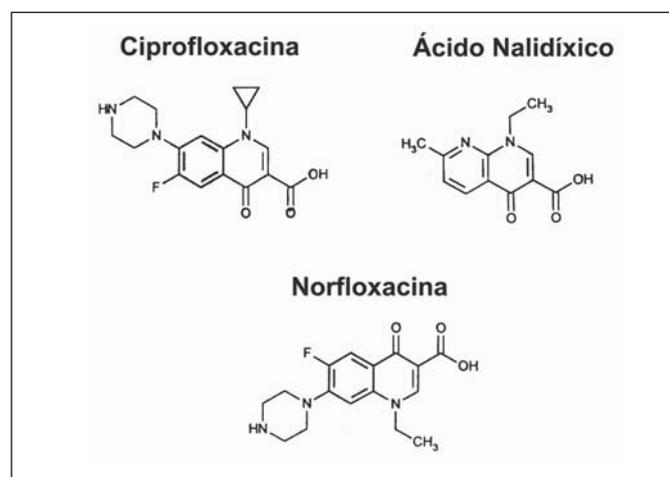


Figura 1. Estrutura química das quinolonas: ciprofloxacina, ácido nalidíxico e norfloxacina.

A coluna Chromolith RP18 utilizada consiste de um bastão de sílica, que possui estrutura típica com diporos do tipo mesoporo e macroporo no seu esqueleto, o que permite trabalhar com vazões altas à baixa pressão, capacitando assim separações rápidas e eficientes.

MATERIAL E MÉTODOS

Padrões e Reagentes: substâncias químicas de referência primárias: cloridrato de ciprofloxacina USP, norfloxacina USP, ciprofloxacina etilenodiamina USP. Reagentes: ácido fosfórico p.a. Merck®, dietilamina p.a. Merck®, acetonitrila grau HPLC Merck®, unidade filtrante HV em PV com membrana DU Rapore 0,45 µm de poro, 13 mm não estéril, Millipore®. Amostras: cápsulas duras de ciprofloxacina e de norfloxacina, comprimidos de ciprofloxacina e de norfloxacina, e solução para infusão de ciprofloxacina.

Equipamento: cromatógrafo líquido marca Shimadzu modelo CLASS VP-10 com detector ultravioleta-visível Modelo SPD-10 AV VP, sistema de bombas LC-10AV VP com injetor manual. O sistema cromatográfico foi monitorado pelo SCL-10 AVP através de Software Class VP-10. Coluna Chromolith RP-18, 100x4,6 mm, Merck®, Potenciômetro: modelo 15-Driver, Banho ultrasônico marca Unique.

Condições cromatográficas: detecção em 275 nm. Fase móvel: ácido fosfórico 0,042 mol/L, pH 3,0 ± 0,1 (ajustado com trietilamina): acetonitrila (87:13), vazão 1,6 mL/min, temperatura ambiente. Diluente: fase móvel, alça de 20 µL.

Preparação das soluções padrão: foram preparadas soluções estoque de cloridrato de ciprofloxacina e de norfloxacina, na concentração de 125,0 e 100,0 µg/mL, respectivamente. A partir destas, 5 diluições foram realizadas para se obter: 25,0; 50,0; 75,0; 100,0 e 125,0 µg/mL de ciprofloxacina e, 20,0; 40,0; 60,0; 80,0 e 100,0 µg/mL de norfloxacina, para construir as respectivas curvas analíticas.

O análogo ciprofloxacina etilenodiamina foi dissolvido no diluente para se obter uma solução de 75,0 µg/mL.

Preparação das amostras: 20 comprimidos de ciprofloxacina e de norfloxacina foram triturados e reduzidos a pó fino. As tomadas de ensaio, tanto para comprimidos, como para o conteúdo das cápsulas, foram equivalentes às doses terapêuticas declaradas, dissolvidas no diluente, sonicadas por 10 minutos e diluídas para concentração final de 75,0 µg/mL. Para a solução de infusão, a tomada de ensaio foi equivalente à dose terapêutica e diluída para concentração final de 75,0 µg/mL.

Foi preparada uma mistura das soluções padrão para se obter uma solução de concentração final contendo 75,0 µg/mL de ciprofloxacina, de norfloxacina e do análogo ciprofloxacina etilenodiamina.

Recuperação do método: a recuperação do método foi realizada de acordo com “Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos de 2003” do Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO)¹⁷.

Foram preparadas 4 réplicas a partir do pó de comprimidos triturados para se obter uma solução de concentração de 25,0 µg/mL, adicionou-se a cada porção

quantidades de ciprofloxacina SQR primária (USP) na proporção de 0%, 50%, 100% e 150% em relação à quantidade inicial de ciprofloxacina no pó do comprimido. Procedimento semelhante foi realizado para os estudos de recuperação do método para a norfloxacina.

Procedimento: as soluções preparadas foram filtradas em filtro 0,45 µm e injetadas em quadruplicata (volume 20 µL).

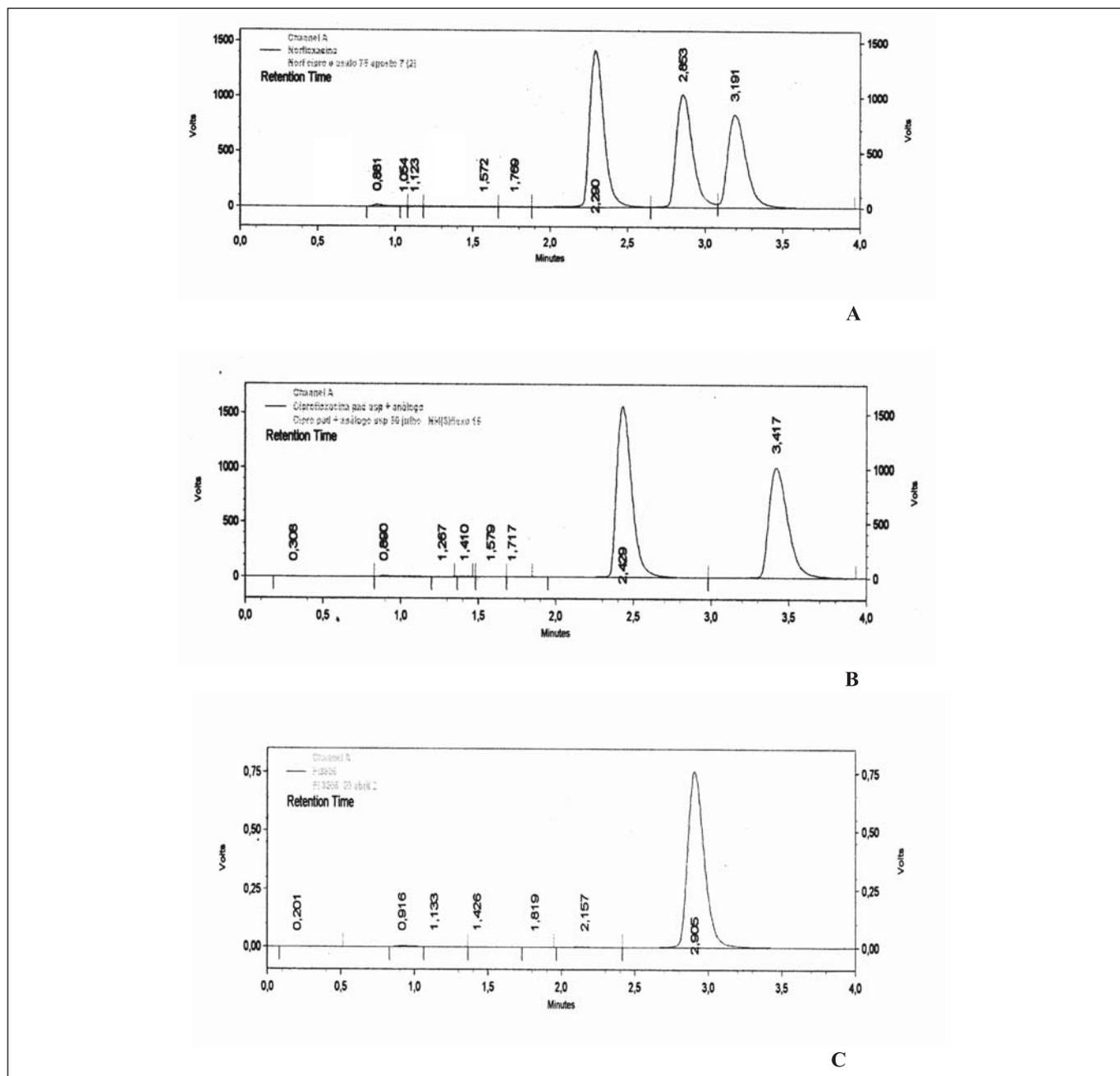


Figura 2. Cromatogramas referentes à separação da mistura das substâncias químicas de referência. (A) análogo ciprofloxacina etilenodiamina, norfloxacina e ciprofloxacina com os tempos de retenção 2,29, 2,85 e 3,19 minutos, respectivamente na concentração de 75,0 µg/mL; (B) análogo ciprofloxacina etilenodiamina e ciprofloxacina com os tempos de retenção 2,42 e 3,41 minutos, respectivamente e (C) norfloxacina e excipientes do comprimido analisado, com tempo de retenção 2,90 minutos (teste de interferência dos excipientes). Coluna Chromolith RP-18 de 100x4,6mm Merck®; fase móvel: ácido fosfórico 0,042 mol/L pH 3,0 ± 0,1 (ajustado com trietilamina); acetonitrila (87:13); vazão 1,6 mL/min e detecção a 275nm.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 2 mostra os cromatogramas referentes à separação da mistura das substâncias químicas de referência primárias: análogo ciprofloxacina etilenodiamina, norfloxacina e ciprofloxacina com os tempos de retenção 2,29, 2,85 e 3,19 minutos, respectivamente na concentração de 75,0 µg/mL (A); a separação do análogo ciprofloxacina etilenodiamina de ciprofloxacina com os tempos de retenção 2,42 e 3,41 minutos, respectivamente (B) e a separação da norfloxacina dos excipientes do comprimido analisado, com tempo de retenção 2,90 minutos (teste de interferência dos excipientes) (C).

Os parâmetros cromatográficos do método para ciprofloxacina e norfloxacina são apresentados na Tabela 1. A resolução do método para ciprofloxacina foi calculada em relação à substância relacionada ciprofloxacina etilenodiamina. A resolução para norfloxacina foi calculada em relação a ciprofloxacina.

Os resultados da calibração do método proposto para ciprofloxacina e norfloxacina encontram-se na Tabela 2.

O teor de quinolonas em amostras comerciais de algumas formas farmacêuticas são apresentadas na Tabela 3.

A verificação da qualidade de produtos industrializados e de manipulação é difícil em virtude da variabilidade das matrizes analíticas, em relação aos variados excipientes utilizados nas diferentes formulações. O Laboratório de Antibióticos do Instituto Adolfo Lutz tem como seu principal cliente, a VISA/ANVISA como órgão fiscalizador. Com este intuito, desenvolveu este trabalho comparando o método proposto ao oficial da Farmacopéia Americana ed. 25¹⁶, aplicado às duas substâncias (ciprofloxacina e norfloxacina), em diferentes formulações farmacêuticas.

O método proposto para a determinação da ciprofloxacina e da norfloxacina, com a alteração da fase móvel na concentração do ácido (0,042 mol/L), e com o uso de coluna com estrutura monolítica de comprimento de 100 mm, fez com que o tempo de retenção fosse reduzido a menos da metade (3,4 min para a ciprofloxacina e 2,6 min para a norfloxacina), quando comparados com os tempos de retenção do método oficial da Farmacopéia Americana ed. 25¹⁶. A resolução e o número de pratos que medem a eficiência do método, são diretamente proporcionais ao comprimento da coluna, e relacionados com tipo e o número de partículas do empacotamento. Quanto maior o comprimento da coluna, maior será o número de pratos, assim como a resolução e o tempo de retenção. O método proposto apresenta valores menores do que os obtidos pelo método oficial para a resolução e o número de pratos, justificados pelo comprimento da coluna. O fator de alargamento, a precisão do método medida pelo desvio padrão relativo do método, e a exatidão avaliada pela recuperação do método, para a ciprofloxacina e norfloxacina são compatíveis com os parâmetros cromatográficos estabelecidos para os métodos oficiais para a determinação de ciprofloxacina e de norfloxacina, segundo a Farmacopéia Americana ed. 25¹⁶.

Tabela 1. Parâmetros cromatográficos do método proposto para ciprofloxacina e norfloxacina, nas seguintes condições cromatográficas: fase móvel: ácido fosfórico 0,042 mol/L, pH 3,0 + 0,1 (ajustado com trietilamina): acetonitrila (87:13), coluna Chromolith RP18 100 x 4,5 mm Merck®, vazão 1,6 mL/min, detecção em 270 nm, temperatura ambiente.

Parâmetros	Ciprofloxacina	Norfloxacina
Número de pratos (N)	961	675
Tempo de retenção relativo	0,6925	0,6923
Resolução	1,1	0,82
Fator de alargamento	1,5	1,45
k	15,79	1,92
Tempo de retenção	3,4	2,6

Tabela 2. Resultados da calibração do método isocrático proposto para ciprofloxacina e norfloxacina nas seguintes condições cromatográficas: fase móvel: ácido fosfórico 0,042 mol/L, pH 3,0 + 0,1 (ajustado com trietilamina): acetonitrila (87:13), coluna Chromolith RP18 100 x 4,5 mm Merck®, vazão 1,6 mL/min, detecção em 270 nm, temperatura ambiente.

Resultados	Ciprofloxacina	Norfloxacina
Faixa de trabalho (µg/mL)	25,0 – 125,0	20,0 – 100,0
Número de pontos da calibração	5	5
Inclinação (a) da reta	1,1578 e ⁻⁰⁰⁵	1,04261 e ⁻⁰⁰⁵
Intersecção da reta (b)	0,40343	0,199444
Coefficiente de correlação	0,9999	0,9999
Desvio padrão relativo do método (%)	0,5746	0,4711
Teste de recuperação	98,0% a 100,0%	98,0% a 100,0%

Tabela 3. Teor de quinolonas em formulações farmacêuticas comerciais, determinados pelo método proposto, nas seguintes condições cromatográficas: fase móvel: ácido fosfórico 0,042 mol/L, pH 3,0 + 0,1 (ajustado com trietilamina): acetonitrila (87:13), coluna Chromolith RP18 100 x 4,5 mm Merck®, vazão 1,6 mL/min, detecção em 270 nm, temperatura ambiente.

Formulação farmacêutica	Teor declarado mg/pm	Teor encontrado mg/pm
Ciprofloxacina		
Comprimidos	500,0	494,4
Cápsulas	250,0	203,2
Solução para infusão	2,0 mg/mL	2,0 mg/mL
Norfloxacina		
Comprimidos	400,0	395,5
Cápsulas	400,0	410,0

pm: peso médio; mg: miligrama; ml: mililitros

Outra vantagem do método proposto para a norfloxacin em relação ao método oficial é a temperatura de trabalho. O método adaptado utiliza temperatura ambiente, enquanto o método oficial (Farmacopéia Americana¹⁶) preconiza temperatura de 40°C com o pré-condicionamento da coluna por 8 horas, fatores estes que limitam a utilização deste método em laboratórios oficiais.

O método proposto é prático, rápido, preciso, reprodutível e econômico. Com o mesmo sistema cromatográfico, podem-se determinar e quantificar a norfloxacin, a ciprofloxacina e o análogo de ciprofloxacina etilenodiamina (substância relacionada) em diversas formulações farmacêuticas, possibilitando assim seu emprego como alternativa ao método oficial, e aceitável para rotina em laboratório de controle de qualidade de medicamentos.

AGRADECIMENTOS

Ao Técnico de Apoio à Pesquisa Sr. Paulo Sergio Cardoso de Souza, pelo profissionalismo e valiosa colaboração na execução deste trabalho.

REFERÊNCIAS

1. Martindale. The Extra Pharmacopoeia. 31.ed. London: The Royal Pharmaceutical Society of Great Britain. 1996, p.207-10.
2. Bilgic Z, Tosunoglu S, Buyktimkin N. Two New Spectrophotometric Methods for Ciprofloxacin. *Acta Pharm* 1991; 33:19-23.
3. Gupta R, Singhai AK, Agrawal RK. Derivative UV spectrophotometric determination of norfloxacin and tinidazole combination in tablets. *Indian Drugs* 2000; 37:348-9.
4. Fratini L, Schapoval EES. Ciprofloxacin determination by visible light spectrophotometry using iron (III) nitrate. *Int J Pharm* 1996; 127:279-82.
5. Tosunoglu S, Savci N. Two spectrophotometric determination methods of ciprofloxacin with bromocresol purple and bromphenol blue in tablets. *Acta Pharm Tur* 1993; 35(Suppl 1):1-5.
6. Amin AS. Quantification of some recently introduced antibacterial drugs using Sudan III as chromogenic reagent. *Mikrochim Acta* 2000; 134 (1 Suppl 2):89-94.
7. El-Walily AFM, Razak A, Belal SF, Bakry RS. Determination of norfloxacin spectrophotometrically using 2,4-dinitrofluorobenzene. *J Pharm Biomed Anal* 1999; 21 (Suppl 5):1069-76.
8. Lal S, Mathur SC, Murugesan N, Rathore YK, Sethi PD. Spectrofluorometric determination of ciprofloxacin in pharmaceutical formulations. *East Pharm* 1990; 33:147-8.
9. Kilic E, Koseoglu F, Kenar A, Akay MA. Conductometric titrimetry for assay of select antibiotics in non-aqueous media. *J Pharm Biomed Anal* 1995; 13:1453-8.
10. Altria KD, Chanter YL. Validation of a capillary electrophoresis method for the determination of a quinolone antibiotic and its related impurities. *J Chromatogr A* 1993; 652 (Suppl 2):459-63.
11. Fierens C, Hillaert S, Van-Den Bossche W. The qualitative and quantitative determination of quinolones of first and second generation by capillary electrophoresis. *J Pharm Biomed Anal* 2000; 22 (Suppl 5):763-72.
12. Liang P, Qin YC, Jiang ZC, Xiong CM. Separation and determination of four fluoroquinolone antibiotics by reversed phase HPLC. *Fenxi Shiyanshi* 2000; 19 (Suppl 3):56-9.
13. Naora K, Katagiri Y, Ichikawa N, Hayashibara M, Iwamoto K. Simultaneous high-performance liquid-chromatographic determination of ciprofloxacin, fenbufen and felbinac in rat plasma. *J Chromatogr Biomed Appl* 1990; 530:186-91.
14. Sane RT, Patel DV, Dhupal SN, Nerurkar VR, Mainkar PS, Gangal DP. High performance liquid chromatographic determination of ciprofloxacin from pharmaceutical preparations. *Indian drugs* 1990; 27 (Suppl 4):248-50.
15. Thoppil SO, Amin PD. Stability indicating reversed-phase liquid chromatographic determination of ciprofloxacin as bulk drug and in pharmaceutical formulations. *J Pharm Biomed Anal* 2000; 22 (Suppl 4):699-703.
16. The United States Pharmacopeia 25.ed. Rockville: United States Pharmacopeial Conventions, 2002, 2675p.
17. Inmetro (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos. DOQ-CGCRE-008, Revisão: 00, 2002, 31p.

Alterações clínicas e laboratoriais relacionadas à exposição ambiental aos praguicidas organoclorados em moradores de aterro à céu aberto, Cubatão, S.P.*

Clinical and laboratorial adverse effects from exposition to organochlorine pesticides in inhabitants of dump site in Cubatão, S.P.*

RIALA6/1019

Eladio SANTOS FILHO^{1*}; Rebeca S. SILVA²; Vera R.R. LEMES³; Heloisa H.C.BARRETTO³; Odete N.K. INOMATA³; Tereza A. KUSSUMI³; Sônia O.B. ROCHA³

* Endereço para correspondência: ¹Av. Washington Luis, 522 apto. 102, Gonzaga, CEP 11055-000, Santos, SP, Brasil, e-mail: elladiosto@aol.com.br.

¹ Secretaria de Estado da Saúde, Hospital Guilherme Álvaro - Centro de Controle de Intoxicações.

² Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina.

³ Divisão de Bromatologia e Química do Instituto Adolfo Lutz.

Recebido: 07/06/2004 – Aceito para publicação: 30/06/2005.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi descrever os possíveis efeitos e alterações clínicas e laboratoriais que pudessem ser atribuídos à exposição aos praguicidas organoclorados de moradores de um aterro a céu aberto em Pilões, município de Cubatão, São Paulo. Trata-se de um estudo de observação, de aferição simultânea e controlada, com população de estudo de 238 moradores de Pilões e de controle de 258 da Cota 200. Foram analisados alimentos de produtores locais e realizados exames básicos de rotina, específicos, de apoio diagnóstico, avaliação clínica e utilizados dados de praguicidas organoclorados em soro sanguíneo. O hexaclorobenzeno foi o principal organoclorado encontrado nos alimentos em níveis que variaram de 0,3 a 6120 µg/kg. Encontrou-se associação positiva entre residir em Pilões e apresentar resíduos de praguicidas organoclorados em soro sanguíneo, com concentrações médias de 115, 7, 20 e 4 vezes maiores de HCB, pp' DDE, β e γ HCH, respectivamente, em comparação com o grupo controle. Observou-se, na população de Pilões, diferença estatisticamente significativa entre os teores médios sanguíneos mais elevados de HCB e apresentar leucopenia, DDT total e HCH total e alteração ao exame clínico, de DDT total e doenças do aparelho circulatório e de HCH total e doenças de pele. Os dados demonstraram o risco que pode ser atribuído à exposição aos praguicidas organoclorados e, conseqüentemente, a população de Pilões foi transferida para outro local de residência.

Palavras-chave. praguicidas organoclorados, risco ambiental, aterro à céu aberto, saúde pública, alimentos, efeitos clínicos e laboratoriais.

ABSTRACT

The purpose of this study was to describe the possible clinical and laboratorial alterations as well as its conceivable effects that could be attributed to organochlorine pesticides exposure in people living in open dumps sites in Pilões - Cubatão District, São Paulo State. This is an observatory study performed in the population of 238 inhabitants of Pilões, and in comparison to a control population of 258 people living in Cota 200. Foods from local growers were analyzed. Routine basic and specific laboratory exams and clinical evaluation were performed for diagnosis purpose, and organochlorine pesticides detection

* Trabalho baseado na Tese de Doutorado do autor: "Determinação do grau de exposição interna aos praguicidas organoclorados, em população residente sobre aterro a céu aberto na localidade de Pilões, Cubatão-S.P.", apresentada ao Departamento. de Epidemiologia da Faculdade de Saúde Pública da USP, 1998.

in blood serum samples were carried out. Hexachlorobenzene was the main organochlorinated substance found in foods at levels varying from 0.3 to 6120 µg/kg. Positive association was found between living in Pilões and the occurrence of organochlorine pesticides residues in blood serum. Hexachlorobenzene medium concentrations in blood serum were 115, 7, 20, and 4 times higher than HCB, pp' DDE, β and γ HCH, respectively, when compared to control group. The people living in Pilões showed statistically significant association between blood medium contents of high HCB levels and leucopeny ; between DDT and total HCH rates and altered clinical exams; between total DDT level and occurrence of circulatory system diseases; and between of total HCH level and presence of skin diseases. The data observed in the present study indicated the risk in getting diverse diseases on account of the exposure to organochlorinated pesticides. Owing to the poor health environments the Pilões population was transferred to live in another place.

Key words. organochlorine pesticides, environmental risk, dump sites, public health, food, clinical and laboratorial adverse effects.

INTRODUÇÃO

O município de Cubatão localiza-se no litoral sul do Estado de São Paulo em região denominada Baixada Santista, distante 57 Km da capital do estado. Devido sua localização estratégica, decidiu-se, na década de 50, pela instalação de um parque industrial, encabeçada pela construção de uma refinaria de petróleo, seguida da criação de um polo petroquímico de grande envergadura. O município chegou a possuir 26 indústrias de transformação, dentre elas: siderurgia, petroquímica, fertilizantes, cimento e refino de petróleo.

No entanto, as causas que conferiram fama internacional à Cubatão estiveram menos ligadas a sua importância como centro industrial do que aos problemas de poluição e degradação ambiental. O Departamento de Águas e Energia Elétrica de São Paulo e a Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental¹ relacionaram, nos anos 80, a existência de 320 fontes primárias de poluição industrial e identificaram 13 indústrias que apresentavam deposição final inadequada de resíduos sólidos, com geração de cerca de 26 mil ton/ano².

Até o ano de 1983 a Prefeitura de Cubatão destinava o lixo urbano do município a um aterro a céu aberto na localidade de Pilões, verificando-se, mais tarde, que algumas indústrias utilizaram aquela área para a destinação de até mil ton/ano de resíduos industriais².

Estudos efetuados pela CETESB¹ revelaram a contaminação de solo, água e sedimentos da região de Pilões por poluentes orgânicos persistentes (POP): hexaclorobenzeno, pentaclorofenol e diclorodifeniltricloroetano (DDT). Esta descoberta originou grande preocupação nas autoridades sanitárias e ambientais da Baixada Santista, pois Pilões é uma região de mananciais, situada no vale do rio Cubatão, em área estreita entre as encostas da Serra do Mar e a margem direita do rio, sendo considerada área de preservação ambiental.

O aterro a céu aberto de Pilões, assim como a maioria dos "lixões", permitia o acesso de inúmeras famílias que sobreviviam da cata de produtos recicláveis, situação que persistiu até 1983 quando a CETESB implantou o Programa de Metas de Redução

de Poluentes e desativou o aterro a céu aberto de Pilões. Entretanto as pessoas que ali sobreviviam e trabalhavam, permaneceram residindo no local.

Diante desses fatos, o autor realizou estudo de Tese de Doutorado da Faculdade de Saúde Pública da USP³ que objetivou estimar o grau de exposição interna da população de Pilões aos praguicidas organoclorados e seus possíveis efeitos, com a colaboração dos pesquisadores do Instituto Adolfo Lutz que realizaram as análises para determinação de praguicidas organoclorados em soro sanguíneo e em alimentos.

Em uma primeira publicação, Santos Filho et al⁴ determinaram o grau de exposição interna aos praguicidas organoclorados dos moradores de Pilões e da Cota 200 (população de controle). Observou-se em 95,5% da população de Pilões a presença de praguicidas organoclorados no sangue, sendo que o risco relativo de residir em Pilões e apresentar hexaclorobenzeno (HCB) no sangue foi 115 vezes maior, quando comparado à população de controle, o de apresentar Hexaclorociclohexano (HCH) foi 20 vezes maior e de apresentar diclorodifeniltricloroetano (DDT) foi 7 vezes maior. Desse modo, ficou demonstrada a exposição interna aos praguicidas organoclorados persistentes que foi submetida à população de Pilões.

A via digestiva é a principal via de exposição ambiental aos praguicidas organoclorados persistentes⁵, e por isso, um dos objetivos foi identificar e analisar os principais alimentos produzidos nas pequenas culturas de subsistência de Pilões em relação a esses compostos (exposição externa) e apresentar e discutir os possíveis efeitos da exposição interna e externa na população de Pilões.

MÉTODOS

Para estabelecer uma possível relação entre a exposição interna a praguicidas organoclorados, e possíveis efeitos clínicos e/ou laboratoriais (indicadores biológicos de exposição interna), foi realizado um estudo de observação, de aferição simultânea (não direcional) e controlado.

A população de estudo foi constituída por 238 pessoas que concordaram em participar na pesquisa, representando 94,4% do total da população residente em Pilões. O bairro da Cota 200 do município de Cubatão, localizado nas encostas da Serra do Mar, foi escolhido para constituir o grupo controle por apresentar características semelhantes às da localidade de Pilões, conforme descrito por Santos Filho et al.³, excetuando-se a existência de poluentes químicos industriais. A população de controle foi eleita por pareamento segundo as características de idade, sexo, renda e tempo de moradia, constituindo-se ao final de 258 pessoas. Os critérios adotados para inclusão no grupo controle foram de indivíduos com renda de até três salários mínimos, pareados por número de salários, sexo, faixa etária (em intervalos de 5 anos) e tempo de residência (em anos) iguais ao seu par da população de estudo. Não foram incluídas no grupo controle as pessoas que referiram residência anterior em Pilões.

Os praguicidas organoclorados pesquisados em amostras sanguíneas e de alimentos foram: hexaclorobenzeno (HCB); diclorodifeniltricloroetano (os isômeros: o-p' DDT e p-p' DDT; os metabólitos: p-p' DDE; p-p' DDD); hexaclorociclohexano (os isômeros α HCH; β HCH; γ HCH); aldrin; dieldrin; endrin; heptacloro; heptacloro-epóxido e dodecacloro. O método empregado nas determinações dos praguicidas organoclorados em soro sanguíneo foi o descrito por Thompson⁶. O limite de quantificação em amostras de soro sanguíneo foi de 0,2 $\mu\text{g/L}$ para o HCB, α HCH, γ HCH e heptacloro; 0,4 $\mu\text{g/L}$ para o β HCH, dieldrin, endrin, heptacloro-epóxido, p-p' DDE e p-p' DDD e 0,8 $\mu\text{g/L}$ para o-p' DDT, p-p' DDT e dodecacloro. Santos Filho et al.⁴ estudaram as concentrações médias de praguicidas organoclorados no soro sanguíneo nas duas populações.

Foram analisados os alimentos: batata doce, cara, chuchu, inhame, mandioca, banana e frango, coletados de cada produtor em Pilões. O método utilizado para as determinações de praguicidas organoclorados nos alimentos foi o de Steiwandter⁷. O limite de quantificação em amostras de alimentos vegetais foi de 0,2 $\mu\text{g/Kg}$ para o HCB, α HCH, γ HCH e heptacloro; 0,4 $\mu\text{g/Kg}$ para o β HCH, dieldrin, endrin, heptacloro-epóxido, p-p' DDE e p-p' DDD e 0,8 $\mu\text{g/Kg}$ para o-p' DDT, p-p' DDT e dodecacloro. O limite de quantificação em amostras de gordura de frango foi de 10 $\mu\text{g/Kg}$ para o HCB, α HCH, γ HCH e heptacloro; 20 $\mu\text{g/Kg}$ para o β HCH, dieldrin, endrin, heptacloro-epóxido, p-p' DDE e p-p' DDD e 30 $\mu\text{g/Kg}$ para o-p' DDT, p-p' DDT e dodecacloro.

Para análises de alimentos, utilizou-se cromatógrafo com as seguintes especificações: cromatógrafo a gás HP 5890 com detector de captura de elétrons, fonte de Níquel (⁶³Ni), equipado com coluna de metil silicone HP1 (30m x 0,53mm x 2,65 μm), nas seguintes condições: temperatura da coluna de 200 °C, temperatura do injetor de 220 °C e temperatura do detector de 260 °C.

A população de Pilões foi atendida no ambulatório da Coordenadoria de Vigilância à Saúde da Prefeitura Municipal de Cubatão e a população de controle da Cota 200 em consultório medido na escola do bairro, EEPG Prof^a Maria Helena Duarte

Caetano. Na população de estudo a coleta do material para exames foi realizada no posto de coleta da Coordenadoria de Vigilância à Saúde e a população de controle foi encaminhada ao Laboratório do Município de Cubatão. Foi utilizado material a vácuo descartável empregando-se a técnica recomendada por Siqueira⁸.

Foram realizados exames básicos de rotina, não específicos, como hemograma completo, urina tipo 1, glicemia de jejum e parasitológico de fezes, para uma avaliação geral da saúde e outros, mais específicos, como as provas de função hepática (dosagens séricas de bilirrubina direta e indireta, alanino-aminotransferase - ALT, aspartato-aminotransferase - AST e gama-glutamiltanspeptidase - GGT) e as provas de função renal (dosagens de uréia e creatinina plasmáticas) no Laboratório de Análises Clínicas da Prefeitura de Cubatão. Para os limites de normalidade, escolhemos os estabelecidos por Miller; Gonçalves⁹.

A todos os integrantes das duas populações foi solicitado à mesma bateria básica de exames, sem prejuízo de outros exames, a critério médico. A seguir, listamos os exames extras de apoio diagnóstico, com o número de solicitações nas duas populações estudadas:

- a) Eletrocardiografia: 35
- b) Radiografia simples: 16
- c) Urocultura: 16
- d) Ultrassonografia: 15
- e) Mamografia: 3
- f) Eletroencefalografia: 2
- g) Reação sorológica para Lues: 2
- h) Biópsia de pele: 2
- i) Provas de função reumática: 2
- j) Audiometria: 2
- k) Ecocardiografia: 1
- l) Teste sorológico HIV: 1
- m) Baciloscopia escarro: 1

Para análise estatística empregou-se o "software" Epiinfo 6, programa de domínio público, para a realização das análises estatísticas. Análise bivariada foi usada para verificar as diferenças entre os grupos estudados, através do método de Pearson do χ^2 . Testes estatísticos paramétricos tipo ANOVA para avaliar diferenças de médias entre os grupos e sub grupos. Foi estabelecido o nível de significância $\alpha = 0,05$. Os valores abaixo do limite de detecção foram incluídos nos cálculos, assumindo o valor zero, a semelhança dos estudos populacionais de Stehr-Green¹⁰.

RESULTADOS

O HCB foi encontrado em 10 (77%) das amostras de alimentos vegetais e o DDT_{total} em uma amostra de batata doce. Em todas amostras de gordura de frango pesquisadas observou-

se a presença de HCH, HCH total, DDT total, além de ter sido encontrado dieldrin em uma delas.

A Tabela 1 apresenta a média, o desvio padrão (dp) e a variação dos praguicidas organoclorados pesquisados nos alimentos.

Na gordura de frango foi encontrado: HCB de 70 a 6120 µg/Kg; β HCH de 50 a 60 µg/Kg; γ HCH de 10 a 1300 µg/Kg; p-p'DDE de 120 a 270 µg/Kg; p-p'DDD em concentrações de até 80 µg/Kg; p-p'DDT de 100 a 210 µg/Kg e dieldrin com até 120 µg/Kg e na batata doce 0,6 µg/Kg de p-p' DDE.

As concentrações médias de praguicidas organoclorados no soro sanguíneo, encontradas nas duas populações, foram descritas por Santos Filho et al.⁴. Encontrou-se no soro sanguíneo da população residente em Pilões: HCB 4,66 ± 16,54 µg/L; DDT total 3,71 ± 7,28 µg/L e HCH total 0,84 ± 1,20 µg/L. Na população de controle os teores no soro sanguíneo foram: HCB 0,03 ± 0,15 µg/L; DDT total 1,85 ± 4,90 µg/L e HCH total 0,13 ± 0,70 µg/L. Encontrou-se associação positiva entre residir em Pilões e apresentar resíduos sanguíneos de praguicidas organoclorados em soro sanguíneo, com concentrações médias 115, 7, 20 e 4 vezes maiores de HCB, pp'DDE, β HCH e γ HCH, respectivamente, em comparação com o grupo controle. O tempo de residência, equivalente ao tempo de exposição, não foi responsável pela associação encontrada, considerando-se que o tempo mediano de residência em Pilões foi de 4,2 anos e na Cota 200 foi de 6,3 anos (p<0,01).

Dos 238 integrantes da população de estudo, 141 (59,2%), apresentaram diagnóstico positivo para alguma patologia contra 150 (58,1%), dentre os 258 integrantes da

população de controle, não apresentando diferença estatística entre essas proporções.

A classificação das patologias diagnosticadas nas duas populações, por ordem de frequência, foi: 1ª Doenças da pele e do tecido celular subcutâneo; 2ª Doenças do aparelho respiratório; 3ª Doenças do aparelho circulatório; 4ª Doenças do aparelho digestivo; 5ª Doenças do sistema osteomuscular e do tecido conjuntivo em Pilões e 1ª Doenças do aparelho respiratório; 2ª Doenças do aparelho circulatório; 3ª Doenças do sistema osteomuscular e do tecido conjuntivo; 4ª Doenças do sistema nervoso e dos órgãos dos sentidos; 5ª Doenças do aparelho digestivo na Cota 200.

A principal diferença em Pilões ficou por conta das doenças de pele, com maior número de piодermites (infecções bacterianas da pele). A Tabela 2, mostra a distribuição dos diagnósticos das doenças de pele nos grupos estudados.

Na Tabela 3, são mostrados os valores encontrados nas provas de função hepática. É necessário alertar que os testes de função hepática, como indicadores precoces de doença hepática, apresentam problemas de sensibilidade e especificidade, de modo que, a alteração isolada de uma ou outra enzima não significa, necessariamente, doença hepática. Portanto, não devemos nos basear nos resultados de apenas um teste enzimático, mas num conjunto de exames clínicos e laboratoriais, que aumentam sobremaneira o acerto diagnóstico. Dessa forma, os resultados da Tabela 3, se prestam para dar uma visão epidemiológica.

Deve-se considerar, que o número expressivo de perdas no grupo controle (em torno de 20%) pode ter interferido na

Tabela 1. Níveis de praguicidas organoclorados em alimentos vegetais cultivados e em gordura de frangos criados no Bairro de Pilões.

Alimentos	HCB Média (dp) Variação (µg/kg)	HCH _{total} Média (dp) Variação (µg/kg)	Dieldrin Média (dp) Variação (µg/kg)	DDT _{total} Média (dp) Variação (µg/kg)
Banana (n=2)	4,1 (5,0) 0,6 - 7,7	nd	nd	nd
Batata doce (n=1)	2,2	nd	nd	0,6
Cará(n=1)	0,5	nd	nd	nd
Chuchu(n=2)	435,4 (609,8) 4,2 - 866,6	nd	nd	nd
Inhame(n=1)	1,5	nd	nd	nd
Mandioca(n=5)	1,8 (3,7) 0,3 - 9,3	nd	nd	nd
Frango (gordura) (n=3)	2390 (3262) 70 - 6120	520 (719) 70 - 1350	40 (69,2) nd - 120	420 (124) 320 - 560

dp: desvio padrão

nd: não detectamos (significa que se estiverem presentes os resultados estarão abaixo do limite de quantificação do método).

n = número de amostras.

análise estatística das bilirrubinas assim como a quantificação da GGT nos dois grupos.

Os resultados dos exames hematológicos são apresentados na Tabela 4. Para o diagnóstico de anemia, usamos critérios clínicos e laboratoriais e classificamos como anêmicas 38 pessoas de Pilões (16,5%) e 29 pessoas da Cota 200 (12,5%). Não foi observada relação estatística entre ser portador de anemia e pertencer a um dos grupos estudados. Todos os casos foram classificados como anemia ferropriva.

Dentre as alterações hematológicas relacionadas à exposição aos POPs (Praguicidas Organoclorados Persistentes), descreve-se as modificações quantitativas dos glóbulos brancos (leucócitos). O estudo da leucometria nas duas populações revelou relação positiva entre residir em Pilões e apresentar elevação do número dos leucócitos no

sangue (leucocitose). Foram detectadas 66 pessoas (28,6%) em Pilões 35 (15,0%) pessoas na Cota 200 com leucócitos acima de 9.000 mm^3 .

Em Pilões, a maioria das pessoas que apresentaram leucocitose, o fizeram as custas do aumento de linfócitos, sendo que na Cota 200 a leucocitose se acompanhou, mais amiúde, de neutrofilia.

A leucopenia foi observada em 41 pessoas, sendo 18 em Pilões e 23 na Cota 200, sendo que 8 casos com leucopenia mais severa (menos de $4.000 \text{ leucócitos por mm}^3$), 5 casos em Pilões e 3 casos na Cota 200. Não foi observada diferença na contagem dos demais elementos sanguíneos (neutrófilos e eosinófilos) entre os grupos estudados.

Os POPs têm ação nefrotóxica e, por isso, se procurou investigar os possíveis efeitos renais na população de Pilões,

Tabela 2. Diagnósticos do Grupo das Doenças de Pele.

DIAGNÓSTICOS	PILÕES (população de estudo)		COTA 200 (população de controle)	
	N	%	N	%
CISTOSEBÁCEO	1	1,7	0	0
ECZEMA	7	11,9	2	5,4
ESCABIOSE	2	3,4	3	8,1
HORDÉOLO	1	1,7	1	2,7
IMPETIGO	16	27,1	8	21,6
MICOSES SUPERFICIAIS	3	5,1	2	5,4
MOLUSCO CONTAGIOSO	0	0	1	2,7
PANARÍCIO	2	3,4	0	0
PSORÍASE	1	1,7	0	0
PTIRÍASE ALBA	26	44,1	20	54,1
TOTAL	59	100	37	100

Tabela 3. Teores das enzimas hepáticas em moradores de Pilões (população de estudo) e da Cota200 (população de controle).

ENZIMAS	LOCAL	N	% Perdas	Menor Teor	Maior Teor	% Teores elevados*	Teores Médios+ DP
AST	Pilões	216	9,2	2,0	162,0	3,2	$12,10 \pm 16,02$
	Cota 200	219	15,1	0,3	270,0	3,2	$18,84 \pm 20,15$
ALT	Pilões	216	9,2	0,6	212,0	3,2	$11,04 \pm 17,09$
	Cota 200	219	15,1	0,3	250,0	6,4	$18,79 \pm 21,28$
BD	Pilões	218	8,4	0,09	0,8	23,4	$0,26 \pm 0,14$
	Cota 200	206	20,2	0,3	0,9	47,1	$0,35 \pm 0,07$
BI	Pilões	218	8,4	0,08	1,2	1,4	$0,32 \pm 0,16$
	Cota 200	206	20,2	0,3	0,9	0,5	$0,47 \pm 0,11$
GGT	Pilões	112	52,9	4,0	928,0	11,6	$39,9 \pm 82,9$
	Cota 200	208	19,4	5,0	207,0	32,2	$25,7 \pm 25,6$

* % dos resultados acima dos limites de normalidade de cada enzima

AST -Aspartato-aminotransferase; ALT -Alanino-aminotransferase; BD -Bilirrubina Direta; BI -Bilirrubina Indireta; GGT -Gama-glutamyltranspeptidase.

através da realização de dois testes: a dosagem de uréia e da creatinina plasmáticas, que se constituem em dois dos recursos mais utilizados para uma avaliação geral das funções renais (Tabela 5). Foram encontradas 4 pessoas em Pilões e 7 na Cota 200 com níveis de uréia plasmática acima do limite crítico empregado (40mg/dl). A dosagem de creatinina ficou prejudicada devido ao grande número de perdas em Pilões, no entanto, nas amostras realizadas, não foi encontrado nenhum caso com teores acima do limite crítico de 2mg/dL.

Na Tabela 5 são apresentadas as dosagens de uréia e creatinina plasmáticas, como teste das funções renais. Não foi observada relação entre apresentar teores elevados de uréia e pertencer a um dos grupos estudados ($p = 0,51$).

Não foram observadas alterações na densidade urinária e/ou presença de elementos anormais, que indicasse situação de disfunção renal em qualquer dos grupos estudados, apresentando coerência com os demais achados clínicos e laboratoriais.

Foram comparadas, na Tabela 6, as concentrações médias de POPs no sangue (exposição interna aos POPs) e alguns indicadores clínicos e laboratoriais (efeitos dos POPs).

Para alguns desses indicadores de efeito, detectou-se diferença estatística entre os teores médios sanguíneos de POPs. As pessoas que apresentavam esses indicadores de efeito tinham também níveis médios sanguíneos mais elevados de determinados POPs.

Encontrou-se, na população de Pilões, diferença estatisticamente significativa entre os teores médios sanguíneos mais elevados de HCB e apresentar leucopenia, de DDT total e

HCH total e apresentar alteração ao exame clínico, de DDT total e apresentar doenças do aparelho circulatório e de HCH total e apresentar doenças de pele (Tabela 6).

Encontrou-se, na população da Cota 200, diferença estatisticamente significativa entre os teores médios sanguíneos mais elevados de HCB e apresentar linfopenia, de DDT total e apresentar ALT elevada.

Não foram observadas diferenças significativas entre os quadros de morbidade dos grupos estudados, que pudessem ser atribuídas à exposição aos POPs.

DISCUSSÃO

O HCB foi encontrado em todos os alimentos pesquisados, caracterizando-se como o principal poluente em Pilões, conforme Tabela 1. Resultado que difere do encontrado por Lara et al¹¹ que realizaram pesquisa em alimentos da região da grande São Paulo e o HCH foi o praguicida mais difundido. Waliszewski¹² no México, também encontrou o HCH como o principal contaminante de leite e derivados

Os teores mais altos de HCB foram encontrados no chuchu e na gordura de frango. As aves domésticas não só apresentaram os teores mais elevados, mas também o maior número de praguicidas, com resíduos de HCB, HCH, DDT e dieldrin. O chuchu apresentou maiores teores de HCB por ser produzido rasteiro, conseqüentemente em contato direto com os contaminantes do aterro.

Tabela 4. Descrição dos exames hematológicos de moradores de Pilões (população de estudo) e da Cota 200 (população de controle).

Elementos do sangue	Local	N	% Perdas	Média + DP	Valor Mínimo	Valor Máximo
Hemoglobina	Pilões	231	2,9	12,9 ± 1,7	8,6	17,2
	Cota200	233	9,7	13,1 ± 1,6	7,6	16,6
Leucócito	Pilões	231	2,9	8285 ± 3433	3200	30100
	Cota200	233	9,7	7053 ± 1951	2900	13000
Neutrófilo	Pilões	231	2,9	3640 ± 1565	804	8976
	Cota200	233	9,7	3804 ± 1542	899	9344
Linfócito	Pilões	231	2,9	3347 ± 1910	820	13724
	Cota200	233	9,7	2643 ± 950	1242	7150
Eosinófilo	Pilões	231	2,9	1078 ± 1522	0	16254
	Cota200	233	9,7	446 ± 419	42	3955

Tabela 5. Resultados de uréia e creatinina plasmáticas na população de Pilões (estudo) e da Cota200 (controle).

EXAME	LOCAL	N	% Perdas	Média + DP	Valor mínimo	Valor máximo
Uréia	Pilões	222	6,7	21,6 ± 7,7	10,0	55,0
	Cota200	215	16,7	24,4 ± 7,5	10,0	49,0
Creatinina	Pilões	145	39,1	0,86 ± 0,20	0,4	1,4
	Cota200	215	16,7	0,54 ± 0,14	0,3	1,4

Tabela 6. Concentrações médias* de praguicidas organoclorados persistentes entre portadores e não portadores de possíveis efeitos da exposição a esses compostos da população de Pilões (estudo) e da Cota 200 (controle).

EFEITO	PILÕES			COTA200		
	HCB	DDT total	HCH total	HCB	DDT total	HCH total
Anemia	1,74	3,51	0,88	0	4,63	0,17
não anemia	5,05	3,30	0,80	0,03	1,41	0,12
leucopenia	5,79 ^a	3,64	0,66	0	1,79	0,14
não leucopenia	4,61	3,29	0,82	0,04	1,66	0,12
leucocitose	4,59	3,88	0,74	0,05	1,22	0,16
não leucocitose	4,76	3,09	0,83	0,03	1,76	0,12
neutropenia	4,71	3,44	0,84	0,02	1,98	0,06
não neutropenia	4,71	3,52	0,77	0,04	1,50	0,16
linfopenia	1,50	5,18	1,58	1,10 ^b	8,30	0
não linfopenia	4,77	3,45	0,79	0,03	1,65	0,12
linfocitose	3,52	3,37	0,89	0,05	2,74	0,10
não linfocitose	5,19	3,35	0,77	0,03	1,43	0,13
AST elevada	1,11	3,77	1,41	0,16	3,23	0
AST normal	5,13	3,50	0,82	0,03	1,60	0,13
ALT elevada	0,81	2,06	1,00	0,09	4,00 ^c	0,21
ALT normal	5,12	3,54	0,83	0,03	1,49	0,12
BD elevada	1,79	3,05	1,03	0,03	1,96	0,20
BD normal	5,74	3,34 ^d	0,71	0,03	1,31	0,08
BI elevada	10,43	4,97	0,27	0	2,00	0
BI normal	4,70	3,24	0,79	0,03	1,61	0,14
exame médico alterado	4,61	4,61 ^e	1,03 ^f	0,04	1,88	0,12
exame médico normal	4,75	2,24	0,52	0,02	1,81	0,14
apresentar doenças cap.IV - CID	4,28	9,30	0,03	0	2,86	0
não apresentar essas doenças	4,68	3,40	0,15	0,03	1,83	0,13
apresentar doenças cap. VI - CID	5,55	2,75	0,53	0,02	1,98	0,34
não apresentar essas doenças	4,62	3,76	0,85	0,03	1,84	0,11
apresentar doenças cap. VII -CID	4,91	6,71 ^g	1,48	0,03	1,74	0,03
não apresentar essas doenças	4,64	3,50	0,79	0	1,87	0,14
apresentar doenças cap. VIII -CID	1,80	9,34	2,21	0,08	2,88	0,38
não apresentar essas doenças	4,77	3,50	0,79	0,02	1,68	0,09
apresentar doenças cap. IX - CID	8,75	18,08	1,67	0	1,50	0,65
não apresentar essas doenças	4,59	3,45	0,82	0,03	1,87	0,11
apresentar doenças cap.X - CID	1,70	2,30	1,00	0	0,77	0
não apresentar essas doenças	4,77	3,77	0,83	0,03	1,87	0,13
apresentar doenças cap.XII - CID	3,86	3,32	1,07 ^h	0,09	1,72	0
não apresentar essas doenças	4,98	3,87	0,75	0,02	1,87	0,14
apresentar doenças cap.XIII - CID	9,71	6,12	1,09	0	2,04	0
não apresentar essas doenças	4,02	3,41	0,81	0,03	1,84	0,14

* em µg/L

doenças cap.IV - CID = doenças do sangue e dos órgão hematopoéticos; doenças cap.VI - CID = doenças do sistema nervoso e dos órgãos dos sentidos; doenças cap.VII - CID = doenças do aparelho circulatório; doenças cap.VIII - CID = doenças do aparelho respiratório; doenças cap.IX - CID = doenças do aparelho digestivo; doenças cap.X - CID = doenças do aparelho geniturinário; doenças cap.XII - CID = doenças da pele e do tecido celular subcutâneo; doenças cap.XIII - CID = doenças do sistema osteomuscular e do tecido conjuntivo; ^a p = 0,014; ^b p = < 0,01; ^c p = 0,014; ^d p = 0,047; ^e p = 0,018; ^f p = 0,027; ^g p = < 0,01; ^h p = 0,04.

Na batata doce, além do HCB foi encontrado 0,6 µg/Kg de DDT mas em níveis inferiores aos encontrados por Duggan et al.¹³ de 4 a 10 µg/Kg para o DDT. Considerando que a ingestão diária aceitável do DDT é de 20 µg/Kg¹⁴ não se classificou a batata doce como fator importante de exposição.

Se comparados os teores de praguicidas organoclorados encontrados na gordura de frango de Pilões com os teores citados por Barretto et al.¹⁵, em frangos destinados à exportação e provenientes de quatro estados brasileiros, verifica-se que as concentrações de HCB nos frangos de Pilões superam em 122 vezes os valores dos frangos de exportação, 8 vezes os valores de HCH total e quase 2 vezes os valores de DDT total. Isso demonstra que a ingestão de alimentos contaminados é uma importante via de exposição para os habitantes de Pilões, notadamente o HCB.

Foi verificado que uma proporção significativamente maior de pessoas em Pilões ingeriam alimentos produzidos no local e o faziam mais frequentemente do que a população de controle ($p < 0,01$).

Foi observado, ainda, que as pessoas que referiam se alimentar de produtos locais apresentavam 4 vezes mais chances (no caso de alimentos vegetais) e 3 vezes mais chances (no caso de aves domésticas) de apresentar resíduos de HCB no sangue. Estudos realizados no Japão por Hanaoka et al.¹⁶ corroboram a importância do alimento como via de exposição, encontrando níveis superiores de POPs entre os maiores consumidores de arroz e leite.

As pessoas que referiam comer alimentos plantados em hortas locais apresentaram no soro sanguíneo teores médios de HCB (2,4 µg/L) estatisticamente superiores ($p < 0,01$) quando comparados aos que não referiam comer (0,1 µg/L). O teor médio de HCB (2,9 µg/L) de quem consumia carne de animais criados no local, foi superior ($p < 0,01$) ao teor médio (0,3 µg/L) de quem não se alimentava desses produtos.

Com relação aos outros praguicidas organoclorados, encontrou-se associação entre apresentar níveis de p-p'DDE e consumir carne de frango de criação doméstica. Além disso, o teor médio de p-p'DDE (3 µg/L) de quem referia comer carne foi significativamente superior ($p < 0,01$) ao teor médio (1,8 µg/L) de quem referiu não consumir. Portanto, os dados sugerem que a ingestão de alimentos foi uma importante via de exposição aos POPs.

As doenças de pele foram as patologias mais diagnosticadas em Pilões, sobressaindo-se o impetigo e o eczema. O impetigo é uma infecção bacteriana de pele que pode ser causada pela coçadura de lesões preexistentes como escabiose, eczemas, picadas de inseto etc. Em Pilões, a proporção de impetigo foi duas vezes maior do que na Cota 200, (6,7% contra 3,1%) provavelmente, pelas picadas de pernilongos e borrachudos que infestam aquela região. Encontrou-se também 4 vezes mais portadores de eczemas em Pilões (2,9% contra 0,7%). O eczema é uma dermatite, frequentemente associada a manifestações alérgicas, de curso crônico, mas evoluindo com períodos de crise e de acalmia. Trata-se de uma doença de pele

que pode estar relacionada à exposição aos compostos organoclorados. A população de Pilões apresentou um número significativamente maior ($p < 0,01$) de portadores do grupo de doenças de pele do que a Cota 200, mas não se encontrou diferença estatística entre as diversas patologias da pele separadamente, entre as populações estudadas.

Na Cota 200, as doenças do sistema nervoso e dos órgãos dos sentidos ocuparam o 4º lugar no total de diagnósticos, em razão de um surto de conjuntivite que se apresentava no bairro naquele momento. Foram encontradas, ainda, algumas diferenças como um maior número de desnutridos em Pilões ($p < 0,01$) e mais doenças do aparelho respiratório na Cota 200 ($p < 0,01$).

Os bairros Cota, dentre eles a Cota 200, foram identificados em estudos de provas de função pulmonar realizados por Hofmeister¹⁷, como sendo os de pior "performance" em comparação a outros bairros de Cubatão. As hipóteses apresentadas por Hofmeister¹⁷ para explicar tal característica foram às peculiaridades atmosféricas e topográficas da região bem como a predominância de certos poluentes atmosféricos, como os oxidantes fotoquímicos.

A principal diferença em Pilões ficou por conta das doenças de pele devido ao maior número de piodermes (infecções bacterianas da pele).

As causas mais comuns de leucocitose em um hemograma são as infecções em geral. O fato da população de Pilões apresentar maior proporção de infecções bacterianas de pele (piodermes) poderia, em parte, explicar a maior prevalência de leucocitose. Contudo quando expurgados os casos de piodermes nos dois grupos estudados, Pilões permaneceu com diferença significativa de casos de leucocitose em comparação ao grupo controle, podendo sugerir que as alterações leucocitárias em Pilões sejam um reflexo da exposição aos POPs.

As doenças crônico-degenerativas, dentre elas o Diabetes Mellitus, têm assumido importância progressiva na morbi-mortalidade das populações em geral, nas últimas décadas. Foram encontradas 8 pessoas (4 em cada grupo) com teores glicêmicos acima do limite empregado de 110mg/dL, e apenas uma pessoa do grupo controle apresentou diagnóstico, laboratorialmente confirmado, de Diabetes Mellitus.

As parasitoses intestinais são bons indicadores do quadro de saúde geral de uma população e costuma refletir a sua qualidade de vida. O índice de poliinfestados foi de 36,8% em Pilões (42 dos 114 positivos) e 23,9% na Cota 200 (21 dos 88 positivos). Não houve relação estatística entre pertencer a um dos grupos estudados e apresentar parasitoses intestinais.

A doença hipertensiva tem sido associada, entre outros fatores, à exposição aos POPs. Foram detectadas 44 pessoas com diagnóstico de hipertensão arterial, sendo 14 em Pilões e 30 na Cota 200. Esta diferença não foi significativa do ponto de vista estatístico ($p = 0,08$). Não se encontrou, tampouco, relação entre ser hipertenso e apresentar resíduos de POPs. no sangue.

Os teores médios de ALT, AST, BD e BI foram todos estatisticamente superiores no grupo controle. Contudo, quando

analisado o conjunto dos testes enzimáticos de cada indivíduo aliado ao exame clínico, observou-se quatro residentes em Pilões e sete residentes na Cota 200 com hipótese diagnóstica de doença hepática. Dessas 11 pessoas, verificou-se que 5 delas (duas de Pilões e três da Cota 200) tinham história de etilismo crônico e outra, da Cota 200, referia hepatite progressa. Nas 5 restantes (2 de Pilões e 3 da Cota 200), preponderou a suspeita de possível etiologia infecciosa. Todos foram encaminhados para elucidação diagnóstica e acompanhamento ambulatorial. Um indicador que pode auxiliar na determinação do fator de risco predominante ou mais concorrente é a relação AST/ALT citado pelo Subcommittee on Pesticides¹⁸. Dos 5 indivíduos com hepatopatia e com história progressa negativa para etilismo e hepatites infecciosas, 3 deles (2 de Pilões) apresentaram elevação predominante de ALT. De modo que, não se verificou relação entre apresentar resíduos de POPs no sangue e possuir alterações quantitativas das enzimas hepáticas.

Não foi observada relação estatística entre ser portador de anemia e pertencer a um dos grupos estudados. Todos os casos foram classificados como anemia ferropriva.

A dosagem de creatinina ficou prejudicada devido ao grande número de perdas em Pilões, no entanto, aliando-se esses resultados aos exames médicos, pode-se afirmar, que nada indicou a existência de situação de anormalidade nas funções renais nos grupos estudados (Tabela 5).

CONCLUSÃO

Encontrou-se, na população de Pilões, diferença estatisticamente significativa entre os teores médios sanguíneos mais elevados de HCB e apresentar leucopenia, de DDT total e HCH total e apresentar alteração ao exame clínico, de DDT total e apresentar doenças do aparelho circulatório e de HCH total e apresentar doenças de pele. São reconhecidas as dificuldades de se estabelecer relação entre a exposição à contaminante do meio ambiente e efeito, que são caracterizadas geralmente pelo contato prolongado de pequenas doses do toxicante¹⁸. Embora não se podendo inferir relação causal nas diferenças encontradas, os dados obtidos demonstraram o risco que pode ser atribuído à exposição aos praguicidas organoclorados, onde foi encontrada associação positiva entre residir em Pilões e apresentar resíduos de praguicidas organoclorados em soro sanguíneo. Os dados obtidos sugerem que a ingestão de alimentos foi uma importante via de exposição aos praguicidas organoclorados.

Como resultado, a população de Pilões foi transferida daquela área e atualmente reside em um conjunto habitacional de um bairro de classe média do município de Cubatão.

REFERÊNCIAS

1. [CETESB] Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental. Boletins de Resultados de Análises. Jun. a set.(mimeografado), 1991
2. DAE/CETESB] Departamento de Águas e Energia Elétrica do Estado de São Paulo & Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental. Resíduos sólidos industriais na bacia do rio Cubatão. São Paulo; ed.CETESB; 1978 2v.
3. Santos Filho, E. Determinação do grau de exposição interna aos praguicidas organoclorados, em população residente sobre aterro a céu aberto na localidade de Pilões, Cubatão – S.P. São Paulo; 1998. [Tese de Doutorado-Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo].
4. Santos Filho, E. et al. Grau de exposição a praguicidas organoclorados em moradores de aterro a céu aberto. *Rev Saúde Pub* 2003; 7 (4): 515-22.
5. Schafer, K.S & Kegley, S.E. Persistent toxic chemicals in the US food supply. *J. Epidemiol. Community Health*; 2002; 56 (11): 813-7.
6. Thompson, F ed. Manual of Analytical Methods for analysis of pesticide residues in human and environmental samples. U.S.A., Environmental Protection Agency, 1982
7. Steiwandter, H. Contributions to silica gel application in pesticide residue analysis III. An on-line method for extracting and isolating chlorinated hydrocarbon pesticides and polychlorinated biphenyls (PCB's) from milk and dairy products. *Fresenius Z Anal Chem*, 1982, 312: 342-5.
8. Siqueira, M.E.P.B. Fatores que afetam os resultados da monitorização biológica. In: *Biomonitorização: indicadores e limites biológicos de exposição às substâncias químicas*. São Paulo, ed.UNESP. 1994: 17-26.
9. Miller, O. & Gonçalves, R.R. Laboratório para o clínico. 8ª ed. Rio de Janeiro. ed. Atheneu, 1995.15- 1 Barreto, H.H.C.; Inomata, O.N.K; Lemes, V.R.R. Níveis de pesticidas organoclorados em gordura de frango, 1988-1991. *Rev Inst Adolfo Lutz*, 1992: 52 (1/2): 97-100.
10. Stehr-Green, P.A. Demographic and seasonal influences on human serum pesticide residue levels. *J Toxicol Environ Health* 1989; 27:405-21.
11. Lara, W.H. & Barreto, H.H.C. Resíduos de pesticidas clorados em alimentos. *Rev Inst Adolfo Lutz* 1972: 32:89-94.
12. Waliszewski, S.M. et al.. Persistent organochlorine pesticide in Mexican butter. *Food Addit Contam* 2003; 20 (4): 361-7.
13. Duggan, R.E.; Bany, H.C.; Johnson, L.Y.,1967. Pesticide residues in total diet samples (II). *Pestic Monit J* 1(2):2-12.
14. [FAO/WHO]. Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization. Food Standards Programme Codex Alimentarius Commission. Washington, D.C., 2000 v.2B.
15. Barreto H.H.C.; Inomata, O.N.K.; Lemes, V.R.R. Níveis de pesticidas organoclorados em gordura de frango, 1988-1991. *Rev Inst Adolfo Lutz* 1992: 52 (1/2): 97-100.
16. Hanaoka, T. et al., Residuals of beta-hexachlorocyclohexane, dichlorodiphenyl-trichloroethane and hexachlorobenzene in serum and relations with consumption of dietary components in rural residents in Japan. *Sci.Total Environ*; 286 (1-3): 119 –27, 2002.
17. Hofmeister, V.A. Efeitos da poluição do ar sobre a função pulmonar: um estudo de coorte em crianças de Cubatão. São Paulo; 1991. [Tese de Doutorado apresentada a Faculdade de Saúde Pública da USP].
18. Subcommittee on Pesticides. Epidemiological Toxicology of Pesticide Exposure: report of an international workshop. *Arch Environ Health* 1972, 25: 399-405.

Potencial toxigênico das cepas de *Aspergillus flavus* e *Fusarium verticillioides* isoladas de grãos de milho, da sementeira à colheita, provenientes das regiões de Capão Bonito/SP e Ribeirão Preto/SP

Toxigenic potential of *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides* strains in Brazilian corn from sowing to harvest processes.

RIALA6/1020

Adriana P. de ALMEIDA^{1*}; Myrna SABINO¹; Homero FONSECA²; Benedito CORRÊA³

* Endereço para correspondência: ¹Instituto Adolfo Lutz, Divisão de Bromatologia e Química, Seção de Química Biológica, Av. Dr. Arnaldo, 355 CEP 01246-902, São Paulo/ SP, Brasil. Telefone 55 11 30682921, e-mail: maedri@uol.com.br.

² Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, USP, Piracicaba, SP.

³ Instituto de Ciências Biomédicas, USP, São Paulo, SP.

Recebido: 25/11/2004 – Aceito para publicação: 30/06/2005.

RESUMO

O presente estudo visou identificar o potencial toxigênico das cepas de *Aspergillus flavus* e *Fusarium verticillioides*, isoladas de 57 amostras de grãos de milho e 90 amostras de solo em diferentes estágios de maturidade nas regiões de Capão Bonito/SP e Ribeirão Preto/SP, em relação à produção de aflatoxinas e fumonisinas, respectivamente. A análise do potencial toxigênico de *A. flavus*, revelou a produção de aflatoxinas por 13 cepas (92,9%), em concentração de 10,5 a 482,6 µg/kg para aflatoxina B₁ e de 2,9 a 132,5 µg/kg para aflatoxina B₂. Quanto ao potencial toxigênico das 27 cepas de *F. verticillioides*, 100% produziram fumonisinas em concentrações que variaram de 0,1 a 4833,1 µg/g para fumonisina B₁ e de 0,05 a 321,0 µg/g para fumonisina B₂. A concomitante ocorrência de *A. flavus* e *F. verticillioides* e produção de aflatoxinas e fumonisinas, respectivamente, pelos mesmos, nos campos de plantio de milho, indicam a importância de um controle efetivo no cultivo durante os diferentes estágios de maturidade da planta.

Palavras-Chave. aflatoxinas, fumonisinas, grãos de milho, solo e potencial toxigênico.

ABSTRACT

The present study aimed to identify the toxigenic potential of *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides* strains isolated from 57 samples of corn kernels, and 90 samples of soil at different maturity stages from regions of Capão Bonito and Ribeirão Preto, with regards to production of aflatoxins and fumonisins, respectively. The toxigenic potential analysis of 14 *A. flavus* strains revealed the presence of aflatoxins in 13 strains (92.9%) in concentration ranging from 10.47 to 482.58 µg/kg for aflatoxin B₁, and from 2.9 to 132.5 µg/kg for aflatoxin B₂. With reference to toxigenic potential of *F. verticillioides* strains, 27 (100%) produced fumonisins in concentration of 0.10 to 4,833 µg/g of fumonisin B₁, and 0.05 to 321 µg/g of fumonisin B₂. The concomitant occurrence of *A. flavus* and *F. verticillioides* in corn field indicates the importance of an effective control of cultivation throughout the plant maturation stages.

Key Words. aflatoxins, fumonisins, corn grains, soil and toxigenic potential.

INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é considerado um dos mais importantes cereais cultivados no Brasil. Sua utilização na alimentação humana e animal é conhecida mesmo antes da chegada dos colonizadores ao país, onde o milho já era cultivado e utilizado pelos indígenas. Atualmente, o Brasil é o terceiro maior produtor mundial de milho, logo após a China, contribuindo com 5,5% do total da produção¹.

Em termos de produção, a qualidade do milho depende muito de sua variedade e práticas culturais. Todos os grãos e cereais são expostos, tanto no campo quanto no armazenamento, à ação de fatores físicos, químicos e biológicos, que interagem entre si favorecendo os processos de deterioração.

A contaminação do milho com aflatoxinas e fumonisinas antes da colheita é um problema sério em vários países. Compreender o processo de contaminação do milho por *Aspergillus flavus* e *Fusarium verticillioides* e os fatores que influenciam a produção de aflatoxinas e fumonisinas, respectivamente, é essencial para que estratégias de controle possam ser criadas.

As aflatoxinas estão entre os mais importantes carcinógenos conhecidos, sendo classificadas na Classe 1 dos carcinógenos humanos pela "International Agency for Research on Cancer" – IARC².

Produzidas, principalmente, por cepas de *A. flavus* e *A. parasiticus*, aparecem contaminando vários tipos de grãos e rações, sendo que o milho é o produto mais citado em literatura, depois do amendoim. Conseqüentemente, altos níveis de aflatoxinas têm sido detectados em quase todas as áreas produtoras do mundo.

As fumonisinas foram primeiramente isoladas de culturas de *F. verticillioides* Sheldon, porém, outras espécies de *Fusarium* têm sido demonstradas como produtoras de fumonisinas³.

O *F. verticillioides*, principal espécie produtora de fumonisinas, ocorre comumente no milho e em outros cereais como, trigo, arroz e aveia. Essa espécie tem larga distribuição na natureza e não ocorre somente em zonas temperadas úmidas e sub-úmidas, mas também, em zonas tropicais e subtropicais.

A "International Agency for Research on Cancer" – IARC classificou as toxinas de *F. verticillioides* como pertencentes a Classe 2B, possivelmente carcinogênicas a seres humanos, embora não haja, ainda, evidências suficientes².

A contaminação do milho recém-colhido por espécies de *Aspergillus* e *Fusarium* tem sido um problema sério em muitos países. De acordo com estimativas do World Bank Report – Investing in Health⁴, doenças causadas por micotoxinas tendem a reduzir a expectativa de vida nos países em desenvolvimento. Tal fato enfatiza a importância da compreensão da produção de aflatoxinas e fumonisinas por cepas de *A. flavus* e *F. verticillioides*, respectivamente, nos campos de cultivo do milho.

Devido à importância toxicológica das micotoxinas, o objetivo do presente trabalho foi verificar a produção de aflatoxinas e fumonisinas por cepas de *A. flavus* e *F. verticillioides*, respectivamente, isoladas de amostras de solo e grãos de milho colhidos em diferentes fases de crescimento da planta em duas regiões do Estado de São Paulo, Brasil.

MATERIAIS E MÉTODOS

Potencial toxigênico das cepas de *A. flavus*

As cepas de *A. flavus* foram isoladas de 57 amostras de milho (híbrido XL-251, sementes Braskalb) e 90 amostras de solo provenientes das regiões de Capão Bonito e Ribeirão Preto, Estado de São Paulo, no período de novembro de 1998 a abril de 1999, conforme descrito em trabalho anteriormente publicado⁵.

De cada cepa isolada dos grãos de milho e solo, foi coletada, com o auxílio de uma alça de platina, um pequeno fragmento da cultura de *A. flavus* mantida em tubo com ágar Sabouraud dextrose a 25°C. O fragmento da colônia foi inoculado no centro de uma placa de Petri contendo ágar côco e incubado a 25°C por 10 dias. Findo o período de incubação a cultura foi analisada quanto à contaminação por aflatoxinas. As culturas em ágar côco foram extraídas, com clorofórmio (30 mL clorofórmio para 10g de cultura) e colocadas em agitação por 30 minutos. O conteúdo foi filtrado em papel de filtro Whatman nº1 e evaporado até a secura. O extrato ressuspendido foi quantificado por cromatografia em camada delgada. A confirmação da identidade das aflatoxinas foi feita através de derivação com ácido trifluoroacético⁶.

Potencial toxigênico das cepas de *F. verticillioides*

Conforme descrito em trabalho anteriormente publicado, as cepas de *F. verticillioides* foram isoladas de 57 amostras de milho (híbrido XL-251, sementes Braskalb) e 90 amostras de solo provenientes das regiões de Capão Bonito e Ribeirão Preto, Estado de São Paulo, no período de novembro de 1998 a abril de 1999¹.

Foi inoculado, em erlenmeyer contendo 50g de arroz esterilizado, 1 ml de suspensão de esporos obtidos do cultivo de cepas de *F. verticillioides* em ágar Sabouraud dextrose a 25 °C. Os erlenmeyers foram incubados por um período de 15 dias a 27 °C seguido por mais um período de 15 dias a 15°C. As amostras de arroz foram submetidas a análise para verificar a contaminação por fumonisinas. Resumidamente, 10g da cultura foram retiradas do erlenmeyer e 50 mL de uma solução 1:1 de acetoneitrila/água foram adicionados. A mistura foi agitada por 30 minutos. O extrato foi filtrado em papel de filtro (Whatman nº1). 2 mL do filtrado foram adicionados a 5mL de água destilada e a mistura foi submetida a minicoluna de troca iônica Varian C-18 (Varian, Harbor City, CA), preconditionada com 2mL de metanol e 2 mL de água Milli Q (Millipore, Belford, MA). A minicoluna foi lavada com 2 mL de acetoneitrila/água (20:80) e a

toxina eluída com 2 mL de acetonitrila/água (70:30). Após a eluição, o extrato foi recolhido em eppendorff e armazenado à temperatura de congelamento até o momento da quantificação.

Uma alíquota de 50µL do extrato foi derivatizada com 200µl de solução de o-ftaldialdeído (OPA) (40 mg de OPA, 1 mL metanol, 5 mL tetraborato de sódio 0.1 M e 50 µL 2-mercaptoetanol), e injeções no cromatógrafo líquido foram feitas dentro de 2 minutos. As fumonisinas foram analisadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência (Shimadzu LC-10AD, bomba e detector de fluorescência RF-10AXL), usando coluna 5 ODS-20 C₁₈ (150mm x 4,6 mm, Phenomenex - ultracarb). Comprimentos de onda de 335 e 440 nm (excitação e emissão, respectivamente) foram utilizados. Como fase móvel, foi utilizado o sistema acetonitrila : água : ácido acético (1:1:0,5), com vazão de 1,0 ml/min., temperatura ambiente 22-23°C, e temperatura de coluna 24°C. Essa proporção permitiu a obtenção de pressão e viscosidade de fase móvel adequadas, com separação e tempo de retenção: t_r FB₁ = 8 - 10 minutos e t_r FB₂ = 22 - 24 minutos. Os limites de detecção e quantificação do método foram de 15ng/g e 50ng/g, respectivamente, tanto para fumonisina B₁ quanto para fumonisina B₂. A recuperação do método empregado foi de 88% e 94% para FB₁ e FB₂, respectivamente, na concentração de 50ng/g⁵.

RESULTADOS

De cada amostra de milho e solo onde foram isoladas cepas de *A. flavus* e *F. verticillioides*, selecionou-se uma cepa

para teste de produção de aflatoxinas e fumonisinas, totalizando 41 testes.

A análise do potencial toxigênico das 14 cepas de *A. flavus* provenientes de 57 amostras de grãos de milho e 90 amostras de solo das regiões de Capão Bonito/SP e Ribeirão Preto/SP, no período de novembro de 1998 a abril de 1999, revelou a produção de aflatoxinas por 13 cepas (92,9%). As concentrações variaram de 10,5 a 482,6 µg/kg para aflatoxina B₁ (AFB₁) e de 2,9 a 132,5 µg/kg para aflatoxina B₂ (AFB₂). Das 13 cepas produtoras, 12 (92,3%) produziram tanto AFB₁ quanto AFB₂ e 1 (7,7%) produziu somente AFB₁ (Tabela 1). A concentração mais elevada de AFB₁ e AFB₂ foi obtida da cepa isolada na região de Ribeirão Preto na 3ª coleta, período correspondente à 75 dias após a emergência da planta (Tabela 1).

A análise do potencial toxigênico de 27 cepas de *F. verticillioides* em 57 amostras de grãos de milho e em 90 amostras de solo, provenientes das regiões de Capão Bonito e Ribeirão Preto, no período de novembro de 1998 a abril de 1999, revelou a produção de fumonisinas por todas as cepas analisadas (100%), com níveis de concentração entre 0,1 e 4833,1 µg/g para FB₁ e 0,05 e 321,0 µg/g para FB₂. Das 27 cepas produtoras, 1 (3,7%) produziu somente FB₂ e 26 (96,3%) tanto FB₁ quanto FB₂. As concentrações mais elevadas de FB₁ foram obtidas das cepas isoladas nas regiões de Capão Bonito (7ª coleta) e Ribeirão Preto (3ª coleta), períodos correspondentes à 135 e 75 dias após a emergência da planta, respectivamente (Tabela 2). A concentração mais elevada de FB₂ foi obtida da cepa isolada na região de Ribeirão Preto na

Tabela 1. Produção de aflatoxinas por cepas de *Aspergillus flavus* isoladas de amostras de grãos de milho e solo das regiões de Capão Bonito e Ribeirão Preto, no período de novembro de 1998 a abril de 1999.

Nº da Cepa	Região de Plantio	Estádio de Desenvolvimento da Planta	Procedência	Aflatoxina B ₁ µg/kg	Aflatoxina B ₂ µg/kg
1	CB	8ª C	Solo	26,0	23,9
2	RP	A	Solo	307,0	121,0
3	RP	A	Solo	294,5	91,5
4	RP	1ª C	Solo	287,5	76,6
5	RP	3ª C	Solo	482,6	132,5
6	CB	5ª C	Milho	438,6	17,4
7	CB	7ª C	Milho	130,1	8,1
8	RP	3ª C	Milho	39,5	2,9
9	RP	3ª C	Milho	37,6	3,4
10	RP	4ª C	Milho	218,1	16,8
11	RP	4ª C	Milho	216,4	37,3
12	RP	5ª C	Milho	10,5	ND
13	RP	6ª C	Milho	297,8	12,3

CB = Capão Bonito, RP = Ribeirão Preto; A = antes do plantio; 1ª C = 45 dias após a emergência da planta; 2ª C = 60 dias após a emergência da planta; 3ª C = 75 dias após a emergência da planta; 4ª C = 90 dias após a emergência da planta; 5ª C = 105 dias após a emergência da planta; 6ª C = 120 dias após a emergência da planta; 7ª C = 135 dias após a emergência da planta; 8ª C = 150 dias após a emergência da planta (colheita), ND = aflatoxina não detectada.

4ª coleta, período correspondente à 90 dias após a emergência da planta (Tabela 2).

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Os resultados revelaram a produção de aflatoxinas por 92,9% das cepas de *A. flavus* isoladas de grãos de milho e solo em níveis que variaram de 10,5 a 482,6 µg/kg para AFB₁ e de 2,9 a 132,5 µg/kg para AFB₂, sendo que em 7,7% delas observou-se somente a produção de AFB₁ e em 92,3% a produção de AFB₁ e AFB₂ (Tabela 1). Achados semelhantes também foram apontados por outros autores, estudando cepas de *A. flavus*

isoladas de grãos de milho^{7,8}. Nesses trabalhos, os autores verificaram a produção de aflatoxinas B₁ e B₂ por *A. flavus* em 76,1% e 72,9% das cepas isoladas de grãos de milho, respectivamente.

No Brasil, cepas toxigênicas de *A. flavus* e *A. parasiticus* foram também isoladas de grãos de milho. Asevedo et al.⁹ constataram que 39,4% das cepas de *A. flavus*, isoladas de grãos de milho armazenados, foram produtoras de AFB₁ e que 100% das cepas de *A. parasiticus* foram produtoras de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂. Almeida et al.¹⁰, trabalhando com grãos de milho recém-colhido, provenientes das regiões de Assis, Capão Bonito e Ribeirão Preto, constataram que 60% das cepas de *A. flavus* isoladas foram produtoras de aflatoxinas

Tabela 2. Concentração de FB₁ e FB₂ em 27 cepas de *Fusarium verticillioides* isoladas de amostras de solo e milho das regiões de Capão Bonito e Ribeirão Preto, no período de novembro de 1998 a abril de 1999.

Número da Cepa	Região de Plantio	Estádio de Desenvolvimento da Planta	Material de Procedência	Fumonisina B ₁ µg / g	Fumonisina B ₂ µg / g
1	CB	5ª Coleta	Solo	0,1	0,05
2	CB	4ª Coleta	Milho	334,0	4,5
3	CB	5ª Coleta	Milho	124,7	0,7
4	CB	6ª Coleta	Milho	115,0	1,3
5	CB	7ª Coleta	Milho	4833,1	127,7
6	CB	8ª Coleta	Milho	172,3	2,3
7	RP	3ª Coleta	Solo	ND	0,05
8	RP	5ª Coleta	Solo	677,7	6,1
9	RP	6ª Coleta	Solo	52,3	0,6
10	RP	6ª Coleta	Solo	2190,8	21,1
11	RP	A	Milho	384,0	2,2
12	RP	A	Milho	283,4	4,7
13	RP	3ª Coleta	Milho	1104,9	40,7
14	RP	3ª Coleta	Milho	90,9	4,5
15	RP	3ª Coleta	Milho	4763,7	300,9
16	RP	4ª Coleta	Milho	60,3	1,7
17	RP	4ª Coleta	Milho	339,7	10,6
18	RP	4ª Coleta	Milho	1585,6	46,2
19	RP	4ª Coleta	Milho	4475,0	321,0
20	RP	4ª Coleta	Milho	1970,5	64,3
21	RP	5ª Coleta	Milho	1088,0	14,0
22	RP	5ª Coleta	Milho	30,30	0,3
23	RP	5ª Coleta	Milho	1770,4	41,2
24	RP	6ª Coleta	Milho	1677,8	36,4
25	RP	7ª Coleta	Milho	544,8	8,6
26	RP	7ª Coleta	Milho	951,2	14,8
27	RP	7ª Coleta	Milho	1837,0	33,2

CB = Capão Bonito, RP = Ribeirão Preto; A = antes do plantio; 1ª = 45 dias após a emergência da planta; 2ª = 60 dias após a emergência da planta; 3ª = 75 dias após a emergência da planta; 4ª = 90 dias após a emergência da planta; 5ª = 105 dias após a emergência da planta; 6ª = 120 dias após a emergência da planta; 7ª = 135 dias após a emergência da planta; 8ª = 150 dias após a emergência da planta (colheita), ND = fumonisina não detectada.

(615,0 µg/kg a 30.750,0 µg/kg para AFB₁ e de 11,0 µg/kg a 22,0 µg/kg para AFB₂). Os níveis mais elevados de AFB₁, comparativamente ao de AFB₂, também confirma os achados de outros pesquisadores^{7,11}.

Em relação à produção de fumonisinas por cepas de *F. verticillioides*, observou-se que a totalidade das cepas avaliadas foram produtoras de fumonisinas (0,1 µg/g a 4833,1 µg/g para FB₁ e 0,05 µg/g a 321,0 µg/g para FB₂). Tais resultados são concordantes com os obtidos em outros trabalhos^{10,12,13}, nos quais a produção de fumonisinas foi constatada em 100% das cepas de *F. verticillioides*. Convém salientar, que os níveis obtidos de FB₁ no presente trabalho também foram similares aos reportados previamente por Visconti e Doko¹³ que observaram a produção de fumonisina B₁ nas 41 cepas de *Fusarium* isoladas de milho, em uma concentração que variou de 0,70 a 4100 µg/g.

As concentrações mais elevadas de FB₁ em relação a FB₂, bem como a produção de ambas as toxinas (FB₁ e FB₂) por 96,3% das cepas *F. verticillioides*, também são observações apontadas na literatura¹².

Outros autores têm relatado a produção de fumonisinas por outras espécies do gênero *Fusarium*, tais como: *F. proliferatum*, *F. napiforme*, *F. anthophyllum* e *F. dlamini*^{3,14}. Entretanto, *F. verticillioides* continua sendo a principal espécie produtora de fumonisinas e aquela encontrada com maior frequência em grãos de milho recém-colhido e armazenado.

A concentração mais elevada de AFB₁ foi obtida da cepa de *A. flavus* isolada na 3ª coleta em Ribeirão Preto, enquanto que a concentração mais elevada de FB₁ foi obtida da cepa de *F. verticillioides* isolada na 7ª coleta em Capão Bonito. Tais resultados demonstram a falta de um padrão de produção de aflatoxinas e fumonisinas no campo por cepas de *A. flavus* e *F. verticillioides*, respectivamente. Como o potencial toxigênico foi realizado sob condições controladas de laboratório, fica difícil de se avaliar quais os fatores que tiveram maior envolvimento na produção de micotoxinas por cepas de *A. flavus* e *F. verticillioides* isoladas nos diferentes estádios de desenvolvimento.

Não existe trabalho em literatura que tenha avaliado o potencial toxigênico de cepas fúngicas isoladas de grãos de milho em diferentes épocas de plantio. Chulze et al.¹⁵ analisaram amostras de grãos de milho, provenientes da região de Córdoba - Argentina, coletadas em diferentes estádios de desenvolvimento da planta. Nesse trabalho os autores verificaram elevada incidência de *F. verticillioides* e maior produção de fumonisinas aos 75 dias após o florescimento da planta, entretanto não verificaram o potencial toxigênico das cepas de *F. verticillioides*.

Sabe-se que o desenvolvimento de fungos toxigênicos e conseqüente produção de micotoxinas são dependentes de uma complexa série de fatores, como susceptibilidade do substrato à colonização do fungo produtor, fatores físicos e fatores biológicos¹⁶. No presente trabalho a produção de aflatoxinas e fumonisinas por cepas de *Aspergillus* e *Fusarium*,

respectivamente, parece estar relacionada com a capacidade genética do fungo em produzir micotoxinas, uma vez que não houve influência do período de isolamento da cepa na produção de micotoxinas pelas mesmas.

Fatores físicos como, temperatura e umidade também influenciam o crescimento fúngico e a produção de micotoxinas. Os fungos que contaminam os grãos se proliferam em teores de umidade acima de 13,5 %, sendo a atividade de água ideal para o crescimento das principais espécies de fungos toxigênicos acima de 0,76^{17,18}. Segundo esses mesmos autores os valores mínimos de atividade de água para o crescimento de *F. moniliforme* e produção de fumonisinas são 0,87 e 0,90, respectivamente e os valores mínimos de atividade de água para o crescimento de *A. flavus* e produção de aflatoxinas são 0,80 e 0,87, respectivamente. Segundo Lacey et al.¹⁷, tanto as fumonisinas quanto as aflatoxinas são facilmente produzidas quando cepas de *F. moniliforme* e *A. flavus* são cultivadas em grãos de milho a 25°C.

Schindler et al.¹⁹, observaram, em meio de cultura, a produção máxima de aflatoxinas a 24°C, após 5 dias de incubação. Verificaram, também, que o crescimento máximo para este fungo foi obtido nas temperaturas de 24°C e 35°C.

Nelson et al.²⁰ também verificaram que a temperatura ótima para o crescimento de *Fusarium* spp. é de 25°C, durante o dia, e 20°C durante a noite, embora este crescimento também ocorra em temperaturas constantes entre 20 e 25°C, desde que os níveis de Aa sejam adequados.

A constatação de fungos toxigênicos no alimento não significa, automaticamente, a presença de micotoxinas no mesmo, principalmente se estes fungos não estão se desenvolvendo mas, indica que há, potencialmente, o risco de uma possível contaminação por micotoxinas. Se este alimento for, ainda, um bom substrato para produção de micotoxinas e se os fatores abióticos, principalmente umidade e temperatura, forem adequados, os riscos dessa contaminação tendem a aumentar.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro à pesquisa.

REFERÊNCIAS

1. Instituto Brasileiro de geografia e Estatística [IBGE]. Levantamento sistemático da produção agrícola. [Acesso em 1999 Nov 29] Disponível na URL: <http://www.sidra.ibge.gov.br/cgi-bin/prtabl>
2. International Agency on Research on Cancer [IARC]. Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. IARC. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Lyon: IARC, 1993. v.56.
3. Nelson PE. Taxonomy and biology of *Fusarium verticillioides*. Mycopathologia 1992; 117: 29-36.

4. World Bank Report. Investing in Health. World Development Report 1993. New York: Oxford University Press; 1993.
5. Almeida AP, Corrêa B, Direito GM, Fonseca H, Fancelli AL, Ortega E. Mycoflora and fumonisin contamination in Brazilian corn from sowing to harvest. *J Agric Food Chem*; 2000, 50 (13): 3877-82.
6. Lin MT, Dianese JC. A Coconut-Agar Medium for rapid detection of aflatoxin production by *Aspergillus* spp. *Phytopathology* 1976; 66: 1466-69.
7. Huang CJ, Chuang TY, Tseng TC. Contamination of *Aspergillus flavus* on corn kernels and production of aflatoxin by the fungus in Taiwan. *Plant Protect Bull* 1990; 32: 195-202.
8. Mehan VK, Chohan JS. Aflatoxin B₁ producing of *Aspergillus flavus* Link ex Fries from cotton, maize and wheat. *Mycopathol Mycol Appl* 1973; 49 : 263-74.
9. Asevedo IG, Gambale W, Corrêa B, Paula CR, Souza VM, Almeida RMAD. Mycoflora and aflatoxigenic species of *Aspergillus* spp. isolated from stored maize. *Ver Microbiol* 1994; 25: 46-50.
10. Almeida AP, Corrêa B, Mallozzi MAB, Sawasaki E, Ortega EM. Mycoflora and aflatoxin/fumonisin production by fungal isolates from freshly harvested corn hybrids. *J. Brazilian Soc Microbiol* 2000;31: 321-6.
11. Zevada MZ. Producción de aflatoxinas por cepas aisladas de maíz. *Rev Lat-Am Microbiol* 1971; 13: 263-6.
12. Thiel PG, Marasas WFO, Sydenham GS, Gelderblom WCA, Nieuwenhuis JJ. Survey of fumonisins production by *Fusarium* species. *Appl Environ Microbiol* 1991; 57 : 1089-93.
13. Visconti A, Doko MB. Survey of fumonisin production by *Fusarium* isolated from cereals in Europe. *JAOAC Int* 1994; 77 : 546-50.
14. Ross PF, Nelson PE, Richard JL, Plattner RD, Rice LG, Osweiler GD, Wilson TM. Production of fumonisin by *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum* isolates associated with equine leukoencephalomalacia and pulmonary edema syndrome in swine. *Appl Environ Microbiol* 1990; 56: 3224- 6.
15. Chulze SN, Ramirez ML, Farnochi MC. *Fusarium* and fumonisin occurrence in Argentinean corn at different ear maturity stages. *J Agric Food Chem* 1996; 44: 2797-2801.
16. Ciegler A. Fungi that produce mycotoxins: condition and occurrence. *Mycopathologia* 1978; 65: 5-11.
17. Lacey J, Ramakrishna N, Hamer A, Magan N, Marfleet C. Grain fungi. In: Arora DK, Mukerji KG, Marth EH editors. *Handbook of Applied Mycology: foods and feeds*. New York: Marcel Dekker; 1991.
18. Leitão MF. Microbiologia de alimentos. In: Roitman I, Travassos LR, Azevedo JL editors. *Tratado de Microbiologia*. São Paulo: Ed. Manole; 1988. p.1-81.
19. Schindler AF, Plamer JG, Eisenberg WV. Aflatoxin production by *Aspergillus flavus* as related to various temperature. *Appl Microbiol* 1967; 15: 1006-9.
20. Nelson PE, Touson TA, Marasas WFO. *Fusarium* species. An illustrated manual for identification. Pennsylvania: University Press; 1983.

Influência da irradiação gama na produção de aflatoxina B₁ e no crescimento de cepa toxigênica de *Aspergillus flavus* em amendoim (*Arachis hypogaea* L.)

Gamma-irradiation effect on aflatoxin B₁ production and growth of toxigenic strain of *Aspergillus flavus* in peanut (*Arachis hypogaea* L.).

RIALA6/1021

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: Fundação Ezequiel Dias, Laboratório de Micologia e Micotoxinas. Rua Conde Pereira Carneiro, 80, Gameleira CEP 30510-010. Belo Horizonte/MG.

¹ Fundação Ezequiel Dias, Laboratório de Micologia e Micotoxinas.

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: 31/03/2005 – Aceito para publicação: 30/06/2005.

RESUMO

Foi verificado o efeito da irradiação gama (⁶⁰Co), em diferentes doses, na destruição de cepa aflatoxigênica e na produção de aflatoxina B₁ por *Aspergillus flavus* IMI 190443, em amendoim, cultivar Tatu Vermelho, safras 2001/2002 e 2002/2003. Foram feitos dois testes nas amostras, um deles envolvendo irradiação e posterior inoculação e outro, com inoculação antes da irradiação. A destruição do *Aspergillus flavus* IMI 190443, após irradiação, foi medida pela porcentagem de infecção fúngica, por meio da técnica do plaqueamento direto. A aflatoxina B₁ foi extraída em mistura de metanol e KCl 4% (270 + 30, v/v), seguido de clarificação com CuSO₄ 10% e partição em clorofórmio. A quantificação foi executada por cromatografia em camada delgada, medindo-se a área das fluorescências de amostras e padrões em densitômetro a 366 nm. A inoculação de amendoim previamente irradiado, com cepa aflatoxigênica, provocou a formação de teores elevados de aflatoxina B₁. Doses de irradiação gama de 25 e 30 kGy foram necessárias para a completa inativação de esporos.

Palavras-Chave. amendoim, aflatoxina B₁, irradiação gama, *Aspergillus flavus*.

ABSTRACT

Different doses of gamma-irradiation effect was verified for inactivating aflatoxigenic strain, and on aflatoxin B₁ production by *Aspergillus flavus* IMI 190443 in peanut, Tatu Vermelho variety, 2001/2002 and 2002/2003 crops. Two tests were performed in all samples: in one of them they were firstly irradiated before being inoculated, and in another assay peanuts were inoculated with aflatoxigenic strain before being irradiated. After irradiation, *Aspergillus flavus* IMI 190443 destruction was observed by the percentage of fungi infection by means of direct plating technique. Aflatoxin B₁ was extracted with a mixture of methanol and 4% potassium chloride (270 + 30, v/v), followed by clarification with 10% cupric sulfate and partition with chloroform. Quantification was done by thin layer chromatography, measuring the samples fluorescent areas and of standard samples in densitometer (366 nm). Previously irradiated peanuts inoculated with aflatoxigenic strain, induced the production of high levels of aflatoxin B₁. The data of the present study showed that 25 and 30 kGy gamma irradiation doses were necessary to get a complete inactivation of *Aspergillus flavus* IMI 190443.

Key Words. peanut, aflatoxin B₁, gamma irradiation, *Aspergillus flavus*.

INTRODUÇÃO

O problema das micotoxinas é muito sério em países em desenvolvimento, onde condições climáticas favoráveis, práticas agrícolas e de armazenamento inadequadas, conduzem ao crescimento fúngico e produção de toxinas em diferentes alimentos¹.

Fungos do gênero *Aspergillus*, em áreas de clima quente e úmido, são capazes de invadir figos, nozes, cereais, mas principalmente amendoim e milho, e produzirem as aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂, metabólitos secundários que apresentam atividade mutagênica, teratogênica e carcinogênica². *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus* são as espécies mais importantes produtoras de aflatoxinas sendo, a aflatoxina B₁ entre todas as toxinas, a mais tóxica para os seres humanos e pode estar envolvida epidemiologicamente, com câncer de fígado humano em algumas partes do mundo, como na China e África, agindo sinergicamente com o vírus da hepatite B³⁻⁵.

No Brasil, a incidência de aflatoxinas em amendoim e produtos de amendoim, continua a ser grande problema, embora a extensão e os níveis estejam situados em patamares inferiores aos relatados no período de 1965 a 2000⁶⁻⁸.

Vários métodos de preservação têm sido descritos para impedir o crescimento de fungos e produção de aflatoxinas, tais como fumigação, amônia, luz ultravioleta, tratamento pelo calor, solventes químicos, mas nenhum desses métodos oferece completo controle dos fungos toxigênicos e das micotoxinas. Além do mais, efeitos nocivos à saúde humana e ao meio ambiente, associados aos resíduos, limitam a aplicação química em grande extensão. Conseqüentemente, irradiação ionizante por meio de uma fonte de ⁶⁰Co, também chamada de esterilização a frio, tem sido investigada como processo alternativo para a preservação de alimentos⁹⁻¹².

No Brasil, a legislação que trata do emprego da irradiação em alimentos é a Resolução RDC N.º 21, de 26 de janeiro de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. As doses a serem aplicadas devem ser compatíveis com os efeitos desejados, não tendo a legislação fixado valores mínimos ou máximos¹³.

O propósito da presente investigação foi verificar o grau de contaminação e a produção de aflatoxina B₁, por uma cepa aflatoxigênica, em amendoim em grão: (1) previamente irradiado com ⁶⁰Co e (2) previamente inoculado, seguido de tratamento com irradiação gama em diferentes níveis.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

Foram utilizadas amostras de amendoim em grão *in natura* (4-6 kg), enviadas pela Santa Helena Indústria de Alimentos S. A. (Ribeirão Preto - São Paulo), cultivar Tatu Vermelho, das safras de 2001/2002 e 2002/2003, onde não foram detectadas aflatoxinas.

Fungo aflatoxigênico

Foi utilizada uma cepa de *Aspergillus flavus* IMI 190443, proveniente do International Mycological Institute (Inglaterra), isolada de pistache da Turquia, forte produtora de aflatoxina B₁.

Preparação da suspensão de esporos do fungo aflatoxigênico

A cepa de *Aspergillus flavus* foi inoculada em placa de Petri contendo o meio de Czapek (nitrato de sódio 4%, cloreto de potássio 1%, sulfato de magnésio 7H₂O 1%, sulfato ferroso 7H₂O 0,02%, fosfato de potássio dibásico 2%, sacarose 3%, sulfato de zinco 7H₂O a 1% 0,1 mL, sulfato de cobre a 0,5% 0,1 mL, ágar 2%) e incubada por 7 dias à 25°C. Após esporulação, uma alçada de esporos foi transferida para um tubo de Eppendorf, contendo aproximadamente 1,5 mL de Tween 80 a 0,1%, com posterior agitação por 1 minuto para dispersão dos esporos. Foi transferido então, 200 µL desta suspensão para Erlenmeyer de 250 mL, contendo 25 mL do meio GYEP (glicose 2%, extrato de levedura 0,3% e peptona 1%) solidificado. Seguiu-se incubação à 25°C por 7 dias para esporulação. Após esse tempo, foi adicionado 20 mL de Tween 80 0,1% no frasco e 10 pérolas de vidro, agitando-se gentilmente e transferindo-se o sobrenadante para um outro Erlenmeyer. O número de esporos.ml⁻¹ da suspensão foi calculado em câmara de Neubauer e ajustado para 10⁴ e 10⁶ esporos.ml⁻¹.

Plaqueamento direto

Os grãos de amendoim foram desinfetados externamente, por imersão, em uma solução de hipoclorito de sódio a 0,4%, por 2 minutos. Em seguida, em duplicata, foram distribuídos 5 grãos/placa em um total de 6 placas, contendo o meio de cultivo Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol (DRBC). Seguiu-se incubação a 25°C durante 5 dias, e então foi observado o crescimento visual fúngico. Os resultados foram expressos em percentagem de infecção interna¹⁴.

Processo de irradiação

O processo de irradiação foi conduzido e executado no Laboratório de Irradiação Gama do Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear - CDTN/MG. A taxa de dose foi ao redor de 6,0 kGy.h⁻¹.

Extração e quantificação de aflatoxina B₁

A extração da aflatoxina B₁ das amostras e a purificação dos extratos foram feitas segundo o método descrito por Valente Soares e Rodriguez-Amaya¹⁵. Posteriormente, a aflatoxina B₁ foi separada, identificada e quantificada por cromatografia em camada delgada (CCD), em placas de sílica gel 60G, 20 x 20 cm (Merck), sem indicador fluorescente, 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), recomendada por Gimeno¹⁶. Os extratos das amostras para CCD foram ressuspensos em benzeno:acetonitrila (98:2), em volumes que variavam de 100 a 5000 µl. Para aplicação na placa

de cromatografia de camada delgada foram utilizados volumes que variaram de 2 a 10 µL. Para a elaboração da curva de calibração da aflatoxina B₁, foram utilizados volumes de 2 a 10 µL da solução padrão, de concentração de 0,88 µg.mL⁻¹, sempre com um mínimo de 4 pontos. A quantificação da aflatoxina B₁ foi feita através das medidas das intensidades das fluorescências dos spots das amostras e de padrões, em densitômetro Shimadzu, modelo CS9301PC, com lâmpada de xenônio, em leitura linear, feixe 0,4 x 5,0 mm e com alta sensibilidade de fluorescência. Os teores de aflatoxina B₁ nas amostras foram calculados a partir das áreas dos picos das aflatoxinas dos extratos das amostras e da solução padrão de aflatoxina B₁. Boa linearidade (r² > 0,99) foi obtida entre fluorescência emitida e concentração de aflatoxina B₁ na faixa de 0,88 a 8,88 ng. Os limites de detecção e quantificação foram 0,90 µg.kg⁻¹ e 1,1 µg.kg⁻¹, respectivamente.

A concentração exata da solução padrão de aflatoxina B₁ foi determinada em espectrofotômetro Shimadzu UV-1601 PC, Shimadzu Scientific Instrument, Japan¹⁷.

Procedimento para verificação da produção de aflatoxina B₁ em amostras irradiadas e posteriormente inoculadas com *A.flavus* IMI 190443

A partir de amostras de amendoim em grão (200 g), irradiadas com 0, 1,0, 2,0, 3,0, 5,0 e 10,0 kGy, foram pesados 15 g em Erlenmeyer de 125 ml que foram inoculadas com 5 mL da suspensão de esporos de *A.flavus* IMI 190443 10⁴ esporos.mL⁻¹. Em seguida, incubou-se a 25°C durante 7 dias e quantificou-se a aflatoxina B₁. Com amostras da safra 2001/2002, o procedimento foi realizado em triplicata para cada nível de irradiação. Com amostras da safra 2002/2003 foram realizadas 6 repetições.

Procedimento para verificação da produção de aflatoxina B₁ e porcentagem de infecção fúngica em amendoim inoculado e posteriormente irradiado

Neste experimento foram seguidos dois procedimentos para atender os objetivos propostos.

Determinação da porcentagem fúngica

Foram distribuídos em frascos Erlenmeyer de 500 mL, 45 g de amendoim *in natura* e 15 mL de uma suspensão de esporos de *A.flavus* IMI 190443 10⁶ esporos.mL⁻¹. Após equilíbrio a 4°C por uma noite, realizou-se o processo de irradiação nos níveis de 0, 0,3, 0,5, 1,0, 3,0, 5,0 e 10,0 kGy. Esse procedimento foi realizado em duplicata. Em seguida, realizou-se o processo de desinfecção e o plaqueamento direto.

Paralelamente, foi efetuada, também em duplicata, a porcentagem fúngica da amostra *in natura* (sem inoculação e sem irradiação) e da amostra inoculada nas mesmas condições das anteriores, mas sem irradiação com ⁶⁰Co.

Este procedimento foi repetido, com a mesma amostra, alterando apenas os níveis de irradiação para 0, 15, 20, 25 e 30 kGy.

Determinação da aflatoxina B₁

Foram distribuídos em frascos Erlenmeyer de 125 mL, 15 g de grãos de amendoim e 5 mL de uma suspensão de esporos de *A.flavus* IMI 190443 10⁶ esporos.mL⁻¹. Após equilíbrio a 4°C por uma noite, realizou-se o processo de irradiação nos níveis de 0, 0,3, 0,5, 1,0, 3,0, 5,0 e 10,0 kGy. Em seguida, procedeu-se a incubação a 25°C por 7 dias e realizou-se a quantificação da aflatoxina B₁. Este procedimento foi realizado em triplicata.

Paralelamente, foi realizado um branco (sem inoculação e sem irradiação) e um controle (sem irradiação, mas com inoculação), nas mesmas condições descritas anteriormente.

Este procedimento também foi repetido, com a mesma amostra, alterando apenas os níveis de irradiação para 0, 15, 20, 25 e 30 kGy.

Análise estatística

Na situação em que foi possível a análise via o teste F e os resultados foram significativos, foi utilizado o teste de Tukey para determinar as diferenças entre as médias em nível de significância de 5%. Para comparar tratamentos no caso em que a significância foi detectada pelo teste Kruskal-Wallis, executou-se comparação múltipla do próprio teste. Foram utilizados os recursos do software estatístico SAS^{17,18}.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Produção de aflatoxina B₁ em amostras irradiadas e posteriormente inoculadas com *A.flavus* IMI 190443

Os teores de aflatoxina B₁ produzidos pelo *Aspergillus flavus* IMI 190443, em amostras previamente irradiadas, são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1. Teores de aflatoxina B₁ em amendoim em grão, irradiado com ⁶⁰Co (0, 1, 2, 3, 5 e 10 kGy) e inoculado com *Aspergillus flavus* IMI 190443, em concentração de 10⁴ esporos.mL⁻¹ e incubado a 25°C durante 7 dias.

Dose de Irradiação (kGy)	SAFRA	
	2001/2002	2002/2003
	Aflatoxina B ₁ (µg.kg ⁻¹)*	Aflatoxina B ₁ (µg.kg ⁻¹)**
0	689,3a	740,0a
1	832,0a	551,0a
2	1427,0a	1480,0b
3	2933,0b	1689,0b
5	4931,0b	4011,0c
10	18022,0c	5353,0c

* Média de 3 repetições. ** Média de 6 repetições
Médias seguidas da mesma letra na vertical, não diferem entre si pelo Teste de Tukey, em 5% de significância.

Observa-se que a produção de aflatoxina B₁ aumentou de 689,3 µg.kg⁻¹ e 740,0 µg.kg⁻¹ (amostras não irradiadas) para 18022 µg.kg⁻¹ e 5353 µg.kg⁻¹ (irradiadas com 10 kGy), safras 2001/2002 e 2002/2003, respectivamente. Esses dados estão consistentes com os obtidos por Hassan e Aziz²⁰, onde após irradiação de milho com 2,0 kGy e inoculação com *Aspergillus flavus* EA-81 (10⁵ esporos.mL⁻¹), o teor de aflatoxina da amostra irradiada e inoculada (35600 µg.kg⁻¹) foi superior ao da amostra não irradiada e inoculada (22800 µg.kg⁻¹).

O aumento do teor de aflatoxina pode ser explicado por dois possíveis mecanismos: (i) a irradiação afeta alguns constituintes do grão, tornando-o mais disponível ao fungo; (ii) a irradiação elimina ou reduz alguma microbiota natural que competiria com o fungo, resultando em melhor crescimento e produção de aflatoxina pelo *Aspergillus spp*²⁰.

Esses resultados sugerem que os cuidados de controle da umidade relativa e da umidade dos grãos de amendoim irradiados, parâmetros importantes no processo de formação de toxinas, devem ser eficientes, a fim de se evitar contaminação

posterior com fungos aflatoxigênicos e produção de níveis elevados de aflatoxina.

Produção de aflatoxina B₁ em amostras inoculadas com *A.flavus* IMI 190443 e posteriormente irradiadas

Os resultados obtidos de porcentagem de infecção fúngica e produção de aflatoxina B₁, em amendoim em grão, inoculado e irradiado, são mostrados nas Tabelas 2 e 3.

A análise estatística referente à porcentagem de infecção após inoculação, irradiação com ⁶⁰Co em diferentes níveis (0,3 a 10 kGy) e incubação por 7 dias a 25°C, foi feita mediante o teste Kruskall-Wallis, cuja probabilidade foi de 0,046. Comparando esse valor com o nível de significância de 0,05, constata-se que há evidências estatísticas de que as médias das amostras diferiram entre si. Analogamente, a análise estatística dos níveis de aflatoxina B₁ (resposta), revelou por meio do teste Kruskall-Wallis probabilidade de 0,026, ou seja, inferior a 0,05. Dessa forma, pelo menos uma dose apresentou-se diferente em relação às demais (Tabela 2).

Tabela 2. Teores de aflatoxina B₁ e porcentagem de infecção fúngica em amendoim, cultivar Tatu Vermelho, após inoculação com *Aspergillus flavus* IMI 190443 (10⁶ esporos.mL⁻¹), irradiação com ⁶⁰Co e incubação a 25°C durante 7 dias. Safra 2002/2003.

Amostra Inoculada e Irradiada (kGy)	Infecção (%)*	Aflatoxina B ₁ (µg.kg ⁻¹)**	Coefficiente de Variação(%)
0	100a	3290d	7,9
0,3	100a	4165d	23,9
0,5	100a	7956bc	10,8
1,0	95a	7659c	2,5
3,0	87b	8871b	19,0
5,0	38bc	9480ab	10,8
10,0	27c	9780a	18,3
<i>In natura</i> (sem irradiação)	22c	ND	—

ND = não detectado.* média de duplicata. ** média de triplicata. — não se aplica

Valores numéricos seguidos com as mesmas letras minúsculas na vertical não diferem entre si em nível de 5% de significância pelo teste Kruskall-Wallis.

Tabela 3. Teores de aflatoxina B₁ e porcentagem de infecção fúngica em amendoim, cultivar Tatu Vermelho, após inoculação com *Aspergillus flavus* IMI 190443 (10⁶ esporos.mL⁻¹), irradiação com ⁶⁰Co e incubação a 25°C durante 7 dias. Safra: 2002/2003.

Amostra Inoculada e Irradiada (kGy)	Infecção (%)*	Aflatoxina B ₁ (µg .kg ⁻¹)**	Coefficiente de Variação (%)
0	100	1112a	29,0
15	1	946a	30,0
20	2	236a	31,0
25	0	ND	—
30	0	ND	—

ND : não detectado.* média de duplicata. ** média de triplicata. — : não se aplica

Valores numéricos seguidos com as mesmas letras minúsculas na vertical, não diferem entre si em nível de 5% de significância pelo teste Kruskall-Wallis.

A análise estatística referente aos níveis de aflatoxina B₁ após inoculação, seguido de irradiação em cinco níveis (0, 15, 20, 25 e 30 kGy) e incubação por 7 dias a 25°C, foi feita mediante o teste Kruskal-Wallis. Conforme se pode verificar pela Tabela 3, a resposta obtida para os níveis de aflatoxina B₁ foi nula para altas dosagens (25 e 30 kGy). Com base nos valores não nulos obtidos, foi determinada a probabilidade (p=0,061), superior ao nível de significância estabelecido em 5%. Constatou-se então, que não há evidências estatísticas de diferença significativa entre as dosagens avaliadas: 0, 15 e 20 kGy.

Observa-se que os níveis de aflatoxina B₁, nas amostras inoculadas e irradiadas com doses de 0,3 a 10,0 kGy, 4165 e 9780 µg.kg⁻¹, respectivamente, (Tabela 2) foram superiores quando comparados ao nível encontrado na amostra inoculada sem irradiação (3290 µg.kg⁻¹), atingindo cerca de 300% de aumento com a dose de 10 kGy. Entretanto, em doses de 15,0 a 30,0 kGy, verificou-se redução do teor de aflatoxina B₁ (1112 µg.kg⁻¹), encontrado na amostra inoculada não irradiada, para valores inferiores ao limite de detecção do método empregado (0,9 µg.kg⁻¹), ou seja, não detectado, como nas amostras inoculadas e irradiadas com doses de 25,0 e 30,0 kGy. Nota-se também, em elevadas doses de irradiação, uma correspondência inversa entre níveis de aflatoxina B₁ e infecção fúngica, ou seja, quanto maior a dose de irradiação menor a viabilidade fúngica e menores níveis de aflatoxina foram produzidos por *Aspergillus flavus* IMI 190443. O aumento dos níveis de aflatoxina B₁ nas amostras irradiadas com doses de 0,3 a 10,0 kGy, pode ser explicado pela resistência parcial do *Aspergillus flavus* à irradiação, pela gradativa destruição da microbiota competidora natural e maior disponibilidade do substrato ao fungo^{20,21}. A partir de doses de irradiação mais elevadas, superior a 15 kGy, cessa a resistência natural e a viabilidade dos esporos fúngicos, diminuindo a produção de aflatoxina B₁.

Chiou et al.¹¹ observaram que após inoculação de amendoim *in natura*, variedade Tainam 9, com *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999, em concentração não especificada, seguido de irradiação com ⁶⁰Co em doses de 0, 2,5, 5,0, 7,5, 10,0 e 15,0 kGy, e incubação durante 4 semanas a 30°C, os níveis de aflatoxina B₁ foram menores quando comparado ao controle não irradiado e inoculado: de 18630 µg.kg⁻¹ para 12620 µg.kg⁻¹ (5,0 kGy); 7770 µg.kg⁻¹ (7,5 kGy); 4280 µg.kg⁻¹ (10,0 kGy) e 2570 µg.kg⁻¹ (15,0 kGy). Grãos de amendoim com intenso grau de infecção foram também observados. Estes resultados estão parcialmente consistentes com os obtidos nesta pesquisa, visto que completa destruição dos conídios pela irradiação gama, mesmo a 15,0 kGy, não foi alcançada. Por outro lado, diferentemente dos nossos resultados, foi observada uma diminuição da produção de aflatoxina B₁ em função da dose de irradiação gama aplicada. Parece que o tipo da espécie fúngica envolvida (*A.flavus* e *A.parasiticus*), condições de inoculação e incubação, umidade, tamanho do inóculo, afetam o crescimento fúngico e a produção de toxina, e podem explicar essa diferença na produção de aflatoxina

B₁ em função da dose aplicada^{10,22}. Ainda existe a possibilidade, segundo Doyle e Marth (1978) citados por Farkas²³, de variação na decomposição da micotoxina por culturas de micélio, durante prolongado tempo de incubação. Neste trabalho, a quantificação da aflatoxina B₁ foi executada após 7 dias de incubação a 25°C, diferentemente do armazenamento a 30°C durante 4 semanas, efetuado por Chiou et al.¹¹.

Farang et al.¹² verificaram também resistência de esporos de *Aspergillus flavus* NRRL 3145, em concentração não especificada, após inoculação em amendoim, previamente esterilizado a 121°C durante 15 minutos e irradiação a 5,0, 10,0 e 20,0 kGy. Da mesma forma, a produção de aflatoxina B₁ estava presente mesmo após uma dose de 20,0 kGy.

CONCLUSÕES

Contaminação de grãos de amendoim previamente irradiados, com cepa aflatoxigênica, pode aumentar a produção de aflatoxinas.

Irradiação gama (⁶⁰Co) não é totalmente efetiva para destruir esporos fúngicos, a menos que doses elevadas sejam empregadas (25 e 30 kGy).

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. 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.
2. Pepeljnjak S, Slobodnjak Z, Segvic M, Peraica M, Pavlovic M. The ability of fungal isolates from human lung aspergilloma to produce mycotoxins. *Human Exper Toxicol* 2004; 23: 15-9.
3. Council for Agricultural Science and Technology [CAST]. Mycotoxins: Economics and Health Risks. Ames, Iowa: Council for Agricultural Science and Technology. Task Force Report 139, 2003.
4. Moss MO. Mycotoxins. *Mycol Res* 1996; 100: 513-23.
5. Wild CP, Hall AJ. Primary prevention of hepatocellular in developing countries. *Mutat Res* 2000; 462: 381-93.
6. Oliveira MS, Prado G, Abrantes FM, Santos LG, Veloso T. Incidência de aflatoxinas, desoxinivalenol e zearalenona em produtos comercializados em cidades do estado de Minas Gerais no período de 1998 - 2000. *Rev Inst Adolfo Lutz* 2002; 61: 1-6.
7. Rodriguez-Amaya DB, Sabino M. Mycotoxin research in Brazil: The last decade in review. *Braz J Microbiol* 2002; 33: 1-14.
8. Sabino M, Rodriguez-Amaya DB. Mycotoxin research in Brazil. *Ciênc Cult* 1993; 45: 359-71.
9. Aziz NH, Attia ESA, Farag SA. Effect of gamma-irradiation on the natural occurrence of *Fusarium* mycotoxins in wheat, flour and bread. *Nahrung* 1997; 41: 41-7.

10. Aziz NH, El-Zeany AS, Moussa AA. Influence of ³-irradiation and maize lipids on the production of aflatoxin B₁ by *Aspergillus flavus*. *Nahrung* 2002; 46: 327-31.
11. 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.
12. Farag RS, Rashed MM, Hussein AA, Abo-Hagar A. Effect of gamma irradiation on the infected yellow corn and peanuts by *Aspergillus flavus*. *Chem Mikrob Technol Lebensm* 1995; 17: 93-8.
13. Brasil. (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Resolução nº 21, de 26 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento para irradiação de alimentos. Publicada no Diário Oficial da União de 29 de janeiro de 2001.
14. Pitt JI, Hocking AD. Methods for isolation, enumeration and identification. In: *Fungi and food spoilage*. 2nd ed. Gaithersburg: Aspen Pub. Inc; 1999. p. 21-57.
15. 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.
16. 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.
17. Association of Official Analytical Chemists. *Official Methods of the AOAC International*. 16^a edição. 3^a revisão. Gaithersburg: AOAC International, 1997.
18. Sampaio MBI. *Estatística aplicada à experimentação animal*. 1^a edição, Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia; 1998. 221p.
19. SAS Institute. *Users guide: statistics*. 1989-1996. Version 6.11. System for Windows. Edition. Cary North Carolina; 1996.
20. Hassan AA, Aziz NH. Influence of moisture content and storage temperature on the production of aflatoxin by *Aspergillus flavus* EA-81 in maize after exposure to gamma radiation. *J Food Saf* 1998; 18: 159-71.
21. Chelack WS, Borsa J, Marquardt RR, Frohlich AA. Role of the competitive microbial flora in the radiation-induced enhancement of ochratoxin production by *Aspergillus alutaceus* var. *alutaceus* NRRL 3174. *Appl Environ Microbiol* 1991; 57: 2492-6.
22. Schindler AF, Abadie NA, Simpson RE. Enhanced aflatoxin production by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* after gamma irradiation of the spore inoculum. *J Food Prot* 1980; 43: 7-9
23. Farkas J. Microbiological safety of irradiated foods. *Int J Food Microbiol* 1989; 9: 1-15.

Incidência de fungos e micotoxinas em grãos de milho armazenados sob diferentes condições

Incidence of fungi and mycotoxins in stored corn under different conditions

RIALA6/1022

Vanessa PEZZINI¹; Eunice VALDUGA¹; Rogério Luis CANSIANI*

* Endereço para correspondência: 1 Departamento de Engenharia de Alimentos – URI – Campus de Erechim, Av. Sete de Setembro, 1621, Erechim, 99700-000, RS, Brasil, fone:(0xx)54.520.9000, ramal: 9170, Fax:(0xx)54.520.9090 e-mail: cansian@uricer.edu.br.

Recebido: 21/02/2005 – Aceito para publicação: 21/06/2005.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi identificar, quantificar e avaliar a ocorrência de fungos e verificar a incidência de micotoxinas (aflatoxinas e zearalenona) em grãos de milho armazenados por um período de cinco meses, sob diferentes condições (com e sem controle de temperatura e aeração). Isolaram-se e identificaram-se os fungos *Aspergillus flavus*, *Fusarium roseum*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium graminearum* e *Penicillium* sp presentes nos grãos de milho. Os fungos *A. flavus*, *F. roseum* e *Penicillium* sp apresentaram variação de crescimento de 30 a 98 %, de 3 a 30 % e de 34 a 90 %, respectivamente. A diferença no crescimento dos fungos não foi causada pela umidade, pois em ambos os silos foi inferior a 12 %. Os principais fatores que influenciaram no crescimento possivelmente estejam relacionados à temperatura associada à aeração, pois se verificou maior crescimento no silo sem controle de temperatura e aeração, uma vez que os grãos armazenados nos dois silos foram colhidos na mesma época e de uma única região, portanto sujeitas às mesmas variações ambientais. A micotoxina detectada no silo A (aflatoxina B₁) já se encontrava presente nos grãos no início do armazenamento, mantendo-se nos mesmos limites de detecção ao final do período de armazenamento.

Palavras-Chave. milho em grão, condições de armazenamento, fungos, micotoxinas, aflatoxinas, zearalenona.

ABSTRACT

The aim of this work was to perform the identification, quantification, and investigation of the incidence of fungi in corn grain samples submitted to two different conditions (with or without control of temperature and of aeration) for a period of five months. Occurrence of mycotoxins (aflatoxins and zearalenone) was also studied. The following fungi were isolated and identified: *Aspergillus flavus*, *Fusarium roseum*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium graminearum*, and *Penicillium* sp. The fungi *A. flavus*, *F. roseum*, and *Penicillium* sp presented variation in growing on the grains of 30 - 98 %, 3 - 30 %, and 34 - 90 %, respectively; and the a highest fungus growth was verified in corn grain samples without environment control. The difference verified in observe on fungi growth could not attributed to grain humidity, since the moisture analysis revealed a content inferior to 12 % in both samples. The factors that mostly influenced on the growth might be the temperature associated with aeration, since the grains stored in both silos were harvested at the same period of the year at the same region, thus they were submitted to the same environmental conditions. The mycotoxin detected in silo A (aflatoxin B₁) was already present in grain before being stored, and the aflatoxin concentration was at same levels until the end of storage period.

Key Words. corn, storage, fungi, mycotoxins, aflatoxins, zearalenone.

INTRODUÇÃO

Os fatores que afetam o crescimento de fungos nos grãos de milho são principalmente teor de umidade dos grãos, temperatura, tempo, condição física (grãos quebrados) e sanitária do grão, nível de inóculo do fungo, conteúdo de oxigênio e armazenamento, insetos e ácaros. A invasão de um lote de grãos por insetos pode iniciar ou agravar o desenvolvimento de fungos, pois através de sua atividade metabólica há um aumento de teor de umidade e temperatura da massa dos grãos^{1,2}.

Os fungos que invadem sementes e grãos em geral são os que infectam o produto ainda no campo e os de armazenamento, que invadem o milho pouco antes e durante o armazenamento. A distinção entre fungos de campo e de armazenamento não é baseada na classificação taxonômica, mas de acordo com as condições ambientais e/ou ecológicas que favorecem o crescimento dos mesmos. Também não é absoluta, pois é baseada nos seus hábitos de crescimento e onde os danos ocorrem. Os fungos do campo requerem um teor de umidade em equilíbrio com uma umidade relativa de 90 a 100 % para crescerem. Os principais gêneros são *Cephalosporium*, *Fusarium*, *Gibberella*, *Nigrospora*, *Helminthosporium*, *Alternaria* e *Cladosporium* que invadem grãos e sementes durante o amadurecimento e o dano é causado antes da colheita. Estes fungos não se desenvolvem normalmente durante o armazenamento, exceto em milho armazenado com alto teor de umidade³.

Os fungos de armazenamento *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* e *Mucor* são encontrados em grande número em armazéns, moinhos, silos, moegas, elevadores, equipamentos e lugares onde os produtos agrícolas são armazenados, manuseados e processados. Causam danos ao produto somente se as condições de armazenagem forem impróprias à manutenção da qualidade do produto. Os fungos do gênero *Aspergillus* (*A. halophilicus*, *A. restrictus*, *A. glaucus*, *A. candidus*, *A. alutaceus* e *A. flavus*) e os do gênero *Penicillium* (*P. viridicatum*, *P. verrucosum*) são os indicadores de deterioração em sementes e grãos causando danos no germe, descoloração, alterações nutricionais, perda de matéria seca e os primeiros estágios da deterioração microbiológica². Porém estes fungos podem invadir os grãos de milho ainda no campo, causando inclusive várias doenças, como a podridão de sementes e do colmo^{4,5}. Interferências climáticas foram relacionadas com a predominância de linhagens toxigênicas⁶.

As micotoxinas, dentre elas as aflatoxinas e zearalenona, são compostos tóxicos produzidos por fungos, que podem causar danos à saúde de homens e animais⁷, bem como ocasionar grandes perdas econômicas. As aflatoxinas são produtos do metabolismo secundário de fungos, predominantemente de *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius*, sendo as aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ as mais conhecidas. A zearalenona é produzida por várias espécies de *Fusarium*, com ocorrência em milho, cevada, trigo e aveia⁸.

Os trabalhos de ocorrência de fungos e micotoxinas em alimentos consumidos no Brasil, têm contribuído para avaliação e estudos das medidas a serem tomadas para prevenção de contaminação. Incidência de aflatoxinas em derivados de milho e zearalenona em milho, têm sido relatadas^{9,10,11,12,13}.

O presente trabalho teve por objetivo identificar, quantificar e avaliar a ocorrência de fungos, bem como verificar a incidência de micotoxinas (aflatoxina e zearalenona) em grãos de milho, armazenados sob diferentes condições.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

Acompanhou-se dois silos de armazenamento de grãos de milho, um na cidade de Erebang/RS (Silo A) com temperatura de 13 a 14 °C e aeração controlada (0,05 m³.min⁻¹.ton⁻¹) e outro na cidade de Getúlio Vargas/RS (Silo B) sem controle, apenas com secagem dos grãos e mantido a temperatura ambiente (20 ± 5 °C). O período de coleta das amostras foi de 12 de maio a 03 de setembro de 2003, correspondendo aos 0, 30, 50, 62, 74, 92 e 113 dias de armazenamento. Para as análises de micotoxinas, efetuou-se duas amostragens de cada silo, aos 0 e 113 dias de armazenamento, respectivamente.

Amostragens representativas dos silos (cinco pontos) foram coletadas com o auxílio de um calador. As amostras foram homogeneizadas, divididas em frações de 1,0 Kg, acondicionadas em frascos plásticos codificados e enviadas ao laboratório para análises de umidade, identificação e quantificação de fungos e de micotoxinas (aflatoxinas e zearalenona). Para a identificação e quantificação dos fungos foram utilizados os grãos de milho inteiros e para as demais determinações as amostras foram moídas, classificadas por tamanho de partícula em peneira 20 mesh (0,84 mm), submetidas ao quarteamento e analisadas em triplicata.

Determinação de Umidade

A análise de umidade foi realizada em aparelho higrométrico (controle *in loco*) e pelo método de dessecação em estufa com ar circulante a 105 °C¹⁴.

Isolamento e Identificação Fúngica

Para semeadura dos grãos de milho foi utilizado o método adotado por Christensen e Meronuck¹⁵, modificado. Plaquearam-se 100 grãos por amostragem em triplicata, em meio de cultura Agar Batata Dextrose (PDA) acidificada com ácido tartárico a 10 % e incubou-se em estufa a 25°C com iluminação por 5 dias.

A identificação e quantificação dos fungos foram realizadas com o auxílio de microscópio estereoscópico, onde se quantificou em percentual de crescimento, considerando-se a presença ou ausência em 100 grãos de milho. Foram pesquisados os fungos *Aspergillus flavus*, *Fusarium moniliforme*, *F. roseum*, *F. graminearum* e *Penicillium sp* pelas

suas estruturas reprodutivas e acompanhou-se o desenvolvimento no decorrer do armazenamento¹⁶.

Os dados de quantificação dos fungos foram tratados estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,01$), com uso do software Statistica 5.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA).

Detecção e Quantificação de Micotoxinas

A extração e purificação das aflatoxinas (B_1 , B_2 , G_1 e G_2) foi feita segundo Soares e Rodriguez-Amaya¹⁷. As aflatoxinas foram identificadas e quantificadas por cromatografia em camada delgada (placas de sílica gel 60 G, Merck), utilizando-se como fase móvel tolueno:acetato de etila:clorofórmio:ácido fórmico (70:50:50:20 v/v/v/v), descrita por Gimeno¹⁸. As leituras das fluorescências de amostra e padrões foram feitas em densitômetro, a 366 nm e o cálculo das concentrações foi obtido através das curvas de calibração. A Curva das aflatoxinas (AF) foi realizada com os seguintes valores: AFB1 = 1,196 $\mu\text{g/mL}$; AFB2 = 0,96 $\mu\text{g/mL}$; AFG1 = 1,71 $\mu\text{g/mL}$ e AFG2 = 1,43 $\mu\text{g/mL}$. Essas concentrações foram aplicadas nas quantidades de 1,0 μL ; 2,0 μL e 4 μL com três repetições.

A zearalenona foi extraída e quantificada segundo procedimentos descritos por Visconti e Pascale¹⁹. A quantificação foi realizada em cromatógrafo líquido de alta eficiência com detector de fluorescência (SHIMADZU, modelo LC 10AD, excitação $\lambda = 276$ nm e emissão $\lambda = 460$ nm), coluna Agilent Zorbax C18 (5 μm , 250 x 4,6 mm), pré-coluna Agilent Zorbax C18 (5 μm , 25 mm x 4,6 mm), com fluxo de 1 mL/minuto. A fase móvel foi composta por água ácida (2 % de ácido acético, v/v):metanol (50:50, v/v) e injeção de 50 μL de amostra. A zearalenona foi quantificada utilizando para o cálculo, uma curva de calibração analítica. A curva da zearalenona foi feita com padrão contendo as concentrações de 1,75; 2,5; 5,0; 10,0 e 15,0 $\mu\text{L/mL}$. As amostras foram aplicadas em triplicata para confecção da curva.

Os limites de detecção de aflatoxinas considerados foram de 1,0 $\mu\text{g/Kg}$ (85,5 % de recuperação) e para a zearalenona de 10,0 $\mu\text{g/Kg}$ (80 % de recuperação).

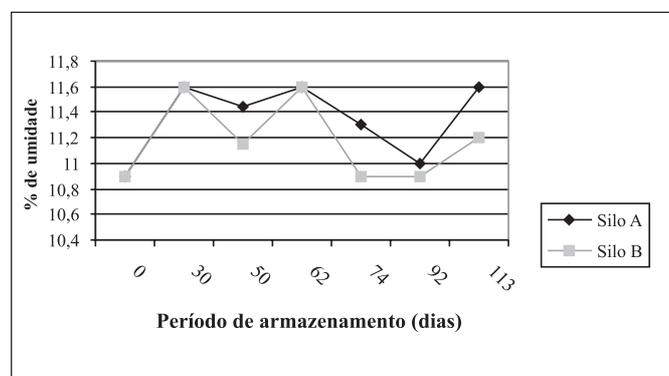


Figura 1. Teor de umidade (%) nos silos A e B em diferentes períodos de armazenamento.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 apresenta o teor de umidade (%) nos silos A e B, em diferentes períodos de armazenagem.

Observou-se que inicialmente a umidade apresentava-se com teores baixos (10,9 a 11,6 %, em ambos os silos), mantendo-se nestes níveis no período de armazenamento (113 dias). As diferenças observadas nos métodos de determinação da umidade pelo sistema higrométrico e secagem em estufa a 105 °C foram considerados desprezíveis, sendo o primeiro normalmente utilizado como método rápido de controle *in loco* nos silos.

Recomenda-se para o milho, teores de umidade na colheita de 24 a 32 % e no armazenamento de 13 a 14 % (sem risco de deterioração por um ano) e de 12 % por um período superior a 1 ano. Os fungos necessitam de uma umidade relativa de, pelo menos, 65 % o que corresponde a uma taxa de equilíbrio de umidade de 13 % no grão de cereal e eles crescem com temperaturas entre 10 e 40°C³.

As Figuras 2, 3 e 4 apresentam o crescimento (%) dos fungos *A. flavus*, *F. roseum* e *Penicillium sp* em amostras de grãos de milho nos silos A e B durante o período de armazenamento, respectivamente.

O *A. flavus* (Figura 2) apresentou variação de 30 a 98 % de crescimento, sendo que as médias do silo A diferem estatisticamente ($p < 0,01$) em relação ao silo B nos períodos de armazenamento, o que também é válido para a média global (38,71 \pm 8,73 no silo A e 76,85 \pm 14,78 no silo B). Sendo concordante com os resultados obtidos por Rosseto et al.²⁰ em grãos de amendoim armazenados, os quais constataram que, independentemente da amostragem, não houve diferença de porcentagem de espécies do grupo *A. flavus* nas avaliações realizadas aos 12 e 18 meses de armazenamento.

Alguns trabalhos com grãos de milho armazenados e subprodutos alimentícios mostram a presença de *Aspergillus sp* como o maior contaminante destes produtos^{1,21,22} ainda que em outros trabalhos a maior incidência tenha sido de

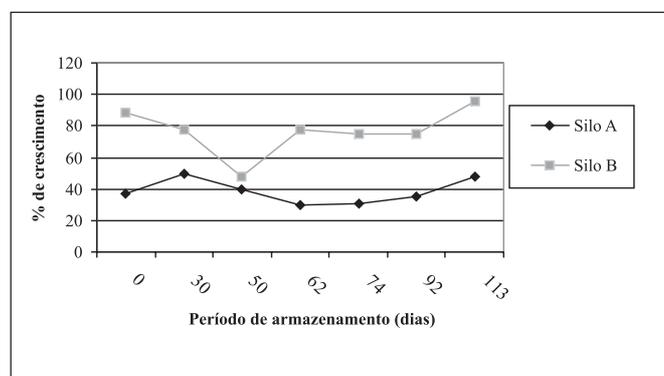


Figura 2. Crescimento (%) de *A. flavus* em amostras de milho, nos silos A e B em diferentes períodos de armazenamento.

Fusarium^{3,4,12,23-26}. Muitas das amostras contaminadas por fungos do gênero *Aspergillus* estavam também contaminadas por insetos. Uma população de insetos dentro da massa de grãos, se não for controlada a tempo, pode criar condições de umidade e temperatura localizadas que estimulem o rápido desenvolvimento fúngico, podendo ocorrer deterioração da massa de grãos e produção de micotoxinas^{27,28}.

De acordo com a Figura 3 pode-se notar que a variação de desenvolvimento do *F. roseum* foi menor, de 3 a 30 %, sendo que o máximo de crescimento foi observado aos 92 dias de armazenamento no silo B. A análise de comparação de médias (teste de Tukey) demonstrou que o silo A difere ($p < 0,01$) do silo B, após 92 dias de armazenamento. Embora as médias globais entre os dois silos apresentem diferenças significativas ($p < 0,01$), com teores de $11,7 \pm 6,43$ para o silo A e $16,8 \pm 8,17$ para o silo B, respectivamente.

O *Fusarium* é considerado um fungo de campo, que invade os grãos e sementes durante o amadurecimento e o dano é causado antes da colheita. Entretanto, não se desenvolvem durante o armazenamento, exceto ocasionalmente em grãos de milho armazenados com alto teor de umidade e/ou que foram rehidratados^{3,4}. Os baixos teores de *Fusarium*, em ambos os silos, podem estar relacionados ao fato de que a temperatura de armazenamento manteve-se inferior a 25°C, mas apresentando influência do período de armazenamento. Em grãos de amendoim armazenados, também foi verificado um aumento na incidência de *Fusarium* sp em relação ao período de armazenamento²⁰.

Marcia e Lazzari³ encontraram 97,5 % das amostras de milho em grão, 13,6 % das amostras de grits e 79 % das amostras de fubá infectadas por *Fusarium*, sendo a espécie predominante *F. moniliforme*. Porém no estudo *F. moniliforme* e *F. graminearum* não foram detectados nas amostras de grãos de milho.

Conforme a Figura 4, pode-se observar que o desenvolvimento do *Penicillium* sp demonstrou-se semelhante nos dois silos até os 62 dias de armazenamento. Porém, após

este período o crescimento foi superior no silo B, com diferenças significativas ($p < 0,01$) a partir do 74 dias e atingindo 90 % das amostras aos 113 dias de armazenamento. Enquanto que no silo A, os teores foram de aproximadamente 60 %, embora as médias globais entre os dois silos não apresentem diferenças significativas ($57,4 \% \pm 10,1$ para o silo A e $65,0 \% \pm 17,94$ para o silo B).

As variações na incidência fúngica em relação ao período de armazenamento podem ter ocorrido por diferenças de umidade relativa do ar²⁹, associado à competição dos fungos por substrato^{20,30}.

As diferenças no crescimento dos fungos (*Aspergillus* sp, *Fusarium*, *Penicillium*) não foram causadas pelo teor de umidade dos grãos, pois a mesma manteve-se com teores estáveis e inferiores a 12 % em ambos os silos (Figura 1). Porém ocorreu uma diferença em relação aos silos A e B, sendo que o menor desenvolvimento dos fungos foi apresentado no silo de A, onde a temperatura (13 a 14°C) e aeração (0,05 m³/min.ton) foram mantidas controladas. Os fungos de armazenamento são sensíveis às mudanças de temperatura, crescendo rapidamente a temperaturas ao redor de 30°C. Quando a temperatura estiver abaixo de 15°C o seu desenvolvimento é bastante reduzido, com exceção do *Penicillium* sp (cresce até -5°C). Ainda, o uso eficiente da aeração é um fator decisivo na boa conservação das sementes e grãos²⁸.

Dos diferentes fatores que podem influenciar no crescimento destes fungos como condições climáticas pré-colheita, diferenças genéticas, índice de grãos quebrados, presença de insetos entre outros^{2,6,31}. A utilização de aeração forçada influencia diretamente na manutenção da uniformidade da temperatura e da umidade relativa do ar, auxiliando na redução de crescimento dos fungos. Diferenças de temperatura dentro da massa de grãos causam a transferência de vapor d'água da porção mais quente para a mais fria que pode condensar e fornecer condições para o desenvolvimento dos fungos²⁸. No silo B, onde não havia controle, diferenças momentâneas de temperatura e de umidade podem ter ocorrido,

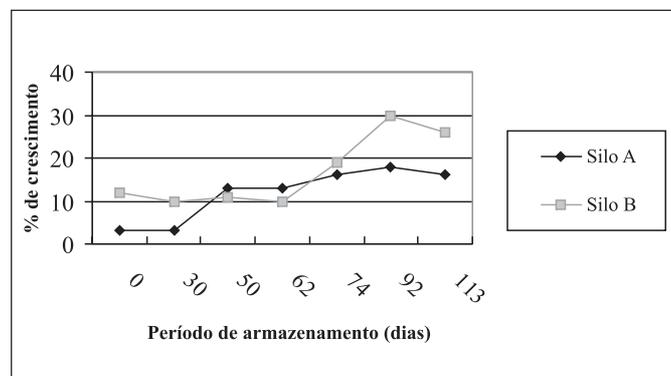


Figura 3. Crescimento (%) de *F. roseum* em amostras de milho dos silos A e B em diferentes períodos de armazenamento.

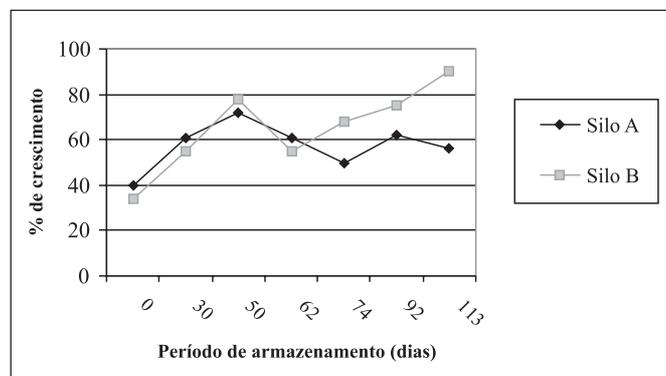


Figura 4. Crescimento (%) de *Penicillium* sp. em amostras de milho dos silos A e B em diferentes períodos de armazenamento.

Tabela 1. Incidência de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ e zearalenona (ZEA) em amostras de milho dos silos A e B em diferentes períodos de armazenamento.

Amostras	Incidência de micotoxinas (µg/kg)				
	Aflatoxina B1	Aflatoxina B2	Aflatoxina G1	Aflatoxina G2	ZEA
Silo A					
0 dia	1,0	ND	ND	ND	ND
113 dias	1,0	ND	ND	ND	ND
Silo B					
0 dia	ND	ND	ND	ND	ND
113 dias	ND	ND	ND	ND	ND

ND: menor que o limite de detecção

Limite de detecção: aflatoxina: 1 µg/kg; zearalenona: 10 µg/kg

ainda que a temperatura ambiente tenha se mantido inferior a 20°C. Embora as temperaturas em ambos os silos tenham ficado abaixo das temperaturas ideais de crescimento dos fungos estudados, quanto menor for a temperatura, menor será o crescimento até um limite de inibição^{28,3}, o que também explica as diferenças de crescimento entre os dois silos de armazenamento.

A incidência de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ e zearalenona (ZEA) em amostras de milho dos silos A e B, em diferentes períodos de armazenamento estão demonstrados na Tabela 1.

Observou-se a presença de aflatoxina B₁ somente no silo A, ainda que em concentração no limite de detecção (1,0 µg/kg), sendo que a mesma manteve a incidência ao final do armazenamento. Indicando que esta micotoxina estava presente nos grãos, no início do armazenamento (0 dia). O limite permitido no Brasil e Mercosul para a somatória das aflatoxinas (B₁ + B₂ + G₁ + G₂) é de 20 µg/kg^{32,33}. O não desenvolvimento das micotoxinas podem ser atribuídas às condições ambientais pouco favoráveis, uma vez que a temperatura ideal para a produção da maioria das micotoxinas é superior a 25°C³⁴ e a possibilidade dos fungos isolados não possuem potencial para a síntese destas^{35,36}.

Diversos trabalhos reportam a incidência de micotoxinas em milho em grão e seus derivados. Nicásio et al.¹⁰ analisaram um total de 40 amostras de milho e não foram encontradas aflatoxinas em nenhuma das amostras, estando estes resultados concordantes com os do presente estudo. Pich³⁷ ao analisar 213 produtos derivados de milho comercializados encontraram 17,4 % das amostras com resultados positivos, com uma faixa de contaminação de 3,2 a 25,6 µg/kg de aflatoxina total (B₁+B₂+G₁+G₂). Furlong et al.⁹ e Oliveira et al.¹¹, estudando zearalenona em produtos derivados de milho, encontraram níveis de contaminação médio de 163,0 µg/kg e entre 4,6 e 195,2 µg/kg, respectivamente. De maneira geral, a ocorrência de aflatoxinas, principalmente em amendoim e seus derivados tem sido um problema alarmante, enquanto que a zearalenona tem-se mantido em níveis mais baixos^{12,26}.

CONCLUSÕES

Os fungos *A. flavus*, *F. roseum*, e *Penicillium* sp, foram isolados e identificados, apresentando uma ampla faixa de variação no crescimento, de 30 a 98 %, de 3 a 30 % e de 34 a 90 %, respectivamente. Constatou-se que os maiores crescimentos ocorreram no silo sem controle de temperatura e aeração. A diferença no crescimento dos fungos não foi causada pela umidade, pois a mesma, em ambos os silos, foi inferior a 12 %. A micotoxina detectada no silo A (aflatoxina B₁) encontrava-se presente nos grãos no início do armazenamento (0 dia), mantendo-se nos mesmos limites de detecção ao final do período de armazenamento (113 dias).

AGRADECIMENTOS

À Secretaria de Ciência e Tecnologia do Estado do Rio Grande do Sul através da FAPERGS e do Pólo de Inovação Tecnológica do Norte do RS, pela concessão de auxílio financeiro à pesquisa.

REFERÊNCIAS

- Hagstrum DW, Flinn PW. Integrated pest management of stored-grain insects. In: Sauer, DB, editor. Storage of cereal grains and their products. St. Paul: American Association of Cereal Chemists. 1992, 607p.
- Malmann CA, Santurio JM, Wentz I. Aflatoxinas – Aspectos clínicos e toxicológicos em suínos. *Ciência Rural* 1994; 24(3):635-43.
- Marcia BA, Lazzari FA. Monitoramento de fungos em milho em grão, grits e fubá. *Ciênc Tecnol Aliment* 1998; 18(4): 363-7.
- Mills JT. Ecology of mycotoxigenic *Fusarium* species on cereal seeds. *J Food Prot* 1989; 52:737-42.
- Pozzi CR, Arcaro JRP, Arcaro Junior I, Fagundes H, Corrêa B. Aspectos relacionados à ocorrência e mecanismo de ação das fumonisinas. *Ciência Rural* 2002;32(5): 901-7.
- Ono EYS, Sugiura Y, Homechin M, Kamogae M, Vizzoni E, Ueno Y, Hirooka EY. Effect of climatic conditions on natural mycoflora and fumonisins in freshly harvested corn of the State of Paraná, Brazil. *Mycopathologia* 1999; 147:139-48.

7. Ueno Y. The toxicology of mycotoxins. *CRC Crit Rev Toxicol* 1985; 14:99-132.
8. Gelli DS, Jakabi M, Porto E. Isolamento de *Aspergillus spp* aflatoxigênicos de produtos alimentícios, São Paulo/SP. *Rev Inst Adolfo Lutz* 1990; 50 (1/2): 329 - 33.
9. Furlong EB, Soares LAS, Vieira AP, Dadalt G. Aflatoxinas, ocratoxina e zearalenona em alimentos da região sul do Rio Grande do Sul. *Rev Inst Adolfo Lutz* 1999; 58: 105-11.
10. Nicácio MAS, Prado G, Linardi VR. Determinação de aflatoxina e identificação da microbiota fúngica em milho (*Zea mays L.*) pós colheita. *Arq Biol Tecnol* 1995; 38:851-7.
11. Oliveira MS, Prado G, Abrantes FM, Santos LG, Veloso T. Incidência de aflatoxinas, desoxinivalenol e zearalenona em produtos comercializados em cidades do estado de Minas Gerais no período de 1998 - 2000. *Rev Inst Adolfo Lutz* 2002; 61(1): 1-6
12. Pozzi CR, Corrêa B, Gambale W, Paula CR, Chacon-Reche NO, Meirelles MCA. Postharvest and stored corn in Brazil: mycoflora interaction, abiotic factors and mycotoxin occurrence. *Food Addit Contam* 1995; 12:313-9.
13. Prado G, Oliveira MS, Ferreira SO. Ocorrência de aflatoxinas em amendoim comercializado na região metropolitana de Belo Horizonte, - MG. In: XVI Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 15-17 julho, 1998. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 1998, CD-ROM, cbcta 108.
14. São Paulo. Instituto Adolfo Lutz. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. v.1: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 3ª ed. São Paulo, 1985. p.125-6.
15. Christensen CM, Meronuck RA, editors. Quality maintenance in stored grains and seeds. Minnesota: University of MN Press, 1986, 150 p.
16. Silveira VD, editor. Micologia. 5 ed. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural, 1981. 332p.
17. Soares LM, Rodriguez-Amaya DB. Survey of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone and sterigmatocystin in Brazilian foods by using multi-toxin layer chromatographic methods. *J Assoc Off Anal Chem* 1989; 73:22-6.
18. 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.
19. Visconti A, Pascale M. Determination of zearalenone in corn by means of immunoaffinity clean-up and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr* 1998; 815:133-40.
20. Rosseto CAV, Silva OF, Araújo AES. Influência da calagem, da época de colheita e da secagem na incidência de fungos e aflatoxinas em grãos de amendoim armazenados. *Ciência Rural* 2005; 35(2):309-15.
21. Abarca ML, Bragulat MR, Castellá G, Cabañes FJ. Mycoflora and aflatoxin - producing strains in animal mixed feeds. *J Food Prot* 1994; 57(3): 256-8.
22. Asevedo IG, Gambale W, Corrêa B, Paula CR, Almeida RMA, Souza VM. Mycoflora and aflatoxigenic species of *Aspergillus spp.* Isolated from stored maize. *Rev Microbiol* 1994; 25(1):46-50.
23. Bottalico A, Logrieco A, Ritieni A, Moretti A, Randazzo G, Corda PA. Beauvericin and fumonisin B1 in preharvest *Fusarium moniliforme* maize ear rot in Sardinia. *Food Addit Contam* 1995; 12(4):599-607.
24. Castro MFP, Soares LMV, Furlani RPZ. Mycoflora, aflatoxigenic species and mycotoxins in freshly harvested corn (*Zea mays L.*): a preliminary study. *Rev Microbiol* 1995; 26(4):289-95.
25. Corda P. Beauvericin and fumonisin B1 in preharvest *Fusarium moniliforme* maize ear rot in Sardinia. *Food Addit Contam* 1995; 12(4):599-607..
26. Rodríguez-Amaya DB, Sabino M. Mycotoxin research in Brazil: The last decade in review. *Braz J Microbiol* 2002; 33:1-11.
27. Blank, G, Goswami N, Madrid F, Marquardt RR, Frohlich AA. Evaluation of *Tribolium castaneum* (herbst) excreta on ochratoxin production in stored wheat. *J Stored Prod. Res* 1995; 31(2): 151-5.
28. Lázari FA, editor. Umidade, fungos e micotoxinas na qualidade de sementes, grãos e rações. Curitiba, Edição do autor, 1993, 140p.
29. Dhingra OD, Coelho Neto RA. Micotoxinas em grãos. *Revisão Anual de Patologia de Plantas* 1998; 6(1):49-101.
30. Gurjão ACO. Qualidade fisiológica, nutricional e sanitária de sementes de amendoim (*Arachis hypogaea L.*) produzidas no semi-árido nordestino. [Dissertação de Mestrado]. João Pessoa, Paraíba: UFPB, 1995.
31. Ramakrishna Y, Ramesh VB, Vasanthi S. Natural occurrence of mycotoxins in staple foods in Índia. *J Agric Food Chem* 1990; 38:1857-9.
32. Brasil. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. Portaria n. 183 de 21 de março de 1996. Regulamento técnico MERCOSUL sobre limites máximos admissíveis no leite, amendoim e milho.
33. Silva LC. Fungos e Micotoxinas em Grãos Armazenados: Universidade Estadual do Oeste do Paraná. 12 jun 2000. [acesso 09 nov 2004]. Disponível em: <http://www.unioeste.br/agais/fungos.html>.
34. Seizi Oga, editor. Fundamentos de toxicologia. São Paulo: Ed. Atheneu, 1996. p. 463-71.
35. Farias AX, Robbs CF, Bittencourt AM, Andersen PM, Corrêa TBS. Contaminação endógena por *Aspergillus spp.* em milho pós-colheita no Estado do Paraná. *Pesq Agropec Bras* 35(3):617-21, 2000.
36. Ranjan KS, Sinha AK. Occurrence of mycotoxigenic fungi and mycotoxins in animal feed from Bihar, Índia. *J Sci Food Agric* 1991; 56:39-47.
37. Pich PH. Detecção de aflatoxinas em produtos derivados de milho comercializados na região de Porto Alegre [Dissertação de Mestrado]. Porto Alegre, Rio Grande do Sul: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1998.

Otimização das condições de extração de compostos voláteis em leite caprino utilizando a técnica de extração e concentração simultânea

Extraction enhancement of volatile compounds from goat milk using the simultaneous extraction and concentration techniques

RIALA6/1023

Rita de Cássia R. E. QUEIROGA^{1*}; Marta S. MADRUGA²; Mércia de S. GALVÃO²; Roberto G. da COSTA³

* Endereço para correspondência: ¹Departamento de Nutrição, Universidade Federal da Paraíba. R. Luiz Alves da Rocha, 304. Bessa. CEP: 58037-380. João Pessoa – PB. E-mail: rcqueiroga@uol.com.br.

² Departamento de Tecnologia Química e de Alimentos, Centro de Tecnologia, UFPB.

³ Departamento de Agropecuária, Centro de Formação de Tecnólogos, UFPB.

Recebido: 07/07/2004 – Aceito para publicação: 30/06/2005.

RESUMO

Para a identificação dos compostos responsáveis pelo sabor são necessários procedimentos que, inicialmente, permitam isolar os voláteis da grande massa dos macronutrientes do alimento, com a mínima distorção da composição original própria do sabor em estudo. Para o isolamento e concentração dos compostos voláteis em alimentos são utilizadas várias técnicas, dentre elas destaca-se o método de destilação e extração simultânea (DES), que tem como vantagem a possibilidade de uso do extrato para um maior número de análises e muito eficiente para a extração de compostos como fenóis, ácidos, lactonas, cetonas, álcoois e ésteres. Esta técnica foi otimizada para isolamento de voláteis de leite de cabra com a utilização do aparelho de Likens e Nickerson, variando-se as condições analíticas: volume da amostra, tempo de extração, temperatura de extração e o solvente. Os melhores resultados foram obtidos utilizando-se os seguintes parâmetros: solvente - pentano-éter etílico (2:1); volume de amostra 200 mL; tempo de extração 120 min; temperatura de extração 55°C, com a detecção de 174 compostos voláteis.

Palavras-Chave. leite de cabra; compostos voláteis; extração de voláteis.

ABSTRACT

For identifying the compounds responsible for flavor requires procedures for performing the isolation and concentration of volatiles compounds from food raw macronutrient material with minimal effect on the original flavor. Several techniques have been used for these purposes, being among them the distillation and simultaneous extraction method (DSE). DSE method presents advantages as to enable the use of obtained extract in several kinds of analyses. Likewise, this method is particularly efficient for performing volatile compounds extraction, such as: phenols, acids, lactones, ketones, alcohols, and esters. In the present work, the DSE technique was assessed for isolating the volatile compounds from goat milk by means of Likens and Nickerson apparatus. By means of this technique -174 volatile compounds were detected from goat milk, and the best results were obtained under the following conditions: ethyl pentane-ether (2:1) as solvent, sample volume of 200 mL, extraction time of 120 min, and extraction temperature at 55°C.

Key Words. goat milk, volatile compounds, extraction of volatile compounds.

INTRODUÇÃO

Os compostos responsáveis pelo aroma e sabor apresentam estruturas químicas diversas derivadas dos principais constituintes dos alimentos, sendo suas características específicas capazes de estimular os receptores dos reflexos do gosto e do odor, para produzir uma resposta sincronizada e integrada, denominada de sabor ou *flavour*. O termo sabor se refere aos compostos químicos responsáveis ao estímulo ou à própria estimulação dos receptores biológicos. Os consumidores consideram o sabor como uma das principais propriedades sensoriais, sendo decisivas na seleção, aceitação e ingestão dos alimentos¹.

O perfil de compostos voláteis causadores do sabor de um alimento é muito complexo, consistindo em um grande número de substâncias orgânicas que estão presentes em concentrações muito pequenas, da ordem de ppm, ppb ou ppt e variam quanto a sua natureza química e valor de *threshold* (limiar mínimo de percepção, ou seja, a menor concentração necessária para o indivíduo detectá-la).

A análise de compostos orgânicos voláteis associados com o sabor a partir de alimentos pode ser realizada utilizando-se diferentes métodos, no entanto, em geral todos os métodos envolvem processos de extração, concentração, separação e identificação dos componentes individuais². Os constituintes voláteis do sabor são, em geral, compostos termolábeis, sujeito a modificações, como rearranjos, ciclizações, oxidações, quando são submetidos a qualquer aumento da temperatura. Portanto, a etapa de isolamento dos voláteis é considerada crítica, podendo resultar em uma composição completamente diferente da original presente no alimento. Os métodos aplicados devem ser eficientes e brandos devido à quantidade, estabilidade e volatilidade desses compostos³.

Para o isolamento e concentração dos compostos voláteis em alimentos, são correntemente usadas, a exemplo da destilação a vácuo, métodos de extração, destilação e concentração simultânea dos voláteis (DES), análises do *headspace* estático e dinâmico. Para identificação de cada composto volátil, separadamente, utiliza-se de procedimentos como a análise por extração e diluição do aroma (AEDA), o cálculo do odor unitário, a análise de *Charm*, etc²⁻⁴.

No isolamento de substâncias voláteis, dois métodos são reportados: o de *Headspace* e o de extração. As amostragens na técnica de *Headspace* são usualmente classificadas em duas categorias, a estática e a dinâmica ou de *purge and trap* (extração e captura).

A técnica de *Headspace* estática envolve a introdução direta de um dado volume do vapor concentrado acima da amostra de alimento, em uma coluna cromatográfica. Este é considerado o método mais rápido e consome o menor tempo de extração; no entanto, não permite a determinação de compostos com elevados pontos de ebulição, apresentando também baixa sensibilidade. Para se contornar estes pontos negativos, foi desenvolvida a técnica do *headspace* dinâmica

ou *purge and trap*, que envolve a purga dos voláteis da camada de *headspace* com um gás inerte (nitrogênio ou hélio), seguida de captura destes voláteis em material absorvente. A grande vantagem deste método é o isolamento e a concentração de compostos voláteis e semi-voláteis, associados ao curto período de isolamento⁴, proporcionando aumento na sensibilidade.

A extração com solventes, utilizando-se os métodos tradicionais de batelada ou de extração contínua, é usualmente combinada com processos de destilação. O aparelho desenvolvido por Likens e Nickerson⁵, combina os processos de destilação e extração simultaneamente. Este processo tem como vantagens o emprego de quantidade reduzida de solvente e redução do tempo de análise. Tem adquirido notoriedade e várias inovações e variações têm sido sugeridas^{2,3,4}. Outra vantagem é a possibilidade do uso do extrato para um maior número de análises, facilitando a calibração de dois parâmetros, volume de injeção e nível de concentração do extrato, enquadrando dentro da faixa de detecção e sensibilidade do detector. De acordo com Larráyoiz et al.⁶, a técnica de Destilação e Extração Simultânea (DES) é mais eficiente para a extração de fenóis, ácidos, lactonas e aldeídos pesados, cetonas, álcoois e ésteres.

Há a necessidade de se investigar os constituintes voláteis por técnicas diferenciadas, pois fatores como a temperatura, a velocidade de liberação dos voláteis pela matriz e seus coeficientes de partição entre a fase aquosa majoritária em frutas e a fase gasosa (ambiente) provocam profundas modificações no perfil qualitativo e quantitativo destes extratos. Na análise do sabor de um alimento, deve-se ter sempre em mente que o aroma obtido está diretamente relacionado com os métodos aplicados nos processos de isolamento e concentração⁴.

Muitas substâncias formadoras do sabor que estão presentes no leite fresco são, provavelmente, produzidas no metabolismo animal. Dentre elas destacam-se: os compostos carboxílicos, os álcoois, os ácidos graxos livres, os compostos sulfurados. Entretanto, muitos compostos voláteis podem ser transferidos das forragens ao leite via rúmen. Diversos trabalhos têm reportado sobre as mudanças na fração volátil e na produção do sabor do leite causadas por processos térmicos, deterioração resultante de microrganismos, processos enzimáticos ou de natureza química, apresentando-se de grande relevância para a indústria de laticínios⁷⁻¹¹.

O leite de cabra possui características sensoriais agradáveis ou desagradáveis, dependendo dos hábitos de consumo. O sabor denominado *caprino*, quando acentuado, constitui-se como um dos fatores de recusa. Entretanto, as substâncias responsáveis pelo sabor do leite caprino e seus prováveis precursores não são ainda bem conhecidos. Alguns estudos têm sido realizados, relacionando-as a fatores genéticos associados à sua composição química e formas de manuseio do produto, com a conseqüente produção do sabor característico^{8,12}.

Desta forma, este trabalho teve como objetivo a otimização dos procedimentos de destilação e extração simultânea para o isolamento de compostos voláteis em leite caprino como uma ferramenta para estudos de melhoria de sabor deste tipo de produto.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

As amostras de leite de cabra foram obtidas de 20 animais da raça Saanen, criadas em sistema de confinamento no Setor de Caprinocultura da Universidade Federal da Paraíba, de Bananeiras - PB. Os animais foram alimentados com suporte forrageiro de capim *Tifton* e ração balanceada. As amostras foram preparadas (extração dos compostos voláteis) no Laboratório de Análise de Flavor da Universidade Federal da Paraíba e analisadas na Central Analítica do Departamento de Química Fundamental da Universidade de Pernambuco.

A partir dos 20 animais selecionados realizaram-se coletas de amostras na fase intermediária da lactação - com uma média de 100 dias de lactação. O leite ordenhado manualmente era homogeneizado com bastão de vidro e pesado, retirando-se amostras de 500 mL para as análises, as quais eram acondicionadas em recipientes de vidro higienizados e transportadas em caixa de isopor com gelo ao laboratório.

Métodos

Extração e identificação de voláteis

Os compostos voláteis presentes nas amostras de leite caprino dos grupos experimentais foram extraídos pelo método de Destilação e Extração Simultânea (DES)⁵.

O aparelho de Likens e Nickerson⁵ utilizado neste trabalho foi montado conforme Figura 1. O balão contendo a amostra, conectado ao braço A, foi aquecido por uma manta aquecedora. O balão contendo o solvente, em banho de água, foi conectado ao braço B, cuja temperatura dependia do ponto de ebulição do solvente utilizado.

Ao ser aquecido, o leite libera voláteis que percolam através do braço A, em direção ao condensador. Por outro lado, o solvente à temperatura de ebulição evapora e percola através do braço B, também em direção ao condensador. Uma vez condensado, os voláteis da amostra e o solvente são coletados na parte inferior em forma de U do extrator.

A extração teve seu início computado quando se observou a temperatura desejada atingida na amostra contida no braço A, permanecendo o processo de extração por 40, 60, 80 e 120 minutos. Em seguida, resfriou-se o balão com o solvente, conectado ao braço B, por 10 minutos, em água gelada ($\pm 2^\circ\text{C}$). Os extratos foram transferidos para um frasco com sulfato de sódio anidro (1g), e concentrados até 0,5 mL, sob arraste de gás nitrogênio. Os recipientes de vidro âmbar foram lacrados com *parafilm*, rotulados e estocados em *freezer* até as análises cromatográficas em CG-DIC e CG-EM.

Inicialmente, realizou-se experimento para otimização das condições analíticas da extração, com a finalidade de determinar o volume ideal de leite a ser utilizado na extração dos compostos voláteis, variando-se o volume de leite e de água. As extrações foram realizadas variando-se também o solvente (hexano e a mistura de pentano e éter etílico (2:1) e o tempo de extração (40, 60, 80 e 120 minutos). Para o hexano, a temperatura foi mantida em média, a 69°C , enquanto que, para a mistura pentano-éter etílico (2:1), em média, a 38°C . O condensador foi resfriado mantido pela passagem de água gelada ($\pm 2^\circ\text{C}$) em circulação. As temperaturas de extração testadas foram de 55°C e 100°C . Foi realizado um teste de especificidade, ou seja, análise de um branco do ensaio, com todos os solventes exceto a amostra. Os extratos de compostos voláteis do leite caprino obtidos, nas diferentes condições analíticas, foram analisados em cromatógrafo gasoso acoplado a um detector de ionização de chama. As diferentes condições de extração testadas estão apresentadas na Tabela 1.

Cromatografia Gasosa de Alta Resolução

Para escolha da melhor condição de extração, baseada no número de picos de compostos voláteis detectados, os extratos foram analisados em cromatógrafo gasoso marca HEWLETT PACKARD, modelo HP 5890 "série II" acoplado a um detector de ionização de chama (DIC), injetor tipo *split/splitless*. Os compostos foram separados em coluna capilar: HP-INNOWax (30 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro x 0,25 μm de espessura do filme) Marca: Hewlett Packard; Tipo:

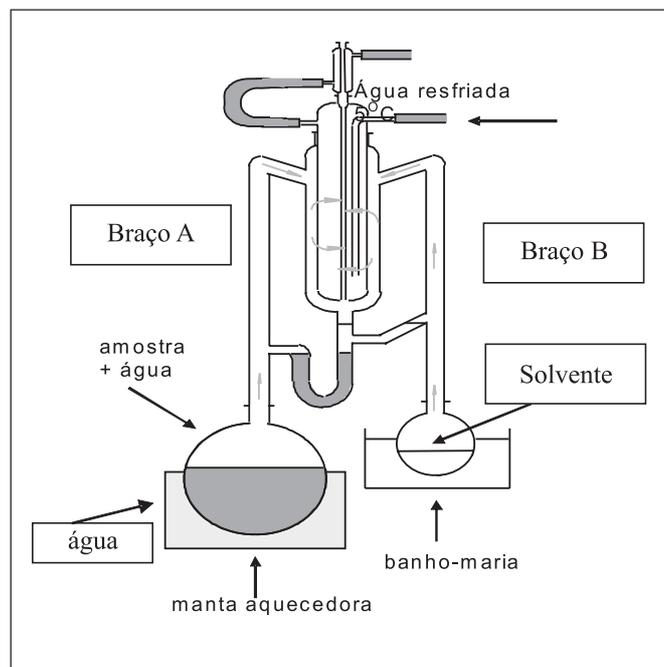


Figura 1. Aparelho de Destilação e Extração Simultânea de Likens e Nickerson¹².

polar; Componente: polietilenoglicol (*bondable INNPhase*). O gás de arraste utilizado foi o hélio (pureza 99,999%) com pressão constante de 11,5 psi na coluna e vazão de 1,0 mL min⁻¹. A vazão da purga foi ajustada para fluxo de 1,7 mL.min⁻¹. As injeções de 5 µl foram realizadas manualmente com o uso de injetor *split*, com taxa nominal de 1:10.

Para os estudos de identificação, quantificação e confirmação dos voláteis nas amostras de leite caprino, a temperatura inicial da coluna foi de 30°C. Após 10 min da injeção da amostra a temperatura da coluna foi aumentada para 80°C a uma razão de 5°C/min, sendo mantida nesta temperatura por 5 min. Programou-se um novo aumento na temperatura da coluna utilizando-se uma razão de 5°C/min, até a temperatura final de 220°C, mantendo-se a coluna nesta temperatura por mais 10 min, com tempo total de corrida de 63 min. As temperaturas do injetor e detector utilizadas foram 200 e 240°C, respectivamente.

Após a escolha da melhor condição analítica, os extratos de doze amostras do leite caprino foram submetidos à separação e identificação dos constituintes voláteis por cromatografia gasosa com detector de massas. Utilizou-se cromatógrafo gasoso (SHIMAZDU, CG 17A) acoplado a um detector de massas (CGEM – QP5050A). Duas colunas (DB-5 e Carbowax) de diferentes polaridades foram testadas para avaliar a melhor resolução para separação dos voláteis. A coluna DB-5 (J & W Scientific, apolar, 5% difenol e 95% dimetilpolisiloxano) possuía as dimensões: 30m de comprimento x 0,25mm de diâmetro x 0,25µm de espessura do filme. O gás de arraste utilizado foi o hélio (pureza 99,999%) com pressão constante de 5,73 psi na coluna e vazão de 1,0 mL.min⁻¹. A vazão total foi ajustada para fluxo de 22,1 mL.min⁻¹. As injeções de 1,5 µl foram realizadas manualmente com o uso de injetor *split*, com taxa nominal de 1:10. Os componentes foram separados empregando-se as seguintes condições cromatográficas: temperatura inicial da coluna de 30°C, permanecendo por 5 min, aumentando-se para 80°C a uma razão de 5°C/min, sendo mantida nesta temperatura por 30 min. Procedeu-se a um novo aumento na temperatura da coluna utilizando-se uma razão de 5°C/min, até a temperatura final de 220°C, mantendo-se a coluna nesta temperatura por

mais 10 min, com tempo total de corrida de 88 min. As temperaturas do injetor e detector utilizadas foram 230 e 250°C. Para a coluna Carbowax (marca HP, polar, componente polietileno glicol) com dimensões: 25 m de comprimento x 0,32 mm de diâmetro interno x 0,20µm, utilizou-se programação semelhante, a exceção da temperatura final da programação da coluna e do detector, as quais foram, respectivamente, de 200 e 230°C. Em ambas as colunas foram realizadas diariamente corridas em branco, objetivando-se um melhor controle das condições analíticas.

A coluna foi conectada diretamente á fonte de íons, com temperatura da linha de transferência de 250°C, voltagem de ionização de 70 eV. O detector de massas operou através de um sistema de impacto de elétrons, em uma faixa de variação de massa molecular de 30 a 330 u.m.a. (unidade de massa atômica), com uma taxa de *scan* de 1,0 por segundos.

Identificação

A identificação dos compostos voláteis separados por CG/EM foi realizada pela comparação com os espectros de massa da biblioteca do “NIST” (*National Institute of Standards & Technology, EUA*) contendo aproximadamente um total de 150.000 espectros de referência, confirmando as fragmentações características das diferentes classes dos compostos identificados.

Solução padrão de n-alcenos homólogos (C₆ – C₂₈) da *PolyScience Corp* (Niles, WI, EUA) com pureza ≥99,997% foi analisada diariamente, antes das análises dos extratos de leite caprino, objetivando-se verificar as condições analíticas dos equipamentos (CG, CG-EM), juntamente com a utilização dos tempos de retenção destes alcenos, padrões externos de referência, no cálculo posterior do Índice de Retenção Linear (IRL) dos voláteis^{13,14}. O IRL de cada composto foi calculado utilizando-se o tempo de retenção do padrão de alcano e o tempo de retenção do pico a ser identificado, segundo a Equação 1. A identificação dos compostos voláteis foi considerada positiva quando o IRL do composto situou-se dentro da faixa de ± 2 unidades do IRL do composto da literatura^{13,14},

Tabela 1. Condições de extração dos compostos voláteis para o leite de cabras Saanen.

Experimento	Volume da amostra (mL)	Tempo de extração (min)	Temperatura de extração (°C)	Solvente
1	200	80	100	pentano/éter
2	200	40	55	pentano/éter
3	200	120	100	pentano/éter
4	200	60	100	pentano/éter
5	200	60	100	hexano
6	300	60	100	hexano
7	200	120	55	pentano/éter
8	300	120	55	hexano

considerando-se, também, o fato de que os espectros de massa do composto em questão e do padrão deveriam apresentar 95% de semelhanças.

$$RI = 100 \frac{{}^iR_{(i)} - {}^iR_{(z)}}{{}^iR_{(z+1)} - {}^iR_{(z)}} + 100_z$$

onde: RI(i) é o índice relativo do composto i;
Z é o número de átomos de carbono do alcano z;
R(i) é o tempo de retenção do composto i;
R(z) é o tempo de retenção do alcano z;
R(z+1) é o tempo de retenção do alcano z+1

Equação 1. Cálculo do Índice de Retenção Linear

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo, foram avaliadas as condições dos diversos parâmetros durante a extração realizada. As condições dos testes experimentais encontram-se descritas na Tabela 1 e os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 2.

As variações no volume da amostra foram realizadas no sentido de se obter a maior quantidade de amostra possível, sem o comprometimento na execução do processo de extração, como perda de amostra durante o processo de aquecimento, para tanto os volumes utilizados foram de 200 e 300 mL de leite. Quanto à temperatura de extração, procedeu-se com temperaturas de 55 e 100°C, entretanto, optou-se pela temperatura mais baixa, visto que na matriz leite, ocorrem vários processos químicos, dentre os quais a caramelização dos açúcares, pelo uso de altas temperaturas e/ou reações tipo *Maillard*.

Os extratos obtidos do leite caprino apresentaram volume que variaram de 8,0 a 15,8 mL, com o solvente hexano, enquanto os extratos obtidos com o uso da mistura de pentano-

Tabela 2. Volume final de extratos aromáticos e número de picos cromatográficos obtidos nos experimentos preliminares nas análises de compostos voláteis do leite caprino

Experimento	Volume final (mL)	Número de picos
1	12,4	31
2	8,0	32
3	14,0	53
4	17,0	35
5	15,7	21
6	15,8	62
7	16,0	174
8	8,0	27

éter etílico (2:1) concentraram-se os volumes entre 8,0 a 17,0 mL. Considerando o grande número de compostos, ficou evidenciado que a mistura de solventes pentano/éter resultou em uma maior captura de compostos voláteis, provavelmente em função de sua baixa temperatura de ebulição e a presença de compostos de baixo peso molecular no leite, registrando-se no experimento 7 o maior número de picos cromatográficos.

Assim sendo, para as análises de compostos voláteis do leite caprino, considerando os testes preliminares de otimização das condições da extração, foram estabelecidos os seguintes parâmetros: volume da amostra: 200 mL; temperatura de extração 55°C; tempo de extração 120 min. e o emprego do solvente pentano/éter etílico (2:1).

No que diz respeito à otimização das condições analíticas no CG-EM, observou-se alguns aspectos de maior relevância. Após testes com coluna polar (Carbowax) e apolar (DB-5) a melhor resolução para os compostos voláteis foi obtida na coluna apolar, considerando a diversidade dos pontos de ebulição dos voláteis da amostra de leite de cabra. A opção pela utilização do modo *split* no sistema de injeção das amostras, justificou-se pela técnica de extração dos voláteis utilizada

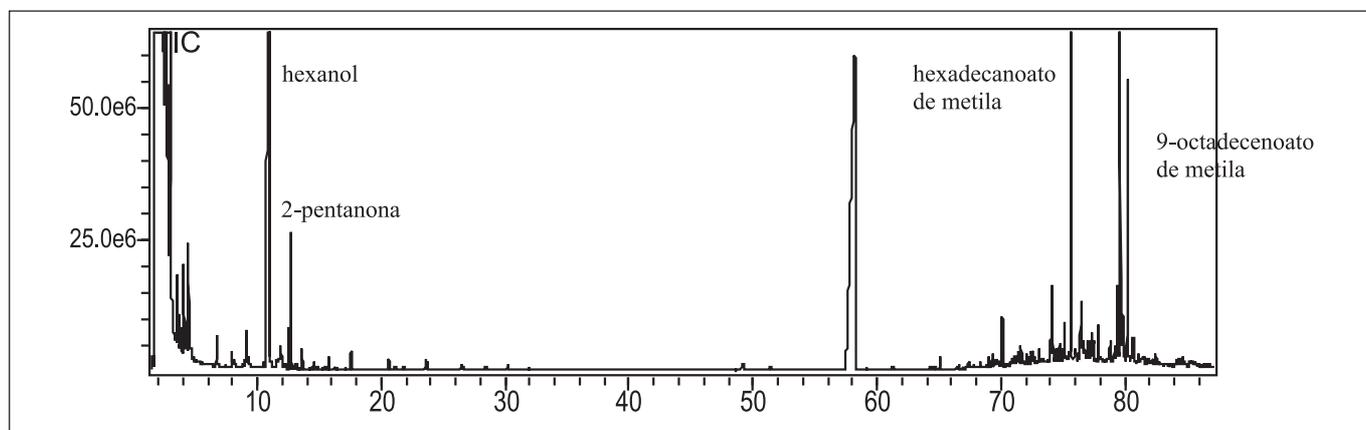


Figura 2. Cromatograma dos íons totais do leite de cabra.

(DES), a qual apresenta como característica a baixa eficiência na captura de compostos com baixo ponto de ebulição associado ao processo de concentração dos voláteis, evitando-se, dessa forma, uma saturação da coluna¹⁵.

Uma vez determinadas as condições analíticas de extração e padronização do método, procederam-se às análises dos extratos de amostras do leite de cabra. Foram identificados

128 compostos das seguintes classes: ácidos carboxílicos (12), alcanos cíclicos (3), álcoois (18), aldeídos (15), amida (1), aromáticos (7), cetonas (09), ésteres (35), éter (1), fenonas (1), furanos (1), hidrocarbonetos (14), lactonas (7), outros (3) e terpenóides (1). A Tabela 3 lista as principais classes e os compostos voláteis com maiores áreas, identificados no leite, com suas respectivas áreas relativas. As classes mais

Tabela 3. Principais classes e compostos voláteis identificados com maiores área relativas, em doze amostras de leite caprino

Classe e Nome do Composto	IRL	Área (%)
		Média ± Desvio Padrão
Ácido carboxílico		
Ácido 9-pentadecenóico	1834	0,18 ± 0,21
Ácido 9-hexadecenóico	1938	1,30 ± 0,88
Ácido heptadecanóico	2058	0,62 ± 0,93
Ácido 9-octadecenóico	2143	0,42 ± 0,54
Ácido octadecanóico	2168	0,42 ± 0,48
Ácido 9-nonadecenóico	2241	0,23 ± 0,28
Álcoois		
Butanol	656	0,27 ± 0,47
2-pentanol	700	4,59 ± 6,12
Hexanol	861	27,83 ± 8,22
1-pentanol 2-metil	906	0,37 ± 0,15
Hexadecanol	1844	1,88 ± 3,53
Heptadecanol	1986	0,84 ± 0,64
Octadecanol	2089	1,75 ± 1,73
Aldeídos		
Pentanal	695	1,08 ± 1,72
E-2-hexenal	859	3,22 ± 6,43
9-octadecenal	2004	1,64 ± 1,45
Octadecanal	2031	1,30 ± 1,21
Cetonas		
2-pentanona	682	4,47 ± 6,35
Ésteres		
Tridecanoato de butila	1856	1,80 ± 2,01
Hexadecanoato de metila	1925	3,13 ± 2,39
Pentadecanoato de butila	2079	1,19 ± 2,01
9-octadecenoato de metila	2098	4,88 ± 3,89
Octadecanoato de metila	2122	2,19 ± 2,26
9,12,15-octadecatrienoato de etila	2132	2,78 ± 3,54
9-octadecenoato de etila	2158	2,95 ± 3,94
Octadecanoato de etila	2197	1,34 ± 1,61
Ácido tetradecanoico, 2-fenil, 1,3-dioxan-5-il ester	2261	3,06 ± 3,42
Hidrocarbonetos		
Heneicosano	2106	1,36 ± 0,16
Docosano	2206	1,15 ± 1,57
Tricosano	2297	2,07 ± 2,31
Lactonas		
δ-pentadecalactona	1971	0,23 ± 0,29
γ-hexadecalactona	2047	0,18 ± 0,35
Δ-hexadecalactona	2065	0,74 ± 1,06
δ-heptadecalactona	2186	0,24 ± 0,48

representativas foram os ésteres, álcoois, aldeídos, hidrocarbonetos, ácidos carboxílicos e cetonas. A Figura 2 apresenta o cromatograma dos íons totais do leite de cabra.

Dentre os compostos identificados, destacam-se com maiores % de área: hexanol, 2-pentanol, 2-pentanona, (E)-2-hexenal, hexadecanoato de metila e 9-octadecanoato de metila. Os compostos voláteis identificados hexanol e E-2-hexenal estão associados com a formação do aroma de rancidez dos produtos. Enquanto que, 2-pentanona contribui com o aroma do gordura e o tetradecanoato de isopropila com o caprino¹⁶. Segundo Jaubert et al¹², butanoato de etila e hexanoato de etila apresentam-se como compostos responsáveis pelo odor característico do leite caprino. Massart-Leen et al.¹⁷ relataram a presença de hexadecanoato de metila e de 9-octadecanoato de metila na gordura de leite caprino.

Há várias rotas bioquímicas e químicas para formação dos compostos voláteis. Os ácidos graxos livres são resultantes de processos enzimáticos, por ação das lipases, que hidrolisam os ácidos graxos de cadeia curta¹⁸. Algumas cetonas com o radical metil, como 2-metilbutanona, 2-metilpentanona, 2-metilheptanona e 2-metilnonanona têm sido encontradas em leite *in natura*, estando ligados a mecanismos de oxidação lipídica. O sabor oxidado da gordura do leite é originado, primariamente, dos ácidos linoléico e linolênico, como também, de outros ácidos graxos polinsaturados. Aldeídos, também podem ser formados por processos oxidativos, envolvendo microrganismos e enzimas como a lipoxigenase. A hidrólise de triacilgliceróis, catalisada por lipases, libera ácidos graxos de cadeia curta, que são determinantes no sabor dos laticínios, destacando-se também a importância das lactonas e das metil cetonas^{11,19}.

De acordo com Calvo e Hoz²⁰, os compostos que contribuem com a formação do sabor do leite podem ser classificados de acordo com sua origem em: compostos originados do metabolismo animal e/ou do manejo alimentar, compostos produzidos por reações químicas, atividade enzimática e/ou flora microbiana antes do processamento, compostos gerados por tratamento térmico e compostos produzidos durante a estocagem.

CONCLUSÕES

- A técnica de Likens e Nickerson otimizada para voláteis de leite de cabra isolou um maior número de compostos voláteis quando foram usados: mistura pentano:éter etílico (2:1) como solvente; 200 mL de volume de amostra; 120 min de tempo de extração e uma temperatura de extração de 55°C. Nas condições padronizadas nas amostras de leite caprino foram detectados 174 compostos voláteis;

- Foram identificados 128 compostos voláteis, com um perfil constituído, principalmente, pelas classes dos ésteres, álcoois, aldeídos, hidrocarbonetos, ácidos carboxílicos e cetonas.

REFERÊNCIAS

1. Fisher C, Scott TR. Flavores de los alimentos. Biología e química. Zaragoza: Acribia, 1997, 212 p.
2. Madruga MS. Studies on some factors affecting meat flavour formation [Tese de Doutorado]. Reading, University of Reading, England, UK, 1994.
3. Franco MRB, Janzanti NS. Avanços na metodologia instrumental da pesquisa do sabor. In: Franco MRB. Aroma e sabor de alimentos. Campinas: Varela; 2004. p.17-28.
4. Maarse H. Volatile Compounds in Foods and Beverages. New York: Marcel Dekker. 1991. 763 p.
5. Likens ST, Nickerson GB. Detection of certain hop oil constituents in brewing products. Proceedings of the American Brewing Chemists 1964; 5(5): 5-13.
6. Larráyo P, Addis M, Gauch R, Bosset JO. Comparison of dynamic headspace and simultaneous distillation extraction techniques used for analysis of volatiles components in three European PDO ewes' milk cheeses. Int. Dairy J. 2001; 11: 911-26.
7. Alloggio V, Caponio, F, Pasqualone A, Gomes TV. Effect of heat treatment on the rennet clotting time of goat and cow milk. Food Chem. 2000; 70: 51-5.
8. Delacroix-Buchet A, Lamberet G. Sensorial properties and typicity of goat dairy products. In: International Association of Goat. Proceedings of the International Conference of Goats. Tours/France, 2000:559-63.
9. Gomes AMP, Malcata FX. Development of probiotic cheese manufactured from goat milk: response surface analysis via technological manipulation. J. Dairy Sci. 1998; 81(6): 1492-507.
10. Morgan F, Jacquet F, Micault S, Bodin JP, Jaubert G. Study on the compositional factors involved in the variable sensitive of caprine milk to high-temperature processing. Int Dairy J. 2000; 10: 113-7.
11. Valero E, Sanz J, Martínez-Castro I. Volatile component in microwave-and conventionally-heated milk. Food Chem. 1999; 66: 333-8.
12. Jaubert G, Bodin JP, Jaubert A. Flavour of goat farm bulk milk. In: Morand-Fehr P, editor. Recent advances in goat research. Zaragoza: Ciheam-Iamz, 1997. 93 p.
13. Jennings W, Shibamoto T. Qualitative analysis of flavor and fragrance volatiles by glass capillary gas chromatography. New York: Academic Press, 1980. 467p.
14. Kondjoyan N, Berdagué JL. A compilation of relative retention indices for analysis of aromatic compounds. Champanelle: Laboratoire Flaveur, 1996. 235p.
15. Parliment TH. Solvent Extraction and Distillation Techniques. In: Techniques for Analyzing Food Aroma. Marsili, New York: Marcel Dekker. 1997; 1-26.
16. McGugan WA. Description of flavor chemicals. Food Research Reports – Food Research Institute, Agriculture Canada (Ottawa), 4(1), 1980. 46 p.
17. Massart-Leen AM, De Pooter H, Decloedt M, Schamp N. Composition and variability of the branched-Chain fatty acid fraction in the milk of goats and cows. Lipids.1981; 16(5): 286-92.
18. Rodriguez-Amaya DB. Rotas bioquímicas e químicas para formação de compostos voláteis em alimentos. In: Franco MRB. Aroma e sabor de alimentos. Campinas: Varela; 2004. 177-94.
19. Hammond EG. Flavor chemistry of lipid foods. Blackie Academic Professional, London, 1998. 237 p.
20. Calvo MM, Hoz L. Flavour of heated milks. A review. Int. Dairy J.1992; 2: 69-81.

Qualidade físico-química e microbiológica do leite de cabra pasteurizado e Ultra Alta Temperatura, comercializado na região de Ribeirão Preto-SP.

Physicochemical and microbiological quality of frozen pasteurized goat whole milk and of Ultra High Temperature milk commercialized in the region of Ribeirão Preto - SP

RIALA6/1024

Maria Aparecida de OLIVEIRA^{1*}; Rosa Maria Duarte FÁVARO¹; Marina Miyuki OKADA¹; Lucile Tiemi ABE¹; Maria Helena IHA¹

* Endereço para correspondência: rua Minas, 877, tel. (16) 3625 5046, Campos Elíseos, Ribeirão Preto/SP, CEP 14085-410. e-mail: maoliveira@ial.sp.gov.br.

¹ Instituto Adolfo Lutz - Laboratório I de Ribeirão Preto.

Recebido: 21/01/2005 – Aceito para publicação: 30/06/2005.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a qualidade físico-química e microbiológica do leite de cabra comercializado na região de Ribeirão Preto. Foram avaliadas 42 amostras, sendo 16 de leite Ultra Alta Temperatura (11 integrais e 5 desnatados) e 26 de leite pasteurizado integral congelado. Dentre os parâmetros físico-químicos estudados a lactose foi a que mais frequentemente apresentou-se em desacordo com os limites estabelecidos na legislação (81%), seguida pelos sólidos não gordurosos (16,7%), gordura e proteína (14,3%), acidez e cinzas (9,5%) e densidade (7,1%), respectivamente. Quanto aos exames microbiológicos, 11,5% das amostras de leite pasteurizado apresentaram valores de coliformes termotolerantes acima do limite tolerado pela legislação em vigor. Todas as amostras de leite Ultra Alta Temperatura estavam de acordo com a legislação em vigor quanto aos parâmetros microbiológicos avaliados.

Palavras-Chave. leite de cabra, parâmetros de identidade e qualidade, análises físico-químicas, microbiologia.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the physicochemical and microbiological quality of goat milk commercialized in Ribeirão Preto - SP, Brazil. Twenty- six samples of frozen pasteurized goat whole milk, and 16 of ultra high temperature (UHT) samples (11 whole milk and 5 skim milk) were analyzed. Comparing the physicochemical results with the limits standards established by the legislation, 81% of samples were in disagreement regarding to lactose, 16.7% pertaining to no fat - solids contents, 14.3% in fat and protein levels, 9.5% in titratable acid and ash, and 7.1% in relation to density. Microbiological analysis showed that 11.5% of pasteurized milk were contaminated with fecals coliforms in limits above those established by legislation. No UHT milk was in disagreement- regarding to microbiological parameters.

Key Words. goat milk, quality and identity parameters, physicochemical analysis, microbiology.

INTRODUÇÃO

O leite é um importante alimento na nutrição humana por conter elementos essenciais como proteínas, carboidratos, gorduras, vitaminas e sais minerais, sendo o leite de vaca o mais amplamente consumido. Porém existe uma significativa porcentagem da população, principalmente crianças, que apresentam reação alérgica com a ingestão do leite de vaca; essa prevalência chega a aproximadamente 2,5% durante os primeiros anos de vida¹⁻⁴

O leite de cabra tem sido recomendado como substituto para pessoas que sofrem de alergia a proteína do leite de vaca^{3,5}. Embora dados sobre mecanismos imunológicos que sustentem essa evidência sejam limitados, supõe-se que as proteínas do soro do leite de cabra e de vaca apresentem-se estruturalmente diferenciadas, e com variações percentuais, estes fatos, provavelmente explicam sua melhor tolerância por crianças portadoras de quadros alérgicos ao leite de vaca⁶.

A composição química do leite de cabra e de vaca é semelhante, mas o primeiro apresenta outras características importantes que o torna vantajoso; glóbulos de gordura menores proporcionam maior digestibilidade⁴; presença de ferro em quantidades significativas⁵ e teores de vitaminas próximos ao do leite de vaca, exceto pelas vitaminas B₆ e B₁₂ cujos valores apresentam-se diminuídos no leite de cabra².

As características físico-químicas do leite de cabra podem variar acentuadamente devido a fatores como raça, estágio de lactação, época do ano, alimentação e condições ambientais⁷⁻¹⁰.

A produção e o beneficiamento do leite exigem cuidados higiênico-sanitários, pois o mesmo é um alimento extremamente susceptível à contaminação microbiana. Padrões microbiológicos desse produto podem não ser atendidos quando há falhas no processamento, transporte e/ou armazenamento. Estudos com leite de cabra *in natura* mostram a presença de microrganismos patogênicos^{11,12,13,14}, destacando-se a importância de um processamento adequado para eliminar os microrganismos que representam risco à saúde do consumidor. Os processos de beneficiamento utilizados para o leite de cabra destinado ao consumo humano são principalmente a pasteurização lenta seguida de congelamento e o processamento Ultra Alta Temperatura (UAT), sendo a forma pasteurizada e congelada a mais comercializada. O congelamento prolonga a vida útil de prateleira, tendo alguns produtos, validade muitas vezes superiores a 60 dias.

Com o aumento das usinas beneficiadoras de leite de cabra e do consumo deste alimento, especialmente por crianças alérgicas, o presente estudo teve como objetivo avaliar a qualidade físico-química e microbiológica do leite de cabra pasteurizado congelado e UAT comercializados na região de Ribeirão Preto.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem

Foram analisadas 42 amostras de leite de cabra, sendo 26 de leite pasteurizado integral congelado e 16 de leite UAT, adquiridas no comércio da região de Ribeirão Preto-SP. Foram estudadas 6 marcas diferentes de leite pasteurizado e 3 de leite UAT (2 integrais e 1 desnatado). De cada marca foram avaliadas de 4 a 6 amostras, produzidas em diferentes datas, durante o ano de 2003. Todas as marcas de leite pasteurizado pertenciam a usinas localizadas no Estado de São Paulo e as de leite UAT nos Estados do Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul. Todas as marcas encontradas no comércio da região de Ribeirão Preto foram avaliadas neste estudo.

As amostras de leite congelado foram transportadas em recipientes isotérmicos até o laboratório, e mantidas a temperatura de -20°C até o início das análises, no máximo 48 horas após a aquisição da amostra. O descongelamento foi realizado em geladeira e após homogeneização foi coletada asepticamente, em frasco esterilizado, 100mL para análise microbiológica, e os 900mL restantes foram, a seguir, utilizados para as determinações físico-químicas.

As amostras de leite UAT foram transportadas e mantidas em temperatura ambiente até o início das análises (máximo 48 horas). Os procedimentos de coleta foram os mesmos que os realizados nas amostras de leite pasteurizado.

Todas as amostras foram adquiridas e analisadas dentro do prazo de validade do produto.

Análises físico-químicas

As análises físico-químicas realizadas foram escolhidas de acordo com os parâmetros de qualidade estabelecidos na Instrução Normativa nº 37 de 31 de outubro de 2000 – Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite de Cabra: acidez, densidade, sólidos não gordurosos, gordura, cinzas e lactose seguindo os métodos descritos no livro de Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz¹⁵. A determinação de proteína foi realizada através do método de Kjeldahl (Official Method 991.20) descrito nos métodos analíticos da Association of Official Analytical Chemists¹⁶, utilizando o dióxido de selênio como catalisador.

O teor de cloreto¹⁵ foi avaliado pois pode ser útil como parâmetro de identidade e qualidade do leite de cabra.

Análises microbiológicas

As determinações microbiológicas realizadas nas amostras de leite pasteurizado foram: bactérias do grupo coliforme termotolerantes, utilizando a técnica do Número Mais Provável (NMP/mL) e pesquisa de *Salmonella* sp., de acordo com a metodologia recomendada pela APHA¹⁷, sendo que o método para pesquisa de *Salmonella* sp. foi realizado com algumas modificações pertinentes relacionadas a substituição do caldo de pré-enriquecimento por Água Peptonada 1% Tamponada, e dos meios de identificação presuntiva pelo meio

Rugai modificado (IAL)¹⁸; introdução do caldo de enriquecimento seletivo Rappaport Vassiliadis e do meio de isolamento Agar Verde Brillante. No leite UAT realizou-se: contagem de bactérias aeróbias mesófilas (UFC/mL), contagem de bactérias termófilas (UFC/mL) e enumeração de bolores e leveduras (UFC/mL), segundo metodologia recomendada pela APHA¹⁷.

Avaliação da qualidade do leite

Os resultados obtidos nas análises físico-químicas e microbiológicas foram avaliados de acordo com os valores estabelecidos pelas legislações em vigor^{19,20} e comparados com resultados obtidos por outros pesquisadores.

RESULTADOS

A Tabela 1 mostra os resultados das determinações físico-químicas realizadas nas amostras de leite de cabra pasteurizado integral congelado, UAT desnatado e UAT

integral comercializados na região de Ribeirão Preto-SP e os valores preconizados pela legislação em vigor²⁰.

Nos resultados dos parâmetros microbiológicos avaliados nas amostras de leite de cabra pasteurizado observou-se: ausência de *Salmonella* sp. em todas as amostras estudadas e coliformes termotolerantes acima do limite tolerado pela legislação (4,0 UFC/mL) em 3 amostras (9,3 UFC/mL; 110,0 UFC/mL; 46,0 UFC/mL respectivamente). As amostras de leite UAT (integral e desnatado) tiveram como resultados ausência de bactérias aeróbias mesófilas, termófilas, bolores e leveduras, estando de acordo com a legislação em vigor¹⁹.

DISCUSSÃO

As características físico-químicas do leite de cabra puro apresentam variações devido a fatores como raça, estágio de lactação, época do ano, espaço entre ordenhas, alimentação e clima^{7-10,21,22}. Conhecendo essas possíveis variações, a legislação brasileira, através da Instrução Normativa nº 37 de

Tabela 1. Características físico-químicas do leite de cabra integral pasteurizado congelado, UAT integral e UAT desnatado comercializados na região de Ribeirão Preto – SP.

Parâmetro	Valores estabelecidos na legislação ²⁰	Integral Pasteurizado (n = 26)	Tipo de leite Integral UAT (n = 11)	Desnatado UAT (n = 5)
Acidez, em % ácido láctico	0,13 a 0,18	0,14 + 0,021 (0,10 – 0,18) 4 (15,4%)	0,15 + 0,007 (0,15 – 0,17) 0 (0%)	0,16 + 0,015 (0,14 – 0,18) 0 (0%)
Densidade 15/15°C	1,028 – 1,034	1,030 + 0,002 (1,027 – 1,033) 2 (7,7%)	1,029 + 0,002 (1,027 – 1,032) 1 (9,1%)	1,032 + 0,0011 (1,031 – 1,034) 0 (0%)
Sólidos não gordurosos % m/m	mínimo 8,20	8,5 + 0,41 (7,5 – 9,2) 2 (7,7%)	8,3 + 0,68 (7,2 – 9,1) 4 (36,4%)	8,3 + 0,41 (7,6 – 8,6) 1 (20%)
Gordura % m/m	Integral - teor original Desnatado - máx. 0,5	3,3 + 0,54 (2,5 – 4,3) 6 (23,1%)	3,6 + 0,43 (3,0 – 4,2) 0 (0%)	0,15 + 0,087 (0,1 – 0,3) 0 (0%)
Proteína Total (N x 6,38) % m/m	mínimo 2,8	3,1 + 0,46 (2,3 – 4,7) 4 (15,4%)	3,0 + 0,32 (2,6 – 3,5) 2 (18,2%)	3,0 + 0,13 (2,9 – 3,2) 0 (0%)
Lactose % m/v	mínimo 4,3	4,1 + 0,22 (3,6 – 4,5) 19 (73,1%)	3,9 + 0,24 (3,6 – 4,3) 10 (90,9%)	3,8 + 0,10 (3,7 – 3,9) 5 (100%)
Cinzas % m/v	mínimo 0,70	0,77 + 0,06 (0,64 – 0,90) 3 (11,5%)	0,79 + 0,082 (0,67 – 0,95) 1 (9,1%)	0,77 + 0,034 (0,72 – 0,80) 0 (0%)
Cloreto % m/v	Não está estabelecido na legislação	0,15 + 0,027 (0,10 – 0,20)	0,14 + 0,029 (0,10 – 0,18)	0,17 + 0,029 (0,13 – 0,20)

Valores apresentados como média + desvio padrão, faixa de variação, número e porcentagem de amostras em desacordo com a legislação²⁰.

31 de outubro de 2000, estabelece os requisitos mínimos exigidos para o leite de cabra pasteurizado e UAT destinados ao consumo humano.

No presente estudo, o teor de lactose variou de 3,6 a 4,5%, dos quais 34 (81%) do total das amostras apresentaram teor inferior a 4,3%, mínimo exigido pela legislação²⁰. Benedet e Carvalho⁸ encontraram valores médios de lactose ainda mais baixos que os do presente estudo, ou seja 3,062; 3,176; 3,285 e 3,256% em amostras de leite de cabra *in natura* coletadas em quatro diferentes regiões de Santa Catarina. Ferreira e Queiroga²² estudando leite de cabra das raças Anglo Nubiana, Parda Alemã e British Alpine, no Curimatáu Paraibano, durante 195 dias de lactação, encontraram valores médios para lactose de 3,94; 4,00 e 4,01% respectivamente. Bonassi et al.⁹ encontraram teor médio de 4,33% (3,22 a 5,00%) em leite caprino *in natura* na região de Botucatu-SP. Tanezini et al.²³ estudando leite de cabra cru coletado de 16 animais pertencentes a 3 diferentes raças puras, durante 18 meses, em Goiânia, observaram um intervalo de variação do teor de lactose de 3,71 a 5,83% e encontraram diferenças significantes entre os valores de lactose em função do tempo de lactação, raça e clima da região. Esses autores alertam para a necessidade de adotarem-se cuidados quando se pretende estabelecer valores padrões únicos para todo o país.

A acidez observada variou de 0,10 a 0,18% de ácido láctico para o leite pasteurizado, sendo que dentre as 26 amostras avaliadas, 4 (15,4%) mostraram acidez inferior ao estabelecido na legislação²⁰. Quanto às amostras de leite UAT, todas apresentaram acidez dentro da faixa estabelecida. Gomes et al.²⁴, ao avaliar as características físico-químicas do leite caprino pasteurizado congelado por 90 dias, observaram decréscimos significantes na acidez e sugerem que essa diminuição poderia estar associada a uma hidrólise da caseína, ocasionando uma desestruturação das frações da proteína durante o armazenamento prolongado sob congelamento. Entretanto, no presente estudo, as 4 amostras de leite pasteurizado com acidez inferior a 0,13% de ácido láctico, apresentaram também outros parâmetros em desacordo com a legislação. A acidez do leite pode fornecer dados sobre o estado de conservação do produto, a qual aumenta com a degradação microbiana da lactose. Valores baixos podem, inclusive, ser decorrentes da adição de água.

A densidade do leite está relacionada principalmente com a concentração de elementos dissolvidos em suspensão (sólidos não gordurosos) e com a proporção de gordura, e deve oscilar com a variação desses componentes. O leite desnatado, dessa forma, é mais denso que o leite integral, e a adição de água diminui a densidade²⁵. No presente estudo encontrou-se densidade a 15°C abaixo do estabelecido na legislação²⁰ em 3 amostras (2 leite pasteurizado e 1 leite UAT integral). Nos 3 casos, outros parâmetros, estavam também fora dos limites estabelecidos (leite UAT integral: lactose, sólidos não gordurosos e cinzas; leites pasteurizados: lactose, acidez, sólidos não gordurosos, gordura ou proteína e cinzas).

Quanto ao teor de sólidos não gordurosos, observou-

se, dentre o total de amostras avaliadas, uma variação de 7,2 a 9,2%, sendo que em 2 amostras (4,8%) de leite pasteurizado e em 5 amostras (11,9 %) de leite UAT (desnatado e integral) obteve-se teores inferiores a 8,2% que é o mínimo exigido²⁰. Estas 2 amostras de leite pasteurizado apresentaram além do teor de sólidos não gordurosos, pelo menos mais 5 parâmetros abaixo do mínimo estabelecido na legislação (acidez, densidade, lactose, cinzas e gordura ou proteína). Benedet e Carvalho⁸, avaliando as características do leite de cabra do Estado de Santa Catarina, observaram uma variação para o teor de sólidos não gordurosos de 5,89 a 9,32%; 6,42 a 8,77%; 6,43 a 8,10%; 6,41 a 8,52%, respectivamente, em quatro das diferentes regiões estudadas. D'Alessandro et al.²⁶, avaliando extrato seco total e desengordurado em leite caprino do município de Goiânia, observaram que estes podem variar de acordo com fatores como raça, clima e tempo de lactação.

Neste estudo observou-se que o teor de gordura variou de 2,5 a 4,3% para o leite integral (pasteurizado e UAT), sendo que 6 amostras de leite pasteurizado apresentaram teor inferior a 2,9%. A gordura é o componente do leite que mais sofre influência da alimentação e essas alterações ocorrem com relação à concentração, mas principalmente com a composição de ácidos graxos¹⁰. Outros fatores como o estágio de lactação, também influenciam na concentração de gordura, porém a raça é um fator limitante, tanto que a legislação brasileira²⁰ estabelece "teor original" de gordura para o leite de cabra integral, no entanto são admitidos valores inferiores a 2,9% mediante comprovação de que o teor médio de gordura de um determinado rebanho não atinge esse nível.

Os resultados obtidos para o teor de cinzas variaram de 0,64 a 0,92% e apresentaram-se inferiores ao mínimo estabelecido na legislação²⁰ (0,70%) em 3 amostras de leite pasteurizado e 1 de leite UAT integral. Ferreira e Queiroga²² observaram uma variação de 0,53 a 0,83% no leite de cabra Anglo Nubiana e British Alpine, na ordenha do turno da manhã. Dias et al.²¹ encontraram de 0,65 a 0,94% para as raças Parda, Saanen e Anglo Nubiana, também no turno matutino.

O teor de proteína variou de 2,3 a 4,7%, sendo que 4 amostras de leite pasteurizado e 2 amostras de leite UAT integral apresentaram resultados inferiores a 2,8% (mínimo estabelecido na legislação). No entanto os valores obtidos, com exceção de 1 amostra com 2,3g de proteína/100mL, apresentaram teores próximos de 2,8%. Os valores médios observados por Benedet e Carvalho⁸ foram 3,14% (2,4-5,4); 3,55% (2,8-4,4); 3,10% (2,6-3,6) e 3,36% (2,4-4,6) em 4 diferentes regiões de Santa Catarina. Já Oliveira et al.²⁷ encontraram teor médio de proteína em leite de cabra pasteurizado resfriado de 3,65 ± 0,239, em Campo Grande-MS.

Em relação a cloretos verificou-se uma variação de 0,10 a 0,20 g/100mL entre os leites pasteurizados integrais, UAT integral e UAT desnatado. Dias et al.²¹, analisando as características minerais do leite caprino *in natura* da bacia leiteira de Goiânia, constataram concentrações de 0,235 + 0,039 g/100mL (0,157 a 0,313) e verificaram que fatores como o período

de ordenha influenciam na qualidade do leite no que se refere a cloretos, observando concentrações maiores no período vespertino. Apesar da legislação atual não estabelecer parâmetros para cloretos, os teores do mesmo podem colaborar com o diagnóstico de distúrbios da glândula mamária. Altos teores de cloretos sugerem leite proveniente de animais que apresentam mastite^{21,28}.

Dentre as 42 amostras de leite de cabra pasteurizado e UAT avaliadas neste estudo encontrou-se 34 com lactose abaixo de 4,3%, sendo que destas, 22 apresentaram somente esse parâmetro em desacordo com a legislação²⁰. Excluindo-se o teor de lactose, 16 amostras apresentaram pelo menos um parâmetro com valor abaixo do estabelecido (10 amostras apenas um parâmetro, 4 amostras de 2 a 3 parâmetros e 2 apresentaram 5 parâmetros em desacordo). Nestas 2 últimas, observou-se portanto, 6 parâmetros abaixo do mínimo estabelecido (acidez, densidade, sólidos não gordurosos, lactose, cinzas, proteína ou gordura), o que pode sugerir adição de água ao leite.

Quanto às análises microbiológicas das 42 amostras analisadas, 3 (7,1%) estavam em desacordo com os padrões estabelecidos pela legislação em vigor¹⁹. Esse índice é inferior aos 31,0% observados por Garrido et al.²⁹ em leites de vaca provenientes de mini e micro usinas de beneficiamento da região em estudo. Silva et al.³⁰ realizaram análises em 46 amostras de leite de cabra pasteurizado congelado comercializado na cidade de Recife e dentre as 5 marcas comerciais diferentes existentes no mercado, foi observado que duas marcas continham nível elevado de coliformes termotolerantes (37,5 e 44,4% respectivamente) e também não isolaram *Salmonella* sp.

As diferenças observadas na carga microbiana do leite podem ocorrer devido a fatores como estágio de lactação, condições de higiene na produção e ordenha, meses do ano em que as coletas são realizadas, tipo de ordenha, tratamento e saúde do animal^{13,14,31,32}; como também advir do processo de pasteurização que pode tornar um leite cru, sadio e inócuo; ou apenas diminuir a carga microbiana de um leite considerado de má qualidade^{30,33}. A temperatura e o tempo de armazenamento (congelamento) também podem limitar a sobrevivência de microrganismos nos alimentos.

Bielaszewska et al.¹¹, ao investigarem infecções humanas causadas por *Escherichia coli* O157:H7 no norte da Bohemia, República Tcheca, constataram a presença desta bactéria tanto nas fezes de indivíduos doentes como no leite de cabra *in natura* por eles consumidos.

Amostras de leite de cabra *in natura* oriundas da região de Bergamo (Itália) foram avaliadas por Foschino et al.¹³ quanto a contaminação microbiana e a incidência de microrganismos patogênicos, conseguindo isolar lactobacilos, enterococos, leveduras, *Staphylococcus*, esporos de Clostrídios sulfito redutores, coliformes e *Escherichia coli* O157:H7, não isolando *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* sp.; mostrando assim, a necessidade de conscientizar os consumidores dos problemas que podem acarretar para a sua saúde o consumo do leite cru.

Carvalho¹², estudando leite de cabra *in natura* e pasteurizado em 4 micro-usinas da Grande São Paulo, observou em uma propriedade um número elevado de contaminação por coliformes, concluindo que esta contaminação pode ter sido originada do manipulador, material de embalagem e soldagem do filme plástico. No presente estudo, dentre as 26 amostras de leite pasteurizado avaliadas encontrou-se apenas 3 (11,5%) contaminadas por coliformes acima do limite tolerado¹⁹, porém no momento de descongelamento destes leites, constatou-se 10 (38,5%) embalagens com microfuros, os quais podem vir a ser uma porta de entrada para microrganismos, contaminando o leite e podendo causar surtos de toxinfecção alimentar.

Neste estudo, observou-se uma baixa carga microbiana (inferior a 4 NMP/mL) em 88,5% das amostras de leite pasteurizado e ausência de microrganismos em todas as amostras de leite UAT, verificando assim a eficiência dos processos de pasteurização e UAT utilizados.

CONCLUSÕES

Com exceção do teor de lactose, a maior parte das amostras avaliadas (62%) no presente estudo apresentaram os demais parâmetros (acidez, densidade, sólidos não gordurosos, gordura, proteína e cinzas) dentro dos valores estabelecidos na legislação brasileira. Porém, a alta porcentagem de amostras com teor de lactose inferior ao mínimo estabelecido na legislação pode sugerir que esse limite seja muito alto para ser adotado como padrão em âmbito nacional, assim como já discutido por outros autores.

Apesar da literatura mostrar as variações que os parâmetros físico-químicos podem sofrer devido à diversos fatores, é necessário que os produtores se atenham ao fato, para obter um produto dentro das normas legais vigentes.

A qualidade microbiológica do leite de cabra pasteurizado e congelado comercializado na região de Ribeirão Preto pode ser considerada satisfatória uma vez que dentre as 26 amostras avaliadas, apenas 3 apresentaram coliformes termotolerantes acima do limite tolerado. Nas amostras de leite UAT não houve desenvolvimento de microrganismos, sugerindo que o tratamento térmico foi eficiente.

A constatação da presença de microfuros nas embalagens de leite pasteurizado integral congelado deve servir de alerta às autoridades competentes. Faz-se necessário uma reavaliação do tipo de material e da soldagem do filme plástico que está sendo utilizado para acondicionar o leite que vai ser congelado.

REFERÊNCIAS

1. Bellioni-Businco B, Paganelli R, Lucenti P, Giampietro PG, Perborn H, Businco L. Allergenicity of goat's milk in children with cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol* 1999; 103(6):1191-4.

2. Fisberg M, Nogueira M, Ferreira AMA, Fisberg RM. Aceitação e tolerância de leite de cabra em pré-escolares. *Pediatr Mod* 1999; 35(7):526-37.
3. Haenlein GFW. Past, Present, and Future Perspectives of Small Ruminant Dairy Research. *J Dairy Sci* 2001; 84:2097-115.
4. Haenlein GFW. Goat milk in human nutrition. *Small Rumin Res* 2004; 51:155-63.
5. Park YW. Hypo-allergenic and therapeutic significance of goat milk. *Small Rumin Res* 1994; 14:151-9.
6. Queiroga RCRE, Costa RG, Madruga MS. Leite Caprino. Aspectos Aromáticos e Nutricionais. *Rev Inst Laticínios Cândido Tostes* 2003; 58(330):3-20.
7. Aganga AA, Amarteifio JO, Nkile N. Effect of Stage of Lactation on Nutrient Composition of Tswana Sheep and Goat's Milk. *J Food Comp Anal* 2002; 15:533-43.
8. Benedet HD, Carvalho MW. Caracterização do leite de cabra no Estado de Santa Catarina, Brasil. *Ciênc Tecnol Aliment* 1996; 16(2):116-9.
9. Bonassi IA, Martins D, Roça RO. Composição química e propriedades físico-químicas do leite de cabra. *Ciênc Tecnol Aliment* 1997; 17(1):57-63.
10. Torii MS, Damasceno JC, Ribeiro LR, Sakaguti ES, Santos GT, Matsushita M, et al. Physical-chemical characteristics and fatty acids composition in dairy goat milk in response to roughage diet. *Braz Arch Biol Technol* 2004; 47(6):1-11.
11. Bielaszewska M, Janda J, Bláhová K, Minariková H, Jíková E, Karmali MA, et al. Human *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with the consumption of unpasteurized goat's milk. *Epidemiol Infect* 1997; 119:299-305.
12. Carvalho MGX. Características físico-químicas, biológicas e microbiológicas do leite de cabra processado em micro-usinas da região da Grande São Paulo-SP [Tese doutorado] São Paulo, Brasil: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 1998. 103pp.
13. Foschino R, Invernizzi A, Barucco R, Stradiotto K. Microbial composition, including the incidence of pathogens, of goat milk from the Bergamo region of Italy during a lactation year. *J Dairy Res* 2002; 69:213-25.
14. Morgan F, Massouras T, Barbosa M, Roseiro L, Ravasco F, Kandarakis I, et al. Characteristics of goat milk collected from small and medium enterprises in Greece, Portugal and France. *Small Rumin Res* 2003; 47:39-49.
15. Instituto Adolfo Lutz. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. São Paulo: IMESP 1985.
16. Association Official Analytical Chemists. Official methods of analysis of the AOAC International. Washington: AOAC International 1995.
17. Vanderzant C, Splittstoesser DF. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, Washington DC: APHA 1992.
18. Pêsoa GVA, Silva EAM. Milieu pour l'identification présomptive rapide des enterobactéries des aeromonas et des vibriens. *Ann Microbiol* 1974.
19. Resolução-RDC nº 12, de 2 de jan. 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.
20. Instrução Normativa nº 37, de 31 de out. 2000 da Secretaria de Defesa Agropecuária do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Aprova o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite de Cabra. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 08 nov. 2000. Seção 1, p. 23-5.
21. Dias JM, Tanezini CA, Pontes IS, Oliveira ABC, D'Alessandro WT, Souza JT. Características minerais do leite caprino in natura da bacia leiteira de Goiânia. *Cienc Tecnol Aliment* 1995; 15(1):24-8.
22. Ferreira MCC, Queiroga RCRE. Composição química do leite de cabras puras no Curimatáu Paraibano durante o período de lactação. *Rev Inst Latic Cândido Tostes*. 2003; 58(330):21-26.
23. Tanezini CA, D'Alessandro WT, Oliveira ABC, Rocha JM, Pontes IS, Sousa JT, et al. Variação em lactose no leite caprino cru do município de Goiânia. *Ciênc Tecnol Aliment* 1995; 15(2):162-5.
24. Gomes MIFV, Bonassi IA, Roça RO. Características Químicas Microbiológicas e Sensoriais de leite de cabra congelado. *Ciênc Tecnol Aliment* 1997; 17(2):111-14.
25. Silveira NVV, Rodas MAB, Duarte M, Saruwtari J H, Souza A. Leite em natureza e seus derivados: reciclagem analítica em laticínios e aplicação da legislação brasileira de alimentos nas conclusões de análises [manual]. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz 1994.
26. D'Alessandro WT, Oliveira ABC, Rocha JM, Pontes IS, Sousa JT, Tanezini CA, et al. Variação do extrato seco total e desengordurado no leite caprino do município de Goiânia. *Ciênc Tecnol Aliment* 1995; 15(2):185-8.
27. Oliveira JM, Hiane PA, Ramos MIL. Características físico-químicas do leite de cabra pasteurizado e congelado, produzido em Campo Grande-MS. *Hig Aliment* 2002; 16(102/103):107-11.
28. Barros GC, Leitão CHS. Influência da mastite sobre as características físico-químicas do leite de cabra. *Pesq Vet Bras* 1992; 12(3/4):45-48.
29. Garrido NS, Morais JMT, Briganti RC, Oliveira MA, Bergamini AM M, Oliveira SAV, et al. Avaliação da qualidade físico-química e microbiológica do leite proveniente de mini e micro-usinas de beneficiamento da região de Ribeirão Preto/SP. *Rev Inst Adolfo Lutz* 2001; 60(2):141-6.
30. Silva EF, Lima VLAG, Salgueiro AA. Avaliação Microbiológica de leite de cabra pasteurizado e comercializado na cidade de Recife-PE. *Hig Aliment* 1999 13(66/67):71-6.
31. Delgado-Pertíñez M, Alcalde MJ, Gusmán-Guerrero JL, Castel JM, Mena Y, Caravaca F. Effect of hygiene-sanitary management on goat milk quality in semi-extensive systems in Spain. *Small Rumin Res* 2003; 47:51-61.
32. Zweifel C, Muehlherr JE, Ring M, Stephan R. Influence of different factors in milk production on standard plate count of raw small ruminant's bulk-tank milk in Switzerland. *Small Rumin Res* 2005; 58:63-70.
33. Buffa M, Guamis B, Royo C, Trujillo AJ. Microbiological changes throughout ripening of goat cheese made from raw, pasteurized and high-pressure-treated milk. *Food Microbiol* 2001; 18:45-51.

Estudo comparativo de métodos para determinação de nitrato em águas para consumo humano

Comparative study on nitrate determination methods in potable water

RIALA6/1025

Elaine Marra de Azevedo MAZON[†]; Aline Cristine Garcia de OLIVEIRA; Berenice Mandel BRÍGIDO; Valéria Pereira da Silva FREITAS

*Endereço para correspondência: Rua São Carlos, 720. Vila Industrial, Campinas – SP, CEP: 13035-420, Campinas – SP
emamazon@ial.sp.gov.br.

Instituto Adolfo Lutz, Laboratório I Campinas/SP.

Recebido: 01/03/2005 – Aceito para publicação: 30/06/2005.

RESUMO

Foi realizado um estudo comparativo entre quatro métodos para determinação de nitrato em águas destinadas ao consumo humano: ácido fenoldissulfônico, espectrofotométrico UV a 205nm, espectrofotométrico UV a 205nm modificado e espectrofotométrico UV a 220/275nm. Os métodos foram avaliados a fim de selecionar os mais adequados quanto à precisão e exatidão para serem aplicados na rede oficial de laboratórios de saúde pública. Com base nos resultados obtidos, os métodos espectrofotométricos UV a 220/275nm e espectrofotométrico UV a 205nm apresentaram características de desempenho adequadas estatisticamente para análise de rotina laboratorial, além de serem métodos de fácil execução, utilizarem reagente único e apresentarem resultados imediatos na determinação de nitratos em águas com baixo teor de matéria orgânica.

Palavras-Chave. água para consumo humano, determinação de nitrato, método espectrofotométrico UV/VIS, validação.

ABSTRACT

Four techniques were studied and compared for determining nitrate in water for human consumption: phenoldissulphonic acid, UV spectrophotometric at 205nm, modified UV spectrophotometric at 205nm, and UV spectrophotometric at 220/275nm. They were assessed in order to select the most reliable with respect to precision and accuracy for being used in the Brazilian official public health laboratories network. Based on the obtained results, both techniques UV spectrophotometric at 220/275nm, and at 205nm presented statistically adequate performance characteristics for being employed in routine laboratory analyses. In addition, both techniques are easy to perform, make use of one reagent only, and they present rapid testing results in determining nitrates in water with low content of organic materials.

Key Words. potable water, nitrate determination, UV/VIS spectrophotometric method, validation.

INTRODUÇÃO

Os nitratos constituem a forma de nitrogênio mais comumente encontrada e estão presentes naturalmente em solos, águas, plantas e carnes¹.

O nitrato é um dos íons mais encontrados em águas naturais, geralmente ocorrendo em baixos teores em águas superficiais, podendo atingir altas concentrações em águas subterrâneas².

Os valores de referência para o nitrato divergem segundo a origem da água em relação às legislações vigentes. A Portaria 518, de 25 de março de 2004 aplicada em águas para

consumo humano³ estabelece como valor máximo permitido para nitrato 10mg.L⁻¹, expresso em nitrogênio. A legislação utilizada para águas envasadas, RDC 54, de 15 de junho de 2000 tem como valor máximo permitido 50mg.L⁻¹, expresso em nitrato⁴.

O consumo de nitratos está associado a efeitos adversos a saúde humana como a indução a metahemoglobinemia, quando convertido a nitrito no estômago pela ação bacteriana, especialmente em crianças com idade até três meses e a formação potencial de nitrosaminas e nitrosamidas carcinogênicas⁵.

Vários métodos são citados na literatura para determinação e quantificação do íon nitrato em águas, dentre

esses: cromatografia iônica, nitração de compostos fenólicos, método do eletrodo íon seletivo para nitrato, método da redução em coluna de cádmio e método espectrofotométrico na região do ultravioleta^{2,6,7}.

O objetivo desse trabalho foi avaliar o desempenho dos métodos: ácido fenoldissulfônico, espectrofotométrico direto na região do ultravioleta a 205nm, espectrofotométrico direto na região do ultravioleta 205nm modificado e espectrofotométrico na região do ultravioleta 220nm e 275nm, a fim de selecionar os mais adequados quanto à exatidão e precisão para determinação de nitrato em águas para consumo humano a ser aplicado na rede oficial de laboratórios de saúde pública do estado de São Paulo.

MATERIAL E MÉTODOS

Para esse estudo foi utilizada uma amostra de água natural envasada previamente analisada quanto a sua potabilidade, cujos resultados estão dispostos abaixo:

aspecto	límpido;
odor	característico;
cor	menor que 2,0 Hazen;
turbidez	0,15 FTU;
resíduo seco à 180°C	41,0 mg.L ⁻¹ ;
perda por calcinação	6,0 mg.L ⁻¹ ;
resíduo fixo	35,0 mg.L ⁻¹ ;
pH	7,9;
alcalinidade de hidróxidos	0,0 mg.L ⁻¹ em CaCO ₃ ;
alcalinidade de carbonatos	0,0 mg.L ⁻¹ em CaCO ₃ ;
alcalinidade de bicarbonatos	0,0 mg.L ⁻¹ em CaCO ₃ ;
dureza de não carbonatos	0,0 mg.L ⁻¹ em CaCO ₃ ;
dureza de carbonatos	28,9 mg.L ⁻¹ em CaCO ₃ ;
dureza total	28,9 mg.L ⁻¹ em CaCO ₃ ;
gás carbônico	1,2 mg.L ⁻¹ ;
oxigênio consumido em meio ácido	0,2 mg.L ⁻¹ de oxigênio;
nitrogênio amoniacal	abaixo de 0,01 mg.L ⁻¹ de nitrogênio;
nitrogênio nitroso	abaixo de 0,0007 mg.L ⁻¹ de nitrogênio;
ferro	abaixo de 0,05 mg.L ⁻¹ ;
cloretos	3,0 mg.L ⁻¹ de cloro;
sulfatos	menor que 10,0 mg.L ⁻¹ ;
condutividade a 25°C	37,04 μS.cm ⁻¹
Coliformes totais	ausência em 100 mL;
<i>E. coli</i> ou Coliformes Termotolerantes ..	ausência em 100 mL.

O valor estimado do teor de nitratos foi realizado intralaboratorialmente em triplicata, por dez dias, utilizando-se a metodologia descrita no Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (espectrofotométrico na região do ultravioleta 220/275nm)².

Soluções/Reagentes:

- Soluções-padrão nas concentrações de 0,2; 3,5; 10,0 e 100mg N (NO₃⁻).L⁻¹ e 0,15; 0,2; 3,5; 10,0 e 100mg NO₃⁻(NO₃⁻).L⁻¹ preparadas a partir de solução estoque de nitrato de sódio 1000mg NO₃⁻(NO₃⁻).L⁻¹ NIST-SRM 723b Merck,
- Solução de ácido fenoldissulfônico(8)
- Solução de hidróxido de sódio a 50%
- Solução de ácido clorídrico 1 mol.L⁻¹ (1M)
- Água purificada: água de abastecimento público que sofreu processo de destilação, seguido de deionização, bidestilação e por último purificação (sistema de ultrapurificação de água NANOpure Dlamond UF – Barnstead/Thermolyne – modelo nº D11921).

Equipamentos

- Banho-maria a 100°C
- Espectrofotômetro UV/VIS, marca Hewelett- Packard 8453

Métodos para determinação de nitrato

Método espectrofotométrico com ácido fenoldissulfônico (1) descrito no Livro de Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz⁸.

Baseia-se na reação de íons nitrato com ácido fenoldissulfônico e posterior alcalinização com hidróxido de sódio, obtendo-se um composto de coloração amarela que é o sal sódico do ácido pícrico, formado pela nitração do fenol; a coloração é medida em espectrofotômetro na região do visível, cujo procedimento foi transferir 50mL da amostra para cápsula de porcelana de 150mL e evaporar até a secura. Adicionar 1mL da solução de ácido fenoldissulfônico e raspar intimamente com bagueta de vidro. Lavar com 10mL de água purificada e adicionar 5mL de solução de hidróxido de sódio 50%, sob agitação, até obter uma coloração amarela estável. Transferir para um balão volumétrico de 50mL completando volume com água purificada e homogeneizar. Proceder a leitura após 15 minutos em espectrofotômetro a 410nm, utilizando como branco água purificada preparado nas mesmas condições da amostra. Determinar a concentração de nitrato utilizando a curva-padrão previamente estabelecida a partir da solução estoque de 100mg NO₃⁻(NO₃⁻).L⁻¹ no intervalo de 0 a 7mg (NO₃⁻).L⁻¹, expresso em nitrato com leitura em espectrofotômetro a 410nm.

Método espectrofotométrico direto na região do ultravioleta a 205nm (2) descrito na próxima edição do Livro de Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz em fase de publicação⁹.

Baseia-se na leitura direta da absorbância da amostra de água, com adição de ácido clorídrico 1 mol.L⁻¹, em espectrofotômetro a 205nm aplicável em águas com baixo teor de matéria orgânica, cujo procedimento foi transferir 100mL da amostra para um balão volumétrico de 100mL, adicionar 1mL de ácido clorídrico 1 mol.L⁻¹. Homogeneizar e medir a absorbância em espectrofotômetro na região do ultravioleta a 205nm

utilizando como branco água purificada preparado nas mesmas condições da amostra. Determinar a concentração de nitrato utilizando a curva padrão previamente estabelecida a partir da solução estoque de 100mg NO₃⁻ (NO₃⁻).L⁻¹, no intervalo de 0 a 7mg (NO₃⁻).L⁻¹, expresso em nitrato com leitura em espectrofotômetro a 205nm..

Método espectrofotométrico direto na região do ultravioleta 205nm modificado para esse estudo (3).

Baseia-se na leitura direta da absorbância da amostra de água, com adição de ácido clorídrico 1 mol.L⁻¹, em espectrofotômetro a 205nm aplicável em águas com baixo teor de matéria orgânica, cujo procedimento foi transferir 50mL da amostra para um balão volumétrico de 50mL e adicionar 1mL de ácido clorídrico 1 mol.L⁻¹. Homogeneizar e medir a absorbância em espectrofotômetro na região do ultravioleta a 205nm utilizando como branco, água purificada preparado nas mesmas condições da amostra. Determinar a concentração de nitrato utilizando a curva padrão previamente estabelecida a partir da solução estoque de 100mg NO₃⁻ (NO₃⁻).L⁻¹, no intervalo de 0 a 7mg (NO₃⁻).L⁻¹, expresso em nitrato com leitura em espectrofotômetro a 205nm.

Método espectrofotométrico na região do ultravioleta a 220/275nm (4) descrito na 20ª edição do Standard Methods for the examination of Water and Wastewater².

Aplicável em águas com baixo teor de matéria orgânica. Baseia-se na medida de absorção na região do ultravioleta a 220nm do nitrato utilizando ácido clorídrico 1mol.L⁻¹ para eliminar interferentes. Dado que a matéria orgânica também absorve radiação a 220nm e que o nitrato não absorve a 275nm, uma segunda medição a 275nm, corrige o valor da leitura correspondente a nitrato.

O procedimento analítico utilizado para determinação de nitratos foi transferir 50mL da amostra para um balão volumétrico de 50mL e adicionar 1mL de ácido clorídrico 1 mol.L⁻¹. Homogeneizar e medir a absorbância em espectrofotômetro na região do ultravioleta a 220nm e 275nm utilizando como branco água purificada preparado nas mesmas condições da amostra. O valor da absorbância referente ao íon nitrato ($\lambda=220\text{nm}$) deve ser corrigido para interferências de compostos orgânicos ($\lambda=275\text{nm}$) através da fórmula: $A = A_{220} - 2.A_{275}$. Se o valor da absorbância corrigida (A) for maior que 10% do valor de absorbância a 220nm (A_{220}), o método não deve ser usado. Determinar a concentração de nitrato utilizando a curva padrão previamente estabelecida a partir da solução padrão de 10mg (NO₃⁻).L⁻¹, expresso em nitrogênio no intervalo de 0 a 7 mg N (NO₃⁻).L⁻¹.

Análise Estatística

As características de desempenho dos métodos estudados incluíram a determinação dos seguintes parâmetros de validação: limite de detecção, limite de quantificação, desvio padrão, intervalo de confiança, coeficiente de variação,

precisão, exatidão, linearidade e recuperação entre os métodos. As análises foram realizadas em triplicata por dez dias.

Limite de detecção

O limite de detecção para os métodos 1, 2 e 3 foi obtido através das leituras em espectrofotômetro de um branco analítico, preparado nas mesmas condições da amostra, com água purificada, acertando o zero de absorbância do equipamento entre uma leitura e outra com água purificada. Para o método 4, o limite de detecção foi obtido através das leituras em espectrofotômetro do branco com adição da menor concentração aceitável do analito, acertando o zero de absorbância do equipamento com um branco preparado nas mesmas condições da amostra¹⁰.

$$\text{LDM} = t_{(n-1, 1-\alpha)} \cdot (s)$$

LDM: limite de detecção do método

$t_{(n-1, 1-\alpha)}$: valor da abscissa t (Student) para (1- α). 95% nível de confiança e (n-1) graus de liberdade, sendo s : desvio padrão das análises em replicata.

Limite de quantificação

O limite de quantificação foi calculado como sendo dez vezes o valor do desvio padrão para os métodos 1, 2 e 3 das leituras em espectrofotômetro de um branco analítico, preparado nas mesmas condições da amostra, com água purificada, acertando o zero de absorbância do equipamento entre uma leitura e outra com água purificada. Para o método 4, o limite de quantificação foi calculado como dez vezes o valor do desvio padrão obtido através das leituras em espectrofotômetro do branco com adição da menor concentração aceitável do analito, acertando o zero de absorbância do equipamento com um branco preparado nas mesmas condições da amostra¹⁰.

LQ: 10. (s), sendo LQ: limite de quantificação e s : desvio padrão

Intervalo de confiança

O intervalo de confiança foi calculado utilizando-se a fórmula a seguir:

$$\bar{x} \pm \frac{t \cdot s}{\sqrt{n}}$$

\bar{x} : média das concentrações da amostra

$t_{(n-1, 1-\alpha)}$: valor da abscissa t (Student) para (1- α). 95% nível de confiança e (n-1) graus de liberdade. Sendo s : desvio padrão da média e n : número de determinações

Coeficiente de variação

O coeficiente de variação foi calculado utilizando-se a fórmula abaixo:

CV: $s \cdot 100 / \bar{x}$, sendo CV: coeficiente de variação, \bar{x} : média das concentrações da amostra e s : desvio padrão da média

Precisão

A precisão foi determinada por meio da repetitividade, expressa como desvio padrão. Para comparar a precisão entre os métodos estudados foi utilizado o teste F^{11} .

Exatidão

A determinação da exatidão foi realizada empregando-se teste de recuperação com análise de amostra de concentração conhecida adicionada de quantidades do analito em três níveis de concentração: próximo ao limite de quantificação para cada método, próximo à concentração máxima permitida pela legislação em vigor 10mg L^{-1} e próximo à concentração média da faixa de uso do método, $3,5\text{mg L}^{-1}$, expresso em nitrato (para os métodos 1, 2 e 3) e expresso em nitrogênio para o (método 4).

$$\text{Recuperação (\%)}: [(C_1 - C_2) / C_3] \cdot 100$$

Onde:

C_1 : concentração determinada na amostra adicionada

C_2 : concentração determinada na amostra não adicionada

C_3 : concentração adicionada

O t-teste(11) (comparação dos resultados do método testado com o método espectrofotométrico na região UV 220/275nm)(2) também foi aplicado para o estudo da exatidão.

Linearidade

A linearidade dos métodos foi observada pelo cálculo da equação da regressão linear, determinada pelo método dos mínimos quadrados e observando-se o coeficiente de correlação linear. Foram calculados também os resíduos entre os valores medidos e os valores calculados a partir da equação de regressão linear (cálculo do valor de t)¹⁰.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A razão de ser de um laboratório é produzir resultados analíticos confiáveis. Assim, o analista no seu dia-a-dia preocupa-se em obter resultados que afastem qualquer dúvida razoável com respeito a sua exatidão e que possuam uma precisão adequada para o propósito a que se destina¹².

A responsabilidade na emissão de dados confiáveis por um laboratório pertencente à rede oficial de laboratórios de saúde pública aumenta na medida em que os dados gerados através de programas de controle de águas para consumo humano fornecem subsídios para tomada de ações junto ao Ministério Público em relação a sua qualidade, bem como a revisão dos parâmetros da legislação pelo Ministério da Saúde.

Na água, a matéria orgânica é proveniente da matéria vegetal em decomposição e dos produtos de excreção dos animais e dos seres humanos, estando relacionada com a produção de cor, turbidez e bactérias presentes. A determinação de oxigênio consumido é um parâmetro adequado para a avaliação da presença de matéria orgânica na água, isto é, a

capacidade da água em consumir oxigênio. Uma água que não é contaminada e contém níveis baixos de matéria orgânica consumirá muito pouco oxigênio¹³.

Estudo de avaliação de 1114 amostras de águas (tratada, nascente, poço e mineral)¹⁴ revelou baixa porcentagem de condenação (menor que 0,1%) para oxigênio consumido, com resultado acima de $3,5\text{mg.L}^{-1}$. Este mesmo estudo mostrou ainda que o valor máximo de oxigênio consumido nas amostras aprovadas foi de $0,5\text{mg.L}^{-1}$ de oxigênio, indicativa de baixa concentração de matéria orgânica. Baseado no exposto acima, para esse trabalho foi escolhida amostra de água natural envasada com característica semelhante em relação à matéria orgânica, fator limitante nos métodos espectrofotométricos com leitura na faixa do ultravioleta.

É fundamental que os laboratórios disponham de meios e critérios objetivos para demonstrar, através da validação, que os métodos de ensaio que executam conduzam a resultados confiáveis e adequados à qualidade pretendida.

O intervalo de confiança é a região estimada na qual é altamente provável que se encontre o verdadeiro valor entre várias determinações obtidas, sendo esta a estratégia adotada no presente trabalho para estimar com 95% de certeza o teor de nitrato na amostra tomada como padrão. Os intervalos calculados para os métodos estão dispostos na Tabela 1.

Caulcutt e Boddy¹⁵ definem limite de detecção como a menor concentração do analito da qual temos 95% de confiança que será detectada pelo método; o Codex Alimentarius¹⁶ declara ser o limite de detecção convencionalmente aceito como três vezes o desvio padrão do branco da amostra. Os limites de detecção dos métodos estudados, calculados segundo Caulcutt e Boddy foram de 0,02; 0,04; 0,02; 0,02 mg.L^{-1} para os métodos 1 (espectrofotométrico com ácido fenoldissulfônico), 2 (espectrofotométrico direto na região do UV a 205 nm), 3 (espectrofotométrico direto na região do UV a 205 nm modificado) e 4 (espectrofotométrico na região do UV a 220 /275 nm) respectivamente, como pode ser observado na Tabela 1.

O limite de quantificação é a concentração mínima do analito a qual se consegue obter uma resposta analítica significativa e para os métodos estudados o limite de quantificação foi de 0,15; 0,2; 0,15 e 0,2 mg.L^{-1} para os métodos 1, 2, 3 e 4 respectivamente, como apresentados na Tabela 1.

A observação direta (Tabela 1) dos valores de detecção e quantificação dos quatro métodos avaliados mostra que não existe diferença aparente entre eles.

Precisão é um termo geral para avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas. As duas formas mais comuns de expressá-la são por meio da repetitividade e reprodutibilidade, sendo usualmente expressa pelo desvio padrão. Quanto menor o desvio padrão, maior a precisão do método. Sendo assim, o método 4 é o mais preciso (Tabela 1).

Tabela 1. Parâmetros estatísticos dos métodos estudados

	Métodos			
	1	2	3	4
Média (mg.NO ₃ L ⁻¹)	1,04	2,15	2,12	1,89
Desvio padrão (mg.NO ₃ L ⁻¹)	0,16	0,05	0,09	0,03
Intervalo de confiança (mg.NO ₃ L ⁻¹)	1,04 ± 0,1	2,15 ± 0,03	2,12 ± 0,06	1,89 ± 0,02
Coefficiente de variação (%)	15,94	2,49	4,66	1,50
Limite de detecção (mg.NO ₃ L ⁻¹)	0,02	0,04	0,02	0,02
Limite de quantificação (mg.NO ₃ L ⁻¹)	0,15	0,20	0,15	0,20

A comparação da precisão entre dois conjuntos foi realizada através do teste F¹¹, onde foi utilizada a análise da variância, tomando-se como referência o método 4 em relação aos métodos 1, 2 e 3. Nesta comparação, somente o método 2 (espectrofotométrico direto na região do UV a 205 nm) não apresentou diferença significativa entre as duas precisões ao nível de 95%, já que o resultado da equação do valor de distribuição F (2,93) foi menor que o valor de F tabelado (3,18).

O coeficiente de variação é também chamado de estimativa do desvio padrão relativo e expressa a relação porcentual da estimativa do desvio padrão em relação à média dos valores obtidos¹¹. Horwitz et al.¹⁷ demonstraram que o coeficiente de variação interlaboratorial de qualquer método não depende do instrumento utilizado, da matriz, ou técnica empregada e sim do teor em que o componente analisado se encontra na amostra. Assim por exemplo, uma concentração expressa em 1 ppm (mg L⁻¹) permite um coeficiente de variação em torno de 16%. Para um estudo intralaboratorial o valor do coeficiente de variação situa-se entre meio e um terço do valor acima (8,0 e 5,3%). Apenas o método 1 apresentou coeficiente de variação acima do estabelecido. Uma das explicações para isso pode ser devido às várias etapas no procedimento analítico exigidas nesse método.

A avaliação final dos parâmetros contidos na Tabela 1 permitiu a seleção do método 4 (espectrofotométrico na região do UV a 220/275 nm)² como referência para comparação com os outros métodos.

A linearidade é a capacidade de um método analítico em produzir resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito em amostras, em uma dada faixa de concentração. A linearidade dos métodos avaliados está apresentada na Tabela 2 pelas equações de regressão linear e pelo coeficiente de correlação. O coeficiente de correlação mede a intensidade com que se manifesta uma associação linear entre duas variáveis x e y, sendo um número adimensional, que varia entre -1 e 1. Os resultados de R² dispostos na Tabela 2, próximos da unidade positiva, indicam grande concentração dos pontos em torno de uma reta imaginária e mostram a tendência de uma variável aumentar, quando a outra aumenta¹⁸.

Muitas vezes os desvios da linearidade são difíceis de serem detectados visualmente e deste modo, foi verificada a

sua adequação por meio do cálculo dos resíduos entre os valores medidos e os valores calculados a partir da equação de regressão.

Nos métodos 1, 2 e 4 os valores de t calculados para todos os pontos da curva de calibração foram menores que o valor de t tabelado demonstrando que todos os pontos pertencem à curva de calibração, confirmando a sua linearidade. Embora o coeficiente de correlação do método 3 tenha apresentado um valor positivo próximo da unidade, quando se calculou o resíduo, os valores de t calculados 10,84; 13,67; 13,34; 13,45; 17,00 e 10,07 para os pontos de concentração 1; 2; 3; 4; 5 e 7 mg.L⁻¹ da curva foram maiores que o valor de t tabelado (2,57), indicando a não linearidade da mesma.

Exatidão descreve o quanto o valor encontrado se aproxima do valor real do constituinte analisado, ou quanto o valor de certa medida varia, mais ou menos uniformemente, da quantidade de analito presente na amostra em investigação. A determinação da exatidão dos métodos foi realizada empregando-se testes de recuperação com análise de amostra contendo concentrações conhecidas e comparando-se os métodos estudados, com o método 4, selecionado como referência.

Tonks¹⁹ aceita como método exato àqueles que apresentam porcentagens de recuperação acima de 85%. As porcentagens de recuperação dos métodos estudados (Tabela 3) foram superiores a esse valor nas três faixas de concentração estudadas. Os valores da média e coeficiente de variação das porcentagens de recuperação podem ser observados na Tabela 3, evidenciando-se que o método 4

Tabela 2. Resultados da regressão linear e o coeficiente de correlação dos métodos estudados

Métodos	Regressão linear	Coefficiente de correlação (R2)
1	y = 0,1005x + 0,0057	0,9994
2	y = 0,1518x - 0,0008	0,9998
3	y = 0,1535x - 0,0169	0,9996
4	y = 0,2498x + 0,0192	0,9994

Tabela 3. Recuperação de nitrato (%) em amostras fortificadas

Métodos	amostra (média)	mg.NO ₃ L ⁻¹ adicionado	recuperado (média)	recuperação	% média/coeficiente de variação*
1	1,04	0,15	1,17	87	89 / 11
		3,50	4,11	88	
		10,0	10,35	93	
2	2,15	0,20	2,33	87	93 / 2
		3,50	5,52	96	
		10,0	11,67	95	
3	2,12	0,15	2,25	90	92 / 1,7
		3,50	5,38	93	
		10,0	11,52	94	
4	1,89	0,20	2,85	96	100 / 2,8
		3,50	17,73	102	
		10,0	23,34	102	

* Média e coeficiente de variação das três concentrações adicionadas

obteve a melhor porcentagem de recuperação. Com relação ao coeficiente de variação, pode-se observar que para os métodos 2, 3 e 4, os valores estão adequados, pois se encontram na faixa entre 5,3 a 8,0%, já o método 1 possui um coeficiente de variação médio de 11% inadequado para o propósito.

A comparação entre as médias utilizando o teste de Tukey foi realizada apenas entre o método 4, tomado como referência e o método 2, que não apresentaram diferença significativa em relação à precisão. O método 1 por apresentar precisão e coeficiente de variação inadequados e o método 3, por apresentar precisão inadequada e desvios de linearidade foram excluídos desta avaliação estatística.

A comparação entre o método testado e o de referência não apresentou diferença estatística significativa, pois o valor calculado de t (1,03 para o método 2) foi menor que o valor de t tabelado (1,83 a uma probabilidade de 95%), demonstrando que o método testado possui a exatidão necessária para as finalidades a que se propõem.

O método espectrofotométrico na região do ultravioleta a 205 modificado (método 3) devido a seus desvios de linearidade (cálculo dos resíduos) e de precisão foi considerado inadequado para determinação de nitratos em águas para consumo humano.

O método espectrofotométrico na região do ultravioleta a 220/275nm (método 4) já referenciado pelo Standard Methods² e o método espectrofotométrico na região do ultravioleta direto a 205nm (método 2) mostraram-se os mais adequados estatisticamente quanto à exatidão e precisão. Este último estará descrito na próxima edição do livro de Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz⁹, por apresentar, assim como o método 4, características de desempenho adequadas para determinação de nitrato em águas destinadas para o consumo humano, com baixo teor de matéria orgânica. Ambos, além de serem métodos de simples execução, utilizam reagente único e fornecem resultados rápidos, atendendo ao propósito dos laboratórios de saúde pública.

CONCLUSÃO

O método do ácido fenoldissulfônico (método 1), apesar de ser uma alternativa aos laboratórios que não dispõem de espectrofotômetro na região do ultravioleta, apresentou-se inadequado às finalidades pretendidas tanto pela avaliação dos parâmetros estatísticos como pela baixa operacionalidade do método que não permite resultados rápidos, utiliza-se de reagentes tóxicos e envolve várias etapas de reações, dificultando sua execução, o que pode levar a erros por parte do analista.

REFERÊNCIAS

1. Burden EHWJ. The toxicology of nitrates and nitrites with particular reference to the potability of water supplies. *Analyst* 1961; 86: 429-33.
2. American Public Health Association. Standard Methods for the examination of Water and Wastewater. 20^a ed. Washington (DC): APHA; 1999. p.1220.
3. Brasil, Leis, Decretos, etc. Portaria nº 518, de 25 de março de 2004. Diário Oficial, Brasília, 26 de março de 2004, seção I, p. 266-70. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativas ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade e dá outras providências.

4. Brasil, Leis, Decretos, etc. Resolução RDC nº 54 de 15 de junho de 2000. Diário Oficial, Brasília, 19 de junho de 2000, seção I, p. 37-8. Dispõe sobre o regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de água mineral natural e água natural.
5. Bouchard DC, Williams MD, Surampalli RY. Nitrate contamination of ground water sources and potencial health effects. *J Ame Water Works Assoc* 1992; 84: 85-90.
6. Belgrano RF, Colasurdo V, Diaz OA. Métodos ultravioleta selectivo y de reducción com hidracina em la determinación del ión nitrato an aguas subterranas. *Quim Nova* 2003; 26(5): 766-8.
7. Oliveira JJV, Vallilo MI, Pedro AR, Zenebon O. Estudo comparativo de métodos para determinação de nitrato em águas naturais. *Rev Inst Adolfo Lutz* 1987; 47 (1/2): 25-30.
8. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos físicos e químicos para análise de alimentos. 3ªed. São Paulo: O Instituto; 1985. p.533.
9. Instituto Adolfo Lutz. Grupo de Análise Físico-Química de Águas. In: Padronização de metodologia e validação de ensaios analíticos, São Paulo (SP); 2004.
10. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial [INMETRO]. Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos; 2002. p.31.
11. Leite F. Validação em análise química. In: 4ªed. Campinas (SP): Ed Atomo; 2002.
12. Soares LMV. Como obter resultados confiáveis em cromatografia. *Rev Inst Adolfo Lutz* 2001; 60 (1): 79-84.
13. Universidade Federal do Paraná. Controle de qualidade da água, Curitiba (PR): A Universidade; 1983.
14. Mazon EMA, Freitas VPS, Brígido BM, Badolato MIC. Avaliação das análises físico-químicas em águas para o consumo humano ano 2001. *Bol Inst Adolfo Lutz* 2003; ano 13(1): 13-6.
15. Caulcutt R, Boddy R. *Statistics for analytical chemists*, 1ª edição, Londres: Chapman and Hall; 1983. p.253.
16. Codex Alimentarius Commission. Criteria for evaluating acceptable methods of analysis for Codex purposes. Codex Committee on Methods of Analysis and Sampling, Documento CX/MAS 98/5; 1998.
17. Horwitz W, Kamps LR, Boyer KW. Quality assurance in the analysis of foods for trace constituents. *J Assoc Off Anal Chem* 1980; 63: 1344-1355.
18. Ribeiro Júnior JI. Análises estatísticas no Excel: guia prático, Viçosa (MG):Ed. UFV; 2004, p.250.
19. Tonks DB. *Quality control in clinical laboratories*, 2ª ed., Ontario: Warner-Chilcott, 1972, 34-7.

Mel com própolis: considerações sobre a composição e rotulagem

Honey added with propolis: composition and labeling considerations

RIALA6/1026

Alexandre BERA; Ligia B. ALMEIDA-MURADIAN*

* Endereço para correspondência: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP, Av. Prof. Lineu Prestes, 580 Bloco 14, CEP 05508900, São Paulo, SP, email: ligiabi@usp.br.
Recebido: 28/10/2004 – Aceito para publicação: 30/06/2005.

RESUMO

No Brasil não existem leis específicas para o controle de qualidade do mel adicionado de própolis, no entanto existem legislações que tratam das porções a serem utilizadas em alimentos e da rotulagem nutricional obrigatória. Em vista disso, o presente trabalho teve como objetivo principal comparar os valores declarados nos rótulos de amostras comerciais de méis com própolis no Estado de São Paulo com os resultados analíticos obtidos em laboratório, assim como verificar a concordância da rotulagem com legislação específica. Para tanto, onze amostras comerciais de mel com própolis, com carimbo do SIF ou SISP, foram analisadas. Das onze amostras analisadas de méis com própolis, somente cinco apresentaram informação nutricional obrigatória e destas somente duas estavam de acordo com os critérios exigidos pela legislação brasileira. A falta de rotulagem nutricional desses produtos reforça ainda mais a importância de se ter uma fiscalização eficiente para este tipo de produto.

Palavras-Chave. mel com própolis; rotulagem; análise de alimentos.

ABSTRACT

In Brazil there is no specific regulation for controlling the quality of propolis added-honey, but there are regulations which determine that all foods must be properly labeled for describing the nutritional composition. This label provides reference values for packaged food portions. For this reason, the main objective of this work was to assess the values displayed in labels of samples of propolis added-honey marketed in São Paulo State- Brazil, and to compare them with the values obtained by means of laboratory analysis, and also to verify whether they were in accordance with the labeling regulations. Eleven commercial samples of honey added with propolis which presented official marks of SIF or SISP (federal and or state inspection) were analyzed. The nutritional values exhibited in the labels were compared to those obtained from laboratory examination. Of eleven samples, five were properly labeled presenting the nutritional values, and only two of them were in accordance with Brazilian labeling legislation criteria. The lack of adequate nutritional labeling reinforces the importance in strengthen the inspection of this kind of product.

Key Words. honey with propolis, labeling, food analysis.

INTRODUÇÃO

Méis compostos são encontrados no mercado varejista, sendo o mel adicionado de própolis o de maior oferta. Estes tipos de méis compostos não apresentam legislação específica que determine os métodos de análise apropriados ou seu padrão de identidade e qualidade (PIQ). No entanto, todos são comercializados com a autorização do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e selo SIF (Serviço de Inspeção Federal). Existe legislação específica para mel puro (Instrução Normativa n.11, de 20 de Outubro de 2000)¹ e para a própolis pura (Instrução Normativa n.3 de 19 de janeiro de 2001)²,

mas não para a sua mistura. Não se sabe ao certo quais seriam as modificações na composição do mel quando é adicionado com a própolis, uma vez que esta é complexa, formada tipicamente por ceras, resinas, bálsamos e óleos essenciais de origem vegetal. Não existe, até o presente momento, referências bibliográficas nacionais ou internacionais a respeito da composição nutricional de mel com própolis.

Pela legislação brasileira, todos os alimentos são obrigados a apresentar rotulagem nutricional, ou seja, a declaração de valor calórico, nutrientes e componentes. No momento, as legislações vigentes, segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)³ são as Resoluções – RDC

nº359 e RDC nº360 de 23 de dezembro de 2003^{4,5}, que revogaram as Resoluções - RDC nº 39 e 40, de 21 de março de 2001^{6,7}. No entanto, existe um prazo para as empresas se adequarem à nova legislação de até 31 de julho de 2006. Quanto ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) foi publicada a Resolução nº 8 de 24/09/2001⁸ a qual define que compete ao Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA) e Serviços de Inspeção de Produtos de Origem Animal (SIPAs), a análise técnica e o registro da rotulagem de produtos de origem animal nos termos da legislação emitida pelo MAPA^{9,10}.

Neste trabalho foram realizadas análises físico-químicas de onze amostras comerciais de mel com própolis em relação aos componentes que devem ser declarados nos rótulos e foram comparados com a legislação brasileira em vigor na época da coleta de amostras^{6,7} e da legislação atual^{4,5}. As análises realizadas seguiram as metodologias oficiais preconizadas para o mel puro conforme Instrução Normativa n. 11 de 20 de outubro de 2000¹.

O presente trabalho teve como objetivo principal comparar os valores declarados nos rótulos de amostras comerciais de méis com própolis no Estado de São Paulo com os resultados analíticos obtidos em laboratório, assim como verificar a concordância da rotulagem com legislação específica.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

Foram adquiridas no mercado varejista onze amostras comerciais do Estado de São Paulo de méis com própolis no período de 2000 a 2002, sendo que as concentrações de própolis, declaradas nos rótulos, variaram de 0,2 a 0,5%.

Métodos

Açúcares redutores e sacarose aparente

Foi utilizado o método de Fehling, preconizado pela legislação brasileira⁵ que utiliza o método do Codex Alimentarius¹¹.

Determinação do extrato etéreo (gorduras totais)

A fração extrato etéreo foi determinada em extrator intermitente de Soxhlet, utilizando-se éter etílico como solvente¹².

Determinação do nitrogênio total/proteínas

O teor de nitrogênio total foi determinado pelo método Micro-Kjeldahl, utilizando-se o fator 6,25 para transformação deste em proteínas¹³.

Análise de teor alcoólico

A determinação da graduação alcoólica em graus Gay-Lussac (°GL) foi realizada no ebuliômetro (modelo 3300-3,

marca Leonardo), onde uma solução de mel com própolis é adicionada e a leitura é feita no termômetro acoplado ao aparelho.

Cálculo do valor energético

O valor energético (energia total metabolizável) foi calculado a partir da energia procedente dos nutrientes, considerando os fatores de conversão de Atwater segundo recomendação da Tabela de Composição de Alimentos da Universidade de São Paulo¹⁴ que utiliza as seguintes fórmulas:

Energia total metabolizável, expressa em kilocalorias (kcal) = (4 x g proteína) + (4 x g carboidratos (total carboidratos - fibra alimentar) + (9 x g total lipídios) + (7 x g etanol).

Energia total metabolizável expressa em kilojoule (kJ) = (17 x g proteína) + (16 x g carboidratos (total carboidratos - fibra alimentar) + (37 x g total lipídios) + (29 x g etanol)

$$1\text{kcal}=4.184\text{kJ}.$$

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Verificação da concordância da rotulagem dos produtos com a legislação brasileira

Para a comercialização deste tipo de produto se faz necessário o carimbo de inspeção que pode ser federal (SIF), estadual (SISP) ou municipal (SIM), indicando que as empresas responsáveis pelos produtos são fiscalizadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Das onze amostras comerciais analisadas dez apresentaram o carimbo do SIF (Serviço de Inspeção Federal) e uma apresentou o carimbo do SISP (Serviço de Inspeção do Estado de São Paulo), estando todas de acordo com as normas vigentes^{8,15,16}.

Segundo a Resolução RDC nº. 40⁷ todos os alimentos são obrigados a apresentar rotulagem nutricional. Esta norma encontra-se em vigor até 31 de julho de 2006 e, portanto, é a que estava em vigor na época da coleta das amostras. Nesta Resolução exige-se a declaração do valor calórico (em kcal/g), carboidratos, proteínas, gorduras totais, gorduras saturadas, colesterol, fibras alimentares, sódio, cálcio e ferro. Já a RDC 360⁵, que é a norma atual, exige a declaração do valor energético (kcal e kJ), carboidratos, proteínas, gorduras totais, gorduras saturadas, fibra alimentar e sódio. Segundo a Resolução nº8 de 24/09/2001⁸, os alimentos de origem animal devem ser enquadrados conforme as leis de rotulagem estabelecidas pela ANVISA para todos os alimentos.

Apesar da obrigatoriedade da rotulagem nutricional, somente cinco (amostras 2,3,4,8,11) das onze amostras analisadas apresentaram esta declaração no rótulo.

Comparação dos valores declarados na rotulagem com os resultados analisados

A comparação dos valores declarados na informação nutricional das amostras comerciais com os valores obtidos experimentalmente estão apresentados nas Tabelas de 1 e 2.

Em relação ao valor calórico, (Tabela 1) observa-se que as amostras 3 e 4 estariam em desacordo com esta legislação vigente^{4,6}, pois apresentaram seus valores expressos em g/10g ao invés de kcal/20mL e porcentagem ao invés de g/20 mL. A porção de 20 mL é a recomendada pelas Resoluções 39 e 359^{4,6} o que equivale a uma colher de sopa. Neste caso, os valores das amostras (Tabela 1) foram corrigidos pelos autores, para a

porção de 20mL, para efeito de comparação. No cálculo do valor energético utilizou-se o valor zero para a contribuição do etanol, uma vez que este foi o resultado das análises de todas as amostras.

Na declaração simplificada de nutrientes recomendada pela ANVISA³ devem-se colocar, além do valor calórico, carboidratos, proteínas, gorduras totais e sódio, assim como os valores diários de referência com base em uma dieta de 2.500 calorias. Somente duas amostras (2 e 8) apresentaram esta informação no rótulo. Os resultados do valor calórico da Tabela 1 foram calculados também em kJ para atender a Resolução 360⁵.

Tabela 1. Comparação entre os valores declarados (valor calórico) nos rótulos e valores obtidos.

Tipo de análise	Valor declarado		Valor médio obtido	
	Valor calórico	(Kcal/20 mL)	(Kcal/20 mL)	(KJ/20mL)
Amostra 1		nd	87	364
Amostra 2		100	89	372
Amostra 3		85	81	339
Amostra 4		78 a 86	76	318
Amostra 5		nd	77	322
Amostra 6		nd	78	326
Amostra 7		nd	73	305
Amostra 8		70	81	339
Amostra 9		nd	79	330
Amostra 10		nd	76	318
Amostra 11		90	87	364

n = 3.

nd = não declarado.

Rótulo padrão (declaração simplificada) ANVISA = 90 kcal/20 mL.

Tabela 2. Comparação entre os valores declarados para carboidratos, proteínas, gorduras totais, nos rótulos e valores obtidos.

Tipo de análise	Carboidratos		Proteínas		Gorduras totais	
	Valor declarado	Valor médio obtido	Valor declarado	Valor médio obtido	Valor declarado	Valor médio obtido
Amostras	(g/20 mL)	(g/20 mL)	(g/20 mL)	(g/20 mL)	(g/20 mL)	(g/20 mL)
1	nd	21	Nd	0,18	nd	0,07
2	25	22	0	0,17	0	0,06
3	21	20	0,05	0,15	0,05	0,05
4	17 a 19	19	0,15 a 0,78	0,09	0,05 a 0,52	0,01
5	nd	19	nd	0,09	nd	0,11
6	nd	19	nd	0,12	nd	0,06
7	nd	18	nd	0,18	nd	0,06
8	16	20	0	0,17	0	0,04
9	nd	20	nd	0,19	nd	0,14
10	nd	20	nd	0,15	nd	0,20
11	23	21	0	0,18	0	0,07

n = 3.

nd = não declarado.

Rótulo padrão (declaração simplificada) ANVISA = 23 g/20 mL.

Tabela 3. Resultados das análises físico-químicas das amostras de mel puro e com própolis

Parâmetro	MEL*	MEL + 2% de própolis*
Valor calórico (kcal/20mL)	77,39 ^a ± 0,91	77,19 ^a ± 0,50
Valor calórico (kJ/20mL)	309,99 ^a ± 3,83	304,88 ^a ± 1,99
Açúcares redutores (%)	71,83 ^a ± 0,81	71,29 ^a ± 0,4
Sacarose aparente (%)	1,44 ^a ± 0,02	1,45 ^a ± 0,01
Carboidratos (%)	73,27 ^a ± 0,83	72,74 ^a ± 0,42
Proteínas (%)	0,22 ^a ± 0,02	0,55 ^b ± 0,038
Gorduras totais(%)	0,41 ^a ± 0,03	0,41 ^a ± 0,01

*média ± desvio padrão, n = 3

Valores com letras iguais não possuem diferenças significativas a nível 5%.

No rótulo da amostra n°. 4, pode-se notar (Tabelas 1 e 2) que o fabricante apresenta uma margem de variação para os valores nutricionais em vez de um valor só estando em desacordo com a legislação vigente^{5,7}.

Todas as amostras apresentaram valores obtidos por análise laboratorial próximos aos valores declarados (Tabelas 1 e 2), assim como os sugeridos pela ANVISA³ no rótulo padrão de mel.

Na rotulagem de duas amostras (amostras 8 e 10) não foi declarado a concentração de própolis adicionado ao mel. As amostras 1, 2, 3, 4, 5 e 9 declararam adição de 0,2% de extrato de própolis nas amostras. Já as amostras 6 e 7 declararam adição de 0,5% de extrato de própolis.

As onze amostras foram comerciais e, portanto não se sabe a composição inicial do mel utilizado. Na tentativa de um esclarecimento, foi então efetuada uma análise de mel puro, recém extraído do favo, na qual foi adicionado 0,2% de extrato alcoólico de própolis (extração realizada seguindo a metodologia normalmente utilizada na indústria). Os resultados estão apresentados na Tabela 3.

Observando-se a Tabela 3 podemos notar que a adição de 2% de extrato alcoólico de própolis não causou mudança significativa nos seguintes valores: valor calórico, carboidratos (açúcares redutores e sacarose aparente) e gorduras. No entanto, a adição de própolis aumentou o valor de nitrogênio total que foi convertido para proteínas pelo fator 6,25. Este aumento de proteínas poderia também ser oriundo de outras fontes nitrogenadas da própolis. Segundo trabalho de Santos et al.¹⁷, o resíduo da extração alcoólica da própolis tem 19,36% de proteína bruta. Portanto conclui-se que o aumento do valor protéico do mel composto vem da adição da própolis.

É importante que haja uma norma de padrão de identidade e qualidade para que este tipo de produto, amplamente comercializado, possa ter um controle mais rigoroso e uma fiscalização adequada. A mistura do mel com própolis, sem o devido controle de qualidade poderia mascarar o uso de um mel e até mesmo da própolis de baixa qualidade ou adulterados.

CONCLUSÕES

Das onze amostras analisadas de méis com própolis, somente cinco apresentaram informação nutricional obrigatória e destas somente duas estavam de acordo com os critérios exigidos pela legislação brasileira. A falta de rotulagem nutricional desses produtos reforça ainda mais a importância de se ter uma fiscalização eficiente para este tipo de produto.

REFERÊNCIAS

1. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa n.11, de 20 de Outubro de 2000. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Mel. [online] Disponível em: URL: <http://oc4j.agricultura.gov.br/agrolegis/do/consultaLei?op=viewTextual&codigo=7797>. 20 de abril de 2005.
2. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa n.3 de 19 de janeiro de 2001. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Apitoxina, Cera de Abelha, Geléia real, geléia real liofilizada, pólen apícola, própolis e extrato de própolis..[online] Disponível em: URL: <http://oc4j.agricultura.gov.br/agrolegis/do/consultaLei?op=viewTextual&codigo=1798>. 20 de abril de 2005.
3. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Rotulagem Nutricional Obrigatória. [online] Disponível em: URL: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/rotulos/acucar/mel.htm>. 20 de abril de 2005.
4. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria da Vigilância sanitária. Resolução - RDC nº 359, de 23 de dezembro de 2003. Regulamento técnico de porções de alimentos embalados para fins de rotulagem nutricional. [online] Disponível em: URL: <http://elegis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=9058&word=>. 20 de abril de 2005.
5. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria da Vigilância sanitária. Resolução - RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003. Regulamento técnico sobre rotulagem nutricional de alimentos embalados. [online] Disponível em: URL: <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=9059>. 20 de abril de 2005.
6. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 39, de 21 de março de 2001. Regulamentos técnicos de Valores de Referência para Porções de Alimentos e Bebidas Embalados para Fins de Rotulagem Nutricional. [online] Disponível em: URL: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/39_01rdc.htm. 20 de abril de 2005.

7. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria da Vigilância sanitária. Resolução - RDC nº 40, de 21 de março de 2001. Regulamento Técnico para Rotulagem Nutricional Obrigatória de Alimentos e Bebidas Embalados. [online] Disponível em: URL: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/40_01rdc.htm. 20 de abril de 2005.
8. Brasil, etc. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Resolução nº 08 de 24 de setembro de 2001 da Secretaria da Defesa Agropecuária do Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Resolve sobre análise técnica e o registro da rotulagem de produtos de origem animal. [online] Disponível em: URL: <http://oc4j.agricultura.gov.br/agrolegis/do/consultaLei?op=viewTextual&codigo=5853>. 20 de abril de 2005.
9. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Agricultura e Abastecimento. Decreto nº 36.964, de 23 de junho de 1993. Dispõe sobre a prévia inspeção sanitária e industrial de produtos de origem animal. [online] Disponível em: URL: <http://www.cda.sp.gov.br/legislacao/index.php?action=info&idleg=94>. 20 de abril de 2005.
10. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Portaria nº371 de 4/09/1979. Regulamento Técnico para Rotulagem de Alimentos Embalados. [online] Disponível em: URL: <http://oc4j.agricultura.gov.br/agrolegis/do/consultaLei?op=viewTextual&codigo=3195>. 20 de abril de 2005.
11. Codex Alimentarius Commission. Codex standards for sugars (honey), Rome: FAO, 1990, 21p.
12. Instituto Adolfo Lutz. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. São Paulo: IAL, 1985, 533pp.
13. Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis. 16th ed. Arlington: AOAC, 1998.
14. Universidade de São Paulo (USP). Tabela Brasileira de Composição de Alimentos. [online] Disponível em: URL: <http://www.fcf.usp.br/Tabela/> 20 de abril de 2005.
15. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Agricultura e Abastecimento. Resolução SAA nº 24, de 01 agosto de 1994. Dispõe sobre as normas técnicas de produção e classificação dos produtos de origem animal e as relativas às atividades de fiscalização e inspeção dos produtos de origem animal. [online] Disponível em: URL: <http://www.cda.sp.gov.br/legislacao/index.php?action=view&idleg=33>. 20 de abril de 2005.
16. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Agricultura e Abastecimento. Lei nº 8.208, de 30 de dezembro de 1992. Dispõe sobre a prévia inspeção sanitária dos produtos de origem animal, institui taxas e dá outras providências. [online] Disponível em: URL: <http://www.cda.sp.gov.br/legislacao/index.php?action=info&idleg=23>. 20 de abril de 2005.
17. Santos AV, Teixeira AS, Rodrigues PB, Freitas RTF, Guimarães AM, Giacometti RA. Valor nutritivo do resíduo de própolis para frangos de corte. *Ciênc Agrotec* 2003, 27(5):1152-9.

The occurrence of *Aeromonas* spp in drinking water

Ocorrência de *Aeromonas* spp em água de consumo humano

RIALA6/1027

Terumi Oyama FUZIHARA^{1*}; Beatriz PISANI²; Marise SIMÕES²; Berenice Mandel BRÍGIDO²; Christina LEOPOLDO E SILVA²; Lúcia VANNUCCI¹; Kioka ARIOSHI¹

* Endereço para correspondência: Instituto Adolfo Lutz, Laboratório I de Santo André, Av. Ramiro Colleoni, 240, Vila Dora, Santo André – SP, CEP 09291 – 211. E- mail: tfuzihara@uol.com.br

¹ Instituto Adolfo Lutz, Laboratório I de Santo André

² Instituto Adolfo Lutz, Laboratório I de Campinas

Recebido: 09/12/2004 – Aceito para publicação: 19/05/2005

RESUMO

A ocorrência de *Aeromonas* spp móveis foi verificada em um total de 730 amostras de água de consumo humano de diferentes origens, sendo 495 da rede de abastecimento público tratada, 208 de soluções alternativas (compreendendo 65 de poços artesianos, 69 de poços rasos, 74 de minas), além dessas foram analisadas 27 amostras de água mineral envasada. Os resultados mostraram que 6,3%, 55,3% e 11,1% das amostras de água da rede de abastecimento público tratada, soluções alternativas e água mineral envasada estavam contaminadas com *Aeromonas* spp, respectivamente. Verificou-se que nem sempre a ocorrência de *Aeromonas* estava associada à presença de indicadores fecais. Das 613 cepas de *Aeromonas* isoladas 75,4% pertenciam a espécie *Aeromonas hydrophila*, seguidos por 9,8% de *Aeromonas caviae* e 0,6% de *Aeromonas sobria*. Estes achados mostram que estudos adicionais são necessários para avaliar possíveis riscos que a presença de *Aeromonas* spp poderia acarretar à saúde pública.

Palavras-Chave. *Aeromonas* spp, água tratada, fontes alternativas, água mineral engarrafada.

ABSTRACT

The presence of motile *Aeromonas* spp was investigated in a total of 730 samples of drinking water from different origins: 495 samples from the treated water distribution system, 208 from alternative water supply (65 from artesian wells, 69 from shallow wells, and 74 from springs), and 27 samples of bottled mineral water. The present study indicated that 6.3%, 55.3% and 11.1% of samples from treated water distribution system, alternative water supply, and bottled mineral water were contaminated with *Aeromonas* spp, respectively. The highest counts of *Aeromonas* spp were not always associated to the presence of faecal indicators. *Aeromonas hydrophila* was the most frequently isolated phenospecies in water, followed by *Aeromonas caviae* (9.8%) and *Aeromonas sobria* (0.6%). These findings show that further studies are necessary to evaluate the possible risks that the occurrence of *Aeromonas* spp may pose to public health.

Key Word. *Aeromonas* spp, treated water, alternative water supply systems, bottled mineral water.

INTRODUCTION

The genus *Aeromonas* currently belongs to the family *Aeromonadaceae*, and is characterized as short, Gram negative, oxidase – positive, rod - shaped bacteria, which metabolise glucose by both the respiratory and fermentative pathways and show resistance to the vibriostatic agent O/ 129¹. It can be divided into two groups: the first includes the psychrotrophic *Aeromonas*, represented by *Aeromonas salmonicida* and the second, by the mesophyllic *Aeromonas*².

The taxonomy of *Aeromonas* is under constant development, until the last decade only 14 different species³ were known. From these, six species are considered to be clinically important: *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. veronii*, *A. sobria*, *A. jandaei* and *A. schubertii*⁴. Recently, *A. molluscorum*⁵, *A. culicicola*⁶ and *A. simiae*⁷ were isolated from bivalve mollusks, midgut of *Culex quinquefasciatus* and monkey faeces, respectively. Those organisms cause extra-intestinal (endocarditis, peritonitis, septicaemia) and intestinal infections in children and immunocompromised patients, being considered

as opportunistic pathogens⁸. However, epidemiological studies indicated that *Aeromonas* spp can also act as primary etiological agents of gastroenteritis⁹. Knøchel; Jeppesen¹⁰; Kühn et al.¹¹, and Ørmen; Østensvik¹², verified that some species of *Aeromonas* spp are carriers of certain virulence factors, which are responsible for their survival, adhesion and colonization of the intestinal mucous membrane, leading to gastrointestinal disorders.

Aeromonas species are widely spread in nature, especially in aquatic environments. These microorganisms have frequently been isolated from surface¹³ and subterranean^{14,15} waters and from the water distribution system, both of treated and untreated drinking water¹¹ and even from biofilms¹⁶. This observation is a cause of concern, since *Aeromonas* could survive in the biofilms and, under certain conditions, such as low chlorine concentrations, high pH and low temperatures, these organisms multiply and spread through the water distribution network¹⁷, exposing the consumer to health risks. Drinking water is considered to be one of the possible sources of diarrheagenic strains of *Aeromonas*^{4,18}.

Considering these facts, the evaluation of the presence of these bacteria in human drinking water is an important aspect of public health, since national studies on this theme are scarce. Thus, the objective of this study was to verify the occurrence of *Aeromonas* spp in human drinking water sent to the laboratory by municipal sanitary inspection agencies.

MATERIALS AND METHODS

Samples

In this study, water samples were collected by municipal sanitary inspection agencies attended by laboratories I in Campinas and in Santo André. Laboratory I in Campinas examined 348 water samples, including 212 from the public distribution network, 27 of bottled mineral water and 136 from other water systems (18 artesian wells, 34 shallow wells, 57 springs). Laboratory I in Santo André analysed 382 samples, 283 from the public distribution network and 99 from other water systems (47 artesian wells, 35 shallow wells and 17 springs). Treated water samples were collected aseptically in 500ml sterile flasks containing 0.1 ml of 10% solution of sodium thiosulphate per 100 ml water. All the water samples were delivered to the laboratories in isothermal boxes and analysed within 24 hours after collection. Water from mineral springs was sent to laboratory I in Campinas in various types of packaging, such as: PVC, polyethylene, glass and polycarbonate. These packages were originally used by the bottling unit and had different volumes. Each sample consisted of 5 units with the same filling date. In the laboratory, 100 ml was withdrawn from each unit and poured into a sterile flask and the analysis was carried out on a composite sample, according to Food Microbiology Committee – Instituto Adolfo Lutz¹⁹.

Methods

Determination of water quality indicators.

Coliforms and faecal coliforms were determined for each water sample according to Standard Methods²⁰, using m - Endo Agar LES (Difco – Detroit - MI) incubated at 35°C and m – FC agar (Difco – Detroit - MI) incubated at 45°C, respectively. All bacteria that produced red colonies with a metallic sheen within 24h incubation on m – Endo Agar LES were considered members of the coliform group. Colonies produced by faecal coliform bacteria on m – FC agar were blue. Determination of the possible presence of *E. coli* was conducted by selecting a well – isolated colony and inoculating into a Bac – tray system (Difco – Detroit – MI).

Procedures for the isolation of *Aeromonas* spp.

The membrane filtration technique proposed by Havelaar et al.²¹ was used. The volume of water filtered varied according to the origin of the water. A volume of 100 ml was filtered for waters obtained from the public distribution network, artesian wells and bottled mineral water. For those obtained from shallow wells and springs three different volumes were filtered: 100 ml, 10 ml and 0.1 ml. In order to filter volumes of 10 ml and 0.1 ml, 20 ml of sterile dilution water was added to the filter before filtering the sample. Samples were filtered through cellulose ester membranes with pore size equal to 0.45 µm (Millipore São Paulo) and the membrane then transferred to a Petri dish containing ampicillin-dextrin agar. After incubation at 30°C/24h, brilliant yellow colonies were counted.

Identification of *Aeromonas* spp.

Typical, representative colonies were transferred to trypticase agar (TSA) (Difco/Detroit–MI) and *Aeromonas* Hydrophila medium (AH)²² slants for the presumptive identification of *Aeromonas* spp. After incubation at 30°C/24h, cultures presenting an acid butt (yellow or greyish yellow) with an alkaline (purple) band at the slant, positive motility (turbid), production of indol after the addition of Kovacs reagent and positive oxidase test in AH medium, were presumptively considered as *Aeromonas* spp. Using the TSA cultures, suspect strains were then submitted to confirmation using the following tests: Gram stain, sensitivity to the vibriostatic agent O/129, nitrate reduction, acetoin production, oxidative/fermentative metabolism according to Hugh-Leifson, growth at 37°C and in 0%, 3% and 6% sodium chloride solutions, fermentation of sucrose, salicin, arabinose, arginine and lysine, production of gas from glucose, hydrolysis of esculin, Camp test²³ and presence of monotrichous flagellum. Final count was calculated based on the proportion of suspect colonies confirmed as *Aeromonas* spp. and expressed as CFU/100 ml water.

RESULTS AND DISCUSSION

Table 1 shows the data for the occurrence of *Aeromonas* spp. in drinking water from different origins. In treated water

from the public distribution network, 6.3% of the total of 495 samples was contaminated with *Aeromonas* spp., with counts ranging from 1 to 3.0×10^2 CFU/100 ml water (Table 2). Krovacek et al.²⁴ obtained higher values, equal to 85%, with populations of up to 8.6×10^2 CFU/100ml treated water. Other authors, such as Khun et al.¹¹ and Gavriel et al.²⁵ have also shown the presence of these microorganisms in treated water.

According to Van Der Kooij; Hijinen²⁶, the frequent isolation of *Aeromonas* from treated water is due to the difficulty in maintaining an adequate level of residual chlorine in the water distribution network. In addition, some studies such as that of Sisti et al.²⁷, showed that the bactericidal action of chlorine compounds was strongly influenced by temperature: the efficiency of chlorine at 20°C was two to three times lower than

that observed at 5°C.

Still in relation to treated water, it was observed that the isolation of *Aeromonas* in this type of water was not necessarily associated with the presence of the traditionally used faecal indicators.

In the present study, of the 495 samples examined, 3.2% contained total coliforms and 0.4% *Escherichia coli* (Table 1). These findings are in agreement with the observations of Burke et al.²⁸ in Australia and of Legnani et al.¹⁴ in Italy, who isolated *Aeromonas* from treated water in which faecal indicators were absent.

Drinking water samples from the other water systems presented high rates of *Aeromonas* isolation. From 208 samples analysed, 55.3% were contaminated with *Aeromonas* spp. From

Table 1. Frequency of drinking water samples positive for *Aeromonas* spp., total coliforms and *E. coli* in the cities attended by the Laboratories I in Campinas and in Santo André.

Water origin	Laboratories I	No. of samples	<i>Aeromonas</i> spp		Total coliforms		<i>E. coli</i>	
			No.	%	No.	%	No.	%
PDN*	Campinas	212	16	7.5	09	4.2	01	0.5
	Santo André	283	15	5.3	07	2.5	01	0.4
Total 1		495	31	6.3	16	3.2	02	0.4
Other water systems								
Artesian wells	Campinas	18	08	44.4	06	33.3	02	11.1
	Santo André	47	19	40.4	08	17.0	02	4.3
Sub-total 1		65	27	41.5	14	21.5	04	6.2
Shallow wells	Campinas	34	27	79.4	24	70.6	02	6.0
	Santo André	35	16	45.7	15	43.0	05	14.3
Sub-total 2		69	43	62.3	39	56.5	07	10.1
Springs	Campinas	57	35	61.4	32	56.1	06	10.5
	Santo André	17	10	59.0	09	53.0	06	35.3
Sub-total 3		74	45	61.0	41	55.4	12	16.0
Total 2		208	115	55.3	94	45.2	23	11.0
Bottled mineral water	Campinas	27	03	11.1	01	3.7	-	-
	Santo André	-	-	-	-	-	-	-
Total 3		27	03	11.1	01	3.7		
Total		730	149	20.4	111	15.2	25	3.4

*PDN = public distribution network

these, 41.5% were from artesian wells, 62.3% from shallow wells and 61.0% from springs (Table 1).

In this study, the minimum counts of *Aeromonas* spp. isolated from water collected from artesian wells, shallow wells and springs was equal to 5 CFU/100 ml water, and the maximum counts obtained were 2.3×10^3 , 5.0×10^4 and 1.5×10^4 CFU/100 ml water, respectively (Table 2).

Kipperman et al.²⁹ and Krovacek et al.³⁰ investigated water supplies involved in outbreaks of diarrhoea and found *Aeromonas* populations varying from 1.0×10^2 – 6.4×10^4 CFU/100 ml. The levels found in this study are within this range.

A comparative analysis of the data found in Table 1 for waters from other water systems showed that the highest rates for the isolation of *Aeromonas* were found in water from shallow wells (62.3%) and springs (61.0%). These water supplies are highly susceptible to contamination due to the lack of protection factors, as observed in the majority of systems studied. In addition, shallow wells show a maximum depth of 15 metres, and springs emerge on to the surface, being subsequently piped. In such circumstances, the filtrating power of the soil is limited and water sources are exposed to contamination,

especially from waters flowing along the surface and those that infiltrate the soil and reach the watertable. Geldreich³¹ stated that water flowing on the surface is the main factor contributing to the deterioration in microbiological quality of subterranean water, making it a consumer health risk.

Table 1 also shows good correlation between the detection of *Aeromonas* and total coliforms, especially for water from shallow wells and springs, although such an association was not observed for *E. coli*. Similarly, Massa et al.¹⁵ did not report such correlation, either.

With respect to the total coliform and *E. coli* populations, both of them varied from 5 to 1.1×10^5 CFU/100 ml of water from other water systems (Table 2).

As for the legal regulations in effect in Brazil (Regulation 518/GM)³², that determines the absence of *E. coli* and thermotolerant coliforms in 100 ml water in the public distribution network or other water systems, excluding bottled waters, it was observed that only 0.4% of the network water and 11% from the other water systems could be considered unacceptable for human consumption due to the presence of *E. coli* (Table 1). However, 55.3% of the waters from the other water systems

Table 2. Distribution of the minimum and maximum counts of *Aeromonas* species, total coliforms and *E. coli* for positive samples of drinking water in the cities attended by the Laboratories I in Campinas or in Santo André**.

Water origin	<i>Aeromonas</i> Counts CFU/100ml		Total coliforms Counts CFU/100ml		<i>E. coli</i> Counts CFU/100ml	
	Minimum	Maximum	Minimum	Maximum	Minimum	Maximum
PDN*	1	3.0×10^2	01	1.4×10^2	10	5.0×10
Artesian wells	5	2.3×10^3	05	8.0×10	05	5.0×10
Shallow wells	5	5.0×10^4	10	1.1×10^5	10	1.1×10^5
Springs	5	1.5×10^4	05	1.1×10^4	15	1.1×10^4
Bottled mineral water	2	3.0×10^2	60	6.0×10	0	0

*PDN = public distribution network

** = minimum and maximum counts used correspond, respectively, to the lowest and greatest count obtained in one of the laboratories I (in Campinas or in Santo André)

Table 3. Distribution of the number and percentage of *Aeromonas* species isolated in samples of drinking water in the cities attended by the Laboratories I in Campinas and in Santo André.

Water origin	Strains of <i>Aeromonas</i> spp		Confirmed strains						
			<i>A. hydrophila</i>		<i>A. caviae</i>		<i>A. sobria</i>		
	n.	%	n.	%	n.	%	n.	%	
PDN*	110	13	11.8	78	70.9	19	17.3	-	-
Artesian wells	167	15	9.0	149	89.2	03	1.8	-	-
Shallow wells	185	35	19.0	122	66.0	26	14.0	02	1.0
Springs	148	24	16.2	110	74.3	12	8.1	02	1.4
Bottled mineral water	03	-	-	03	100.0	-	-	-	-
Total	613	87	14.2	462	75.4	60	9.8	04	0.6

*PDN = public distribution network

were contaminated with *Aeromonas* (Table 1), the majority of the samples presenting counts of about 10^4 CFU/100 ml water (Table 2).

Since the eighties, scientists in various countries, such as Burke et al.²⁸, in Australia and LeChevallier et al.³³, in the USA, have questioned the adequacy of water quality control from a bacteriological point of view, based only on faecal indicators. In the USA, *Aeromonas* has been included in the list of emerging pathogens and research on this microorganism has intensified in recent years³⁴.

In relation to bottled mineral water, 3 (11.1%) of the 27 samples contained *Aeromonas* (Table 1), with counts varying from 2 to 3.0×10^2 CFU/100ml water (Table 2). Researchers from various other countries have isolated *Aeromonas* spp. from bottled mineral water, such as Slade et al.³⁵, in Saudi Arabia, Gonzalez et al.³⁶, in Spain and Tsai & Yu³⁷, in Taiwan. Contamination of mineral water by *Aeromonas* can occur at the source or during bottling. Brandi et al.³⁸ isolated *Aeromonas* from bottled mineral water samples stored for more than 100 days. According to Kersters et al.³⁹, *Aeromonas* can multiply in water with low concentrations of nutrients, reaching large population numbers and becoming a health risk to consumer.

Table 1 also shows that only 1 (3.7%) of the 27 samples of bottled mineral water was positive for total coliforms without presenting *E. coli*. Similarly, Alves et al.⁴⁰ found only 1 in 18 samples of bottled mineral water contaminated with total coliforms.

The updated and improved Brazilian regulation controlling mineral waters (Resolution RDC 54)⁴¹ still does not include *Aeromonas* among the parameters to be analysed in quality control of this product. Some international legislations for mineral waters have contemplated *Aeromonas hydrophila* amongst the parameters required for their quality control. For example, Italian law (GUDRI)⁴² has established maximum numbers for *Aeromonas hydrophila* in the spring and during trade equal to, respectively, 10 and 1.0×10^2 CFU/100 ml mineral water.

Table 3 shows that *A. hydrophila* predominated amongst the mobile *Aeromonas* species, representing 75.4% of the total number of strains identified as *Aeromonas* spp., followed by *A. caviae* (9.8%) and *A. sobria* (0.6%). The remaining 87 (14.2%) strains classified as *Aeromonas* spp. in this study showed diversified behaviour in some of the biochemical tests. In Holland, different from our results, *A. caviae* was the most frequently isolated biotype, both in faeces and in drinking water⁴³. However, in Denmark, Knøchel & Jeppesen¹⁰ also isolated a high percentage of *A. hydrophila* (97%) and only 3% *A. sobria* in drinking water.

Results obtained in this study indicate that drinking waters, particularly those that are not systematically treated, may pose a risk to consumers.

It is recommended that some segments of the population, such as children, the elderly and immunocompromised avoid the consumption of untreated water that come from other systems.

REFERENCES

1. Kirow SM. *Aeromonas* and *Plesiomonas* species. In: Doyle MP, Beuchat LR, Montville TJ, editors. Food Microbiology Fundamentals and Frontiers. Washington: ASM Press; 1997. p. 265 – 87.
2. Poppoff M. Genus III. *Aeromonas kluver* and van Niel 1936, 1938 In: Krieg NR, Holt JG, editors. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol.1. Baltimore: Williams and Wilkins; 1984. p. 545 – 48.
3. Joseph SW, Carnahan AM. Update on the genus *Aeromonas*. American Society for Microbiology News 2000; 66: 218-23.
4. Janda JM, Abbott SL. Evolving concepts regarding the genus *Aeromonas*: an expanding panorama of species, disease presentations and unanswered questions. Clin Infect Dis 1998; 27: 332 – 44.
5. Minana – Galbis D, Farfan M, Fuste MC, Loren JG. *Aeromonas molluscorum* sp nov, isolated from bivalve molluscs. Int J Syst Evol Microbiol 2004; 54(Pt 6): 2073 – 8.
6. Pidiyar V, Kaznowski A, Narayan NB, Patole M, Shouche YS. *Aeromonas culicicola* sp nov, from the midgut of *Culex quinquefasciatus*. Int J Syst Evol Microbiol 2002; 52(Pt 5): 1723 – 28.
7. Harf – Monteil C, Flèche AL, Riegel P, Prévost G, Bermond D, Gremont PA, et al. *Aeromonas simiae* sp nov, isolated from monkey faeces. Int J Syst Evol Microbiol 2004; 54(Pt 2): 481 – 5.
8. Janda JM. Recent advances in the study of the taxonomy, pathogenicity, and infectious syndromes associated with the genus *Aeromonas*. Clin Microbiol Rev 1991; 4: 397-410.
9. Merino S, Rubires X, Knøchel S, Tomás JM. Emerging pathogens: *Aeromonas* spp. Int J Food Microbiol 1995; 28:157 – 68.
10. Knøchel S, Jeppesen C. Distribution and characteristics of *Aeromonas* in food and drinking water in Denmark. Int J Food Microbiol 1990; 10:317 – 22.
11. Kühn I, Allestam G, Huys G, Jansen P, Kersters K, Krovacek K, et al. Diversity, persistence, and virulence of *Aeromonas* strains isolated from drinking water distribution systems in Sweden. App Environ Microbiol 1997; 63(7): 2708 – 15.
12. Ørmen Ø, Østensvik Ø. The occurrence of aerolysin- positive *Aeromonas* spp and their cytotoxicity in norwegian water sources. J App Microbiol 2001; 90:797 – 802.
13. Leitão MFF, Silveira NFA. *Aeromonas* spp e *Plesiomonas shigelloides* na água, pescado e hortaliças, no Estado de São Paulo. Colet ITAL 1991; 21(1): 90 – 9.
14. Legnani P. The occurrence of *Aeromonas* species in drinking water supplies of an area of the Dolomite Mountains, Italy. J App Microbiol 1998; 85: 271 – 6.
15. Massa S, Altieri C, D'Angela A. The occurrence of *Aeromonas* spp in natural mineral water and well water. Int J Food Microbiol 2001; 63: 169 – 73.
16. Chauret C, Volk C, Creason R, Jarosh J, Robinson J, Waenes C. Detection of *Aeromonas hydrophila* in a drinking water distribution system: a field and pilot study. Can J Microbiol 2001; 47: 782 – 6.
17. Massa S, Armuzzi R, Tosques M, Cangarella F, Trovatelli LD. Note: Susceptibility to chlorine of *Aeromonas hydrophila* strains. J App Microbiol 1999; 86:169 – 73.
18. Wadström T, Ljungh A. *Aeromonas* and *Plesiomonas* as food- and waterborne pathogens. Int J Food Microbiol 1991; 12:303 – 12.
19. São Paulo (Estado). Portaria, de 07 de novembro de 1995. Comissão técnica de microbiologia alimentar do Instituto Adolfo Lutz. Diário Oficial [do] Estado de São Paulo, Poder Executivo, São Paulo, SP, 08 nov. 1995. Seção 1, p.16.
20. American Public Health Association. Standard methods for the examination of water and wastewater. 18th ed, Washington: The Association; 1992. p.9-54-62.
21. Havelaar AH, During M, Versteegh JFM. Ampicillin-dextrin agar medium for the enumeration of *Aeromonas* species in water by membrane filtration. J Appl Bacteriol 1987; 62: 279 – 87.
22. Kaper J, Seidler RJ, Lockman H, Colwell RR. Medium for the presumptive identification of *Aeromonas hydrophila* and *Enterobacteriaceae*. Appl Environ Microbiol 1979; 38: 1023 – 6.

23. Figura N, Guglielmetti P. Differentiation of motile and mesophilic *Aeromonas* strains into species by testing for a camp-like factor. *J Clin Microbiol* 1987; 25(7):1341 - 2.
24. Krovacek K, Faris A, Baloda SB, Lindberg T, Peterz M, Månsson I. Isolation and virulence profiles of *Aeromonas* spp from different municipal drinking water supplies in Sweden. *Food Microbiol* 1992; 9: 215 - 22.
25. Gavriel AA, Landre JP, Lamb AJ. Incidence of mesophilic *Aeromonas* within a public drinking water supply in north-east Scotland. *J Appl Microbiol* 1998;84:383 - 92.
26. Van Der Kooij D, Hijnen WAM. Nutritional versatility and growth kinetics of an *Aeromonas hydrophila* strain isolated from drinking water. *App Environ Microbiol* 1998; 54(11): 2842 - 51.
27. Sisti M, Albano A, Brandi G. Bactericidal effect of chlorine on motile *Aeromonas* spp in drinking water supplies and influence of temperature on disinfection efficacy. *Letters App Microbiol* 1998; 26:347 - 51.
28. Burke V, Robinson J, Gracey M, Peterson D, Partridge K. Isolation of *Aeromonas hydrophila* from a metropolitan water supply: seasonal correlation with clinical isolates. *Appl Environ Microbiol* 1984; 48(2): 361 - 6.
29. Kipperman H, Ephros M, Lambdin M, White-Rogers K. *Aeromonas hydrophila*: a treatable cause of diarrhea. *Pediatrics* 1984; 73: 253 - 4.
30. Krovacek K, Peterz M, Faris A, Mansson I. Enterotoxigenicity and drug sensitivity of *Aeromonas hydrophila* isolated from well water in Sweden: a case study. *Int J Food Microbiol* 1989; 8: 149 - 54.
31. Geldreich EE. The bacteriology of water. In: *Microbiology and microbial infections*, 9th ed. London: Arnold; 1998.
32. Brasil. Portaria nº518/GM, de 25 de março de 2004. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para o consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 26 mar. 2004. Seção I, p.266.*
33. LeChevallier MW, Evans TM, Seidler RJ, Dailey OP, Merrel BR, Rollins DM, et al. *Aeromonas sobria* in chlorinated drinking water supplies. *Microbial Ecology* 1982; 8: 325 -33.
34. Environmental Protection Agency. Announcement of the drinking water contaminant candidate list. *Federal Register* 1998; 63: 10274 - 87.
35. Slade PJ, Falah MA, Al-Ghady AMR. Isolation of *Aeromonas hydrophila* from bottled waters and domestic water supplies in Saudi Arabia. *J Food Prot* 1986; 49(6): 471 - 6.
36. González C, Gutierrez C, Grande T. Bacterial flora in bottled uncarbonated mineral drinking water. *Can J Microbiol* 1987, 33:1120 - 5.
37. Tsai GJ, Yu SC. Microbiological evaluation of bottled uncarbonated mineral water in Taiwan. *Int J Food Microbiol* 1997; 37:137 - 43.
38. Brandi G, Sisti M, Giardini F, Schiavano GF, Albano A. Survival ability of cytotoxic strains of motile *Aeromonas* spp in different types of water. *Letters Appl Microbiol* 1999; 29:211 - 5.
39. Kersters I, Huys G, van Duffel H, Vancanneyt M, Kersters K, Verstraete W. Survival potential of *Aeromonas hydrophila* in freshwaters and nutrient-poor waters in comparison with other bacteria. *J Appl Bacteriol* 1996; 80:266 - 76.
40. Alves AC, Odorizzi AC, Goulart FC. Análise microbiológica de águas minerais e de água potável de abastecimento, Marília, SP. *Rev. Saúde Pública*, [online]. 2002 dez [cited 2003 Febr 17]; 36(6):749 - 51. URL: <http://www.scielo.br/scielo>. ISSN0034-8910.
41. Brasil. Resolução RDC nº54, de 15 de junho de 2000. Dispõe sobre o regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de água mineral e água natural. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 19 jun. 2000. Seção I, p.37.*
42. GUDRI (Gazzetta Ufficiale della Republica Italiana) 23/7/1997. Decreto 8 luglio 1997. Integrazioni dei criteri di valutazione della caratteristiche microbiologiche delle acque minerali naturali. Apud: *Int J Food Microbiol* 2001; 63:169 - 73.
43. Havelaar AH, Schets, van Silfhout A, Jansen WH, Wieten G, van der Kooij D. Typing of *Aeromonas* strains from patients with diarrhoea and from drinking water. *J Appl Bacteriol* 1992; 72: 435 - 44.

Avaliação microbiológica da água de abastecimento público em escolas no município de Ibiúna - SP: estudo comparativo da qualidade da água no cavalete e pós-cavalete.

Microbiological evaluation of public water supply in schools of Ibiúna-SP: comparative study of water quality in conduit and post conduit.

RIALA6/1028

Francisco R. M. SOTO^{1*}, Yara S. K. FONSECA², Daniel V. ANTUNES³, Marcia R. RISSETO³, Marcos AMAKU⁴, Maria de Lourdes B. ARINE²

* Endereço para correspondência: Caixa Postal 34, Ibiúna – SP CEP 18150-000; fone (15) 32942223- 32481880, e-mail chicosoto@ig.com.br

¹ Vigilância Sanitária Municipal do Centro de Vigilância Sanitária e Controle de Zoonoses “Tereza Rodrigues de Camargo”, Ibiúna, SP.

² Instituto Adolfo Lutz de Sorocaba, Sorocaba- SP.

³ Centro de Vigilância Sanitária e Controle de Zoonoses “Tereza Rodrigues de Camargo”, Ibiúna, SP.

⁴ Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo/ SP.

Recebido: 15/12/2004 – Aceito para publicação: 20/06/2005.

RESUMO

A qualidade da água de abastecimento público é de grande importância para a saúde da população. A água pode ser um importante veículo de doenças de natureza infecciosa e química. Este trabalho objetivou realizar um estudo da qualidade da água no aspecto microbiológico nos cavaletes, pós-cavalete da rede pública escolar do Município de Ibiúna SP. As condições de limpeza e conservação das caixas d'água foram também avaliadas. O estudo foi realizado durante o segundo semestre de 2004. Foram realizadas 56 amostragens em 28 escolas, sendo 28 do cavalete e 28 no ponto de consumo, para análise laboratorial no aspecto microbiológico. Das 28 amostras no cavalete das escolas, 3,57% apresentaram coliformes totais e *E coli*. No ponto de consumo, das 28 amostras, 21,42% apresentaram coliformes totais e 14,28%, *E coli*. A avaliação das caixas d'água mostrou que 57,14% do total estavam insatisfatórias em relação a higiene e conservação. Há necessidade de ações corretivas em todas as etapas de fornecimento de água de uso público.

Palavras-Chave. água, coliformes, escolas, caixa d'água.

ABSTRACT

The quality of public water supply is of great importance to the population health. This can be an important source for disseminating disease caused by infectious agents and chemical substances. This work had the objective to conduct a study on water quality concerning the microbiologic aspect in the conduit and post conduit of public school system in Ibiúna- SP. Water reservoirs conditions and hygienic conservation were also evaluated. The study was carried out during the second semester of 2004. Fifty six water samples were collected from 28 schools, being 28 samples from conduit, and 28 water consumption point, and microbiological analyses were performed. Of 28 samples from schools conduits, 3.57% showed total coliforms and *E coli*. Of 28 samples collected from water consumption sites 21.42% showed total coliforms, and 14.28% *E. coli*. Concerning the water reservoir, altogether 57.14% were unsatisfactory for hygiene and conservation conditions. The observed data indicate a demand in applying corrective actions in all stages of water supply for public consumption.

Key Words. water, coliforms, schools, water reservoir.

INTRODUÇÃO

A água é considerada um dos nutrientes mais importantes para o homem. De 60% a 70% da constituição do corpo humano é composta por este líquido. Nas crianças recém-nascidas, esta porcentagem pode chegar a 80%. A água está presente em todas as reações químicas do nosso corpo e é essencial para a vida de todos os seres vivos. Ela é ingerida pelo homem em maior quantidade que todos os outros alimentos reunidos, e é também a sua principal excreção. Um adulto ingere por dia mais de dois litros deste líquido, cerca de 3% do seu peso corpóreo. Este contato com a água justifica e explica a facilidade com que parasitas macro ou microscópicos atingem o homem e nele se desenvolvem, quando outros fatores coadjuvantes são favoráveis a sua sobrevivência, desenvolvimento ou multiplicação¹. Baseado nesta óptica, sua qualidade físico-química e microbiológica é indispensável para a manutenção da saúde da população. A água contaminada pode ser um importante veiculador de doenças infecciosas causadas por vírus, bactérias, protozoários e parasitas. Numanovic et. al. citaram que em 84 amostras de água analisadas pela técnica de PCR, 63,09% tinham a presença de enterovírus². Agentes químicos podem também ser importantes na ocorrência de doenças não infecciosas³. A água de consumo humano é um dos importantes veículos de enfermidades diarreicas de natureza infecciosa principalmente por bactérias do gênero *E coli*, o que torna primordial a avaliação de sua qualidade microbiológica⁴.

A Organização Mundial da Saúde (OMS), constatou que 80% de todas as doenças que se alastram nos países do terceiro mundo são provenientes de água contaminada^{4,5}.

Cabe aos órgãos oficiais de saúde pública o monitoramento físico-químico e microbiológico da água de abastecimento público, a fim de garantir e preservar a saúde da população. A garantia da qualidade da água de abastecimento público tem despertado o interesse dos mais diversos setores, motivando-os a elaborarem modelos de uso e gestão capazes de compatibilizar as demandas crescentes com a relativa escassez do produto na qualidade desejada⁶. No Estado de São Paulo, desde o ano de 1992, segundo a Resolução SS 45 de 31 de janeiro, existe nos municípios o programa de monitoramento mensal da qualidade da água denominado Pró - Água. Este programa visa avaliar a qualidade físico-química e microbiológica desta, em sistemas públicos alternativos e rede de abastecimento⁷. Estes são essenciais para preservar a qualidade da água que é fornecida à população no aspecto microbiológico e nutricional principalmente.

Este trabalho teve por objetivo primário, realizar um estudo comparativo da qualidade da água no aspecto microbiológico nos cavaletes e pós-cavalete, como bebedouros e torneiras das escolas da rede pública. Como objetivo secundário, avaliar as condições de limpeza e conservação das caixas d'água destas escolas, e sua influência na qualidade microbiológica desta água.

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais

O trabalho foi realizado no período de 15 de junho a 15 de novembro de 2004, totalizando seis meses de estudo. Foram realizadas 56 amostragens de água em 28 escolas públicas do Município de Ibiúna - SP da zona rural e urbana. Deste total, 28 foram do cavalete da escola e 28 no ponto de consumo das mesmas. As amostras foram efetuadas pela Vigilância Sanitária de Ibiúna, em embalagens apropriadas para o ensaio microbiológico, acondicionadas em caixa isotérmica com gelo e transportadas no mesmo dia para o Instituto Adolfo Lutz de Sorocaba- SP. No dia anterior, foi aplicado um questionário e inspeção nas escolas onde seria realizada a amostragem, com o objetivo de analisar as condições higiênico-sanitárias e de conservação das caixas d'água.

Métodos

O exame microbiológico foi realizado segundo o método nº. 9222-B-9-54 da Técnica de Filtração em Membrana, recomendado pelo "Standard Methods for the Examination of Water and Wasterwater" (APHA - 1998)⁸. O meio de cultura utilizado foi o M- Endo Agar, incubado a 35°C/24 horas. As amostras positivas foram confirmadas utilizando-se o Caldo Bile Verde Brillante para coliformes totais (35°C/48 horas) e o Caldo EC para coliformes termotolerantes e/ou *E. coli* (44,5°C/24 horas). O resultado foi reportado como uma contagem direta do número de colônias/100 ml da amostra no meio Endo.

Os resultados da qualidade da água no cavalete e pós-cavaletes foram analisados através do Teste Exato de Fisher. Neste teste, realizamos a associação de duas variáveis: condição satisfatória e insatisfatória das caixas d'água. Na primeira hipótese, testamos se as condições das caixas d'água satisfatórias (12) não tinham diferença estatística com as condições insatisfatórias (16). Na segunda hipótese, testamos se as condições satisfatórias das caixas d'água (12), eram diferentes estatisticamente das condições insatisfatórias (16). Nos dois testes, fizemos associações com os resultados de coliformes totais e *E coli* encontrados nas caixas d'água insatisfatórias e satisfatórias.

RESULTADOS

Foram obtidos os seguintes resultados nas análises microbiológicas, no cavalete e ponto de consumo das escolas, bem como a avaliação das condições de higiene e conservação das caixas d'água das mesmas, conforme apresentado nas Tabelas de 1 a 3.

No ensaio estatístico de Fisher para resultado encontrado para coliformes totais associado com condições insatisfatórias¹⁶ e satisfatórias¹² das caixas d'água, obtivemos o valor de p: 0,0237, com nível de significância de 5%, p < 5%. Este resultado mostrou que houve diferença estatística para

coliformes totais no ponto de consumo. Para *E coli*, associada com condições insatisfatórias (16) e satisfatórias (12) das caixas d'água, obtivemos o valor de p: 0,113, para um nível de significância de 5%. Nesta associação, não foi observada uma diferença estatística nas proporções de pontos de consumo para *E coli*.

DISCUSSÃO

Em relação aos resultados obtidos nas 28 análises microbiológicas realizadas no cavalete das escolas, uma pequena porcentagem de amostras não atendeu a legislação vigente, 3,57% do total estavam contaminadas por coliformes totais e *E coli*. No trabalho conduzido por Freitas et. al, na cidade de Campinas- SP, dentro do Programa Pró-Água, identificaram que 40,7% das amostras de água analisadas não atendiam a legislação vigente, número superior ao encontrado neste trabalho⁶. Alves et. al trabalharam com análises microbiológicas em água de abastecimento público na cidade de Marília – SP, identificaram 5,5% das amostras contaminadas por coliformes totais, resultado similar a este estudo⁹. Estas informações são importantes para a saúde pública, porque

bactérias como a *E coli* constituem a causa mais comum de infecção das vias urinárias, sendo responsável por cerca de 90% das primeiras infecções urinárias em mulheres jovens, e também quadros de diarreia no mundo inteiro¹⁰.

No ponto de consumo, a porcentagem de amostras irregulares foi maior, 21,42% estavam contaminadas com coliformes totais e 14,28% com *E coli*. Para as condições de higiene e conservação das caixas d'água inspecionadas, 57,14% do total inspecionado estavam em condições insatisfatórias.

Esta elevada contaminação por coliformes totais no ponto de consumo pode estar relacionada com as condições higiênico - sanitárias e de conservação que as caixas d'água foram encontradas nas escolas. Tratando estatisticamente estas informações, houve diferença entre contaminação da água no ponto de consumo, e condições- higiênico sanitária das caixas d'água. Estudo realizado na cidade do Recife, Brasil, mostrou que em mais de 50% das amostras de água nas residências, foi identificada contaminação pelo grupo de bactérias coliformes. Evidenciou-se que as águas tratadas apresentaram altos índices de contaminação microbiológica, devido as redes internas de fornecimento, ou seja, cisternas, caixas d'água, torneiras e bebedouros, cuja manutenção da higiene não vinha sendo realizada¹¹. Simpson relatou que o material com o qual a caixa

Tabela 1. Resultados obtidos para pesquisa de coliformes totais e termotolerantes (*E coli*) nas escolas municipais com amostragem no cavalete, Ibiúna - SP, 2004.

Pesquisa para coliformes	Nº de amostras	Ausência de coliformes	Presença de coliformes	% de presença
coliformes totais	28	27	1	3,57
<i>E coli</i>	28	27	1	3,57

Nº: número, %: porcentagem.

Tabela 2. Resultados obtidos para pesquisa de coliformes totais e termotolerantes (*E coli*) nas escolas municipais com amostragem no ponto de consumo, Ibiúna - SP, 2004.

Pesquisa para coliformes	Nº de amostras	Ausência de coliformes	Presença de coliformes	% de presença
coliformes totais	28	22	6	21,42
<i>E coli</i>	28	24	4	14,28

Nº: número, %: porcentagem.

Tabela 3. Resultados obtidos na avaliação das condições de higiene e conservação das caixas d'água das escolas municipais, Ibiúna, SP, 2004.

Parâmetros avaliados	Nº de escolas	Nº de caixas d'água inspecionadas	Nº de caixas d'água satisfatórias	Nº de caixas d'água insatisfatórias	% de caixas d'água insatisfatórias
Higiene	28	28	12	16	57,14
Conservação	28	28	12	16	57,14

Nº: número, %: porcentagem.

d'água é construída, sua integridade e proteção, procedimentos higiênico-sanitários e de conservação realizados, são determinantes para prevenir as contaminações principalmente por coliformes totais e *E coli*, garantindo ou não a qualidade da água fornecida as pessoas¹². Freitas et. al. também concluíram que as condições de higiene e conservação das instalações hidráulicas desempenharam um papel importante na contaminação por bactérias⁶.

Compilando todos os resultados obtidos neste estudo, das amostras analisadas no cavalete e ponto de consumo, observamos que a vigilância sanitária municipal desempenhou um papel importante na detecção de irregularidades em todas as etapas, até a água chegar para o consumo da população. Este diagnóstico mostra o quanto é necessário a melhoria da qualidade e o monitoramento em todas as fases de tratamento da água e ações educativas dos órgãos governamentais de saúde, principalmente em relação aos reservatórios das escolas. Há necessidade de um esforço conjunto de todos os setores para garantir a qualidade da água consumida pela população. Renzetti e Dupont citaram que é responsabilidade do estado e do município fornecer água com qualidade à população, e que todas as operações de tratamento desta, devem ser realizadas com máximo rigor¹³. Estes mesmos autores relataram que há uma dificuldade por parte dos órgãos governamentais em monitorar frequentemente esta água. Maiores incentivos seriam necessários para este setor. Encarregar a própria população de controlar a qualidade da água é uma postura incorreta, uma vez que o seu conhecimento quanto aos riscos que a água pode oferecer à saúde é praticamente inexistente¹⁴. Jagals e Jagals preconizaram a utilização dos princípios da Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), para o monitoramento e controle microbiológico da água de uso coletivo¹⁵. Yuksel et. al citaram que houve uma melhoria da qualidade de vida e de saúde da população de Istambul, na Turquia, quando foram implantadas ações rigorosas de tratamento de água envolvendo reservatórios e linhas de distribuição daquele país, com uma melhora em mais de 50% da qualidade da mesma¹⁶. Nanan et. al relataram que houve uma queda drástica de casos de diarreias em crianças no norte do Paquistão quando ações de sanitização da água de consumo foram implantadas naquele país¹⁷. O desenvolvimento sócio - econômico de um país, depende muito da qualidade da água que a população consome¹⁸. A crescente urbanização exige que países, principalmente os subdesenvolvidos e em desenvolvimento, invistam maciçamente em pesquisas, saneamento e educação em saúde¹⁸.

CONCLUSÕES

Neste estudo podemos concluir que:

1. Existe contaminação da água no cavalete das escolas por coliformes totais e *E coli*. Devem ser realizadas ações corretivas para eliminar o problema.

2. No ponto de consumo a contaminação por coliformes totais e *E coli* foi maior, provavelmente relacionada com as condições insatisfatórias de higiene e conservação que estavam a maioria das caixas d'água inspecionadas. A manutenção e a higiene destas, devem ser realizadas com maior frequência e rigor, seguindo normas técnicas preconizadas pela vigilância sanitária.

REFERÊNCIAS

1. Riedal G, Controle Sanitário dos Alimentos. 2 ed. São Paulo: Atheneu, 1992.
2. Numanovic F, Hukic M, Nurkic M, Delibegovic Z, Gegic M, Tihic N. Viruses in drinking water: HAV and enteroviruses. *Med Arch* 2004; 58: 105-8.
3. Tominaga MY, Midio A F. Exposição humana a trihalometanos presentes em água tratada. *Rev Saúde Pública*, 1999;33: 413-21.
4. Isaac- Marquez AP, Lesava Davila CM, Kupech RP, Tamay Segovia P. Calidad sanitaria de los seministros de água para consumo humano em Campeche, *Salud Publica Méx*1994; 36: 655-61.
5. Batalha BHL. Água para consumo humano. In: Batalha BHL; Costa TCR, editores. Água, saúde e desinfecção. São Paulo. CETESB, p.7-39, 1994.
6. Freitas VPS, Brígido BM, Badolato M. I. C.; Alaburda J. Padrão físico químico da água de abastecimento público da região de Campinas. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 2002; 11: 51-8.
7. São Paulo. Leis, decretos, etc. Resolução SS- 45 de 31 de janeiro de 1992. Institui o programa de vigilância da qualidade da água para o consumo humano- Pró - Água e aprova diretrizes para a sua implantação no âmbito da Secretaria da Saúde. *Diário Oficial*, 01 de fevereiro de 1992, seção I, p.27.
8. American Public Health Association [Apha]. Standard Methods for the Examination of Water and Wasterwater. 20^U ed. 1998.
9. Alves NC, Odorizzi AC, Goulart FC. Análise microbiológica de águas minerais e de água potável de abastecimento, Marília, SP. *Rev Saúde Pública*, 2002, 36:2.
10. Brooks GF, Butel JS, Morse AS. Microbiologia médica. 20^{ed}. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1998. p.175-84.
11. Marçal MC, Antunes GM, Santana GM, Pereira, I. Perfil econômico sanitário da água consumida por empresas, residências e hospitais do Recife. Recife, Fundação Instituto Tecnológico do Estado de Pernambuco, 1994 [Apresentado ao XIV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos. São Paulo; 1994].
12. Simpson H. Promoting the management and protection of private water well. *J Toxicol Environ Health* 2004; 67: 1679- 704.
13. Renzetti S, Dupont, D. The performance of municipal water utilities: evidence on the role ownership, *J Toxicol Environ Health* 2004, 20-22:1861.
14. Amaral LA, Filho AN, Rossi Júnior OD, Ferreira FLA, Barros LSSB. Água de consumo humano como fator de risco à saúde em propriedades rurais. *Rev Saúde Pública* 2003; 37: 4.
15. Jagals C, Jagals P. Application of HACCP principles as a management tool for monitoring and controlling microbiological hazards in water treatment facilities. *Wat Sci Techno*, 2004,50,1:69-76.
16. Yuksel E, Eroglu V, Sarikaya, HZ, Koyuncu I. Current and future strategies for water and wastewater management of Istanbul City. *Environ Manage* 2004; 33:186-95.
17. Nanan D, White F, Azam I, Afsar H, Hozhabri S. Evaluation of water, sanitation, and hygiene education intervention on diarrhoea in northern Pakistan. *Bull World Health Organization* 2003; 81:160-5.
18. Adriaens P, Goovaerts P, Skerlos S, Edwards E, Egli T. Intelligent infrastructure for sustainable potable water: a round for emerging transnational research and technology development needs. *Biotechnol Adv* 2003; 22:119-34.

Estudo comparativo entre técnicas de Löwenstein–Jensen e do sistema MB/BacT™ no isolamento de micobactérias

Löwenstein–Jensen and MB/BacT™ System – a comparative study on isolation of mycobacteria

RIALA6/1029

Andréa G. V. COELHO*; Liliana A. ZAMARIOLI; Clemira M. P. V. REIS; Teresa Á. R. Figueiredo.

* Endereço para correspondência: Instituto Adolfo Lutz, Laboratório I de Santos, Seção Biologia Médica, Área de Micobactérias, Rua Silva Jardim, 90, Vila Nova, Santos – SP, CEP11015-020 – Tel: (13) 3232-5112 – e-mail: dea_gobetti@hotmail.com.

Instituto Adolfo Lutz, Laboratório Regional de Santos.

Recebido: 04/08/2004 – Aceito para publicação: 30/06/2005.

RESUMO

Dentre as estratégias para se combater a tuberculose, o diagnóstico precoce se destaca como um dos pilares mais importantes no combate a doença, pois permite a atenção e início ao tratamento e como consequência minimiza os riscos de contágio e dispersão da enfermidade. Com o objetivo de avaliar o desempenho do sistema automatizado MB/BacT™ e do método convencional com cultivo em meio Löwenstein – Jensen (LJ) no isolamento de micobactérias de espécimes clínicos de origem pulmonar, foram analisados os exames de 1.317 pacientes com suspeita clínica de tuberculose pulmonar e/ou micobacterioses. Destas o sistema automatizado MB/BacT™ detectou 327 (24,8%) culturas positivas para micobactérias e o meio LJ 257 (19,5%), a sensibilidade do sistema MB/BacT™ foi de 98% e a especificidade 99%. Observou-se ainda um menor prazo de isolamento e menor contaminação por meio de sistema automático. Esta característica possibilita efetuar uma intervenção rápida e eficaz no tratamento, representando benefícios para os pacientes e ao Programa de Controle da Tuberculose.

Palavras-Chave. *Mycobacterium tuberculosis*, diagnóstico automatizado, MB/BacT™ meio Löwenstein–Jensen.

ABSTRACT

Among the strategies to combat the tuberculosis, the precocious diagnosis stands out as one of the most important pillars for disease control, because it allows the attention and beginning of the treatment, and as a consequence it minimizes the transmission risks and spreading of disease. With the objective in evaluating the performance of the automated MB/BacT™ system and the conventional method with cultivation in Löwenstein - Jensen (LJ) medium for mycobacteria isolation from pulmonary specimens, clinical samples from patients with presumed symptoms of pulmonary tuberculosis and/or mycobacterioses have been studied. Of 1,317 samples . 327 (24.8%) presented positive culture results on automated MB/BacT™ system, while culture on LJ medium detected 257 (19,5%) positive samples. Sensitivity and specificity of automated system was 98% and 99%, respectively. Comparing both techniques, the automated system presented culture positivity in shorter period of time and a lower contamination rate was observed. These characteristics of automated system allow a fast and effective intervention for treatment, representing benefits for the patients and for the Tuberculosis Control Program.

Key Words. *Mycobacterium tuberculosis*, automated diagnosis, MB/BacT™, Löwenstein-Jensen medium.

INTRODUÇÃO

De todas as doenças infecciosas, a tuberculose é uma das que apresentam maior morbidade e mortalidade.

Segundo estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS), a tuberculose é responsável por 2,7 milhões de mortes anuais, das quais 95% ocorrem em países em desenvolvimento. Projeções feitas em 1995 indicam que, no ano 2005, ocorrerão 11,9 milhões de casos novos da doença anualmente^{1,2}.

Na América Latina estima-se a ocorrência de 250 a 300 mil novos casos por ano, com cerca de 20 a 25 mil mortes³. O Brasil é o décimo país do mundo em número de casos, com cerca de 90.000 casos novos e mais de 5.000 mortes anuais. Destes 48% se encontram na região Sudeste, da qual faz parte o Estado de São Paulo, que por sua vez possui o maior número absoluto de casos do país, apresentando na última década uma incidência de cerca de 17.000 casos novos por ano e um coeficiente oscilando entre 50 e 60 por 100.000 habitantes^{1,2,4-6}.

Surtos da doença por cepas multiresistentes e o aumento da incidência de infecções causadas por outras espécies de micobactérias impuseram a necessidade do desenvolvimento de novos métodos diagnóstico para estas infecções⁷.

Dentre as estratégias para se combater a tuberculose, o diagnóstico precoce se destaca como um dos pilares mais importantes no combate a doença, pois permite a atenção e início ao tratamento e como consequência minimiza os riscos de contágio e dispersão da enfermidade.

As técnicas bacteriológicas utilizadas atualmente no diagnóstico da tuberculose como a microscopia com coloração de Ziehl-Neelsen (BK) e o cultivo bacteriano em meio de Löwenstein–Jensen (LJ), são métodos convencionais importantes tanto para a confirmação do diagnóstico como para o controle de tratamento da doença, mas não permitem aprimorar os erros para desenvolver estratégias de erradicação a médio e em longo prazo da doença⁸.

O BK realizado pela maioria dos laboratórios clínicos, de baixo custo, reproduzível, fornece rapidamente o resultado; diagnostica enfermos com tuberculose ativa, isto é, que são fontes de disseminação da doença, mas apresenta baixa sensibilidade quando comparada com o isolamento das micobactérias em meio de cultura sólido ou líquido⁸⁻¹¹.

Embora alguns progressos na detecção direta de micobactérias por metodologias moleculares estejam sendo realizadas, as metodologias de cultura ainda são indispensáveis para o diagnóstico^{12,13}. A cultura de micobactérias convencional LJ é importante, pois devido a sua elevada sensibilidade, aumenta a cobertura diagnóstica e possibilita o diagnóstico de casos paucibacilares, cuja positividade não é detectada pela microscopia¹⁴. Entretanto apresenta como grandes desvantagens a detecção tardia do crescimento das micobactérias (30 a 60 dias), pois necessita da visualização de colônias da bactéria no meio de cultura, e uma taxa de isolamento inferior àquela obtida com a utilização de meios líquidos^{10,13,15}.

Com as técnicas de hoje, morosas frente à atual epidemiologia da tuberculose, o diagnóstico rápido das micobacterioses vêm sendo um desafio constante aos Programas de Combate a doença, causando sérios transtornos que se evidenciam em pacientes portadores da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA).

Na tentativa de isolamento mais rápido das micobactérias, na década de 1980 foi proposto o sistema semi-automatizado BACTEC 460TB^{7,16}, utilizado para a detecção, identificação e provas de sensibilidade aos antimicrobianos, mostra resultado rápido quando comparado com métodos convencionais; baseia-se na detecção de gás carbônico (CO₂) marcado com ¹⁴C. Por ser uma técnica radiométrica e semi-automatizada, apresentou desvantagens que impediram o seu uso em grande escala^{16,17}.

Recentemente, a fim de se diminuir o tempo entre a suspeita clínica e a detecção das micobactérias, vários métodos não radiométricos foram avaliados^{12,18,19}.

Em 1999, o programa de DST/AIDS iniciou uma discussão junto ao Programa de Tuberculose, sobre a necessidade da melhoria da qualidade do diagnóstico da tuberculose, a fim de se conduzir a um tratamento rápido e eficaz; principalmente em pacientes com sorologia positiva para o HIV²⁰. Assim, em novembro de 2001 foi implantada pelo Programa Estadual de DST/AIDS, a realização da cultura pelo sistema automatizado MB/BacT™, neste Laboratório Regional de Referência do Estado de São Paulo - DIR XIX, devido ao elevado índice de co-infecção HIV/TB, na região.

O objetivo deste estudo foi avaliar o sistema automatizado MB/BacT™, pela análise comparativa das taxas de sensibilidade, especificidade e precocidade no isolamento de micobactérias, com o método convencional em meio de Löwenstein-Jensen (LJ).

MATERIAL E MÉTODO

Foram processados no Laboratório de Micobactérias do Instituto Adolfo Lutz – Santos/SP (IAL), pelos métodos automatizado e convencional, MB/BacT™ e LJ respectivamente, 1.317 espécimes clínicos de origem pulmonar, coletados de pacientes sintomáticos respiratórios ou com suspeita clínica de tuberculose pulmonar e/ou micobacterioses, atendidos nas Unidades Básicas de Saúde da Baixada Santista entre janeiro de 2002 a dezembro de 2003.

Procedimentos Bacteriológicos

Baciloscopia: esfregaços de cada amostra coletada foram corados pelo Método de Ziehl-Neelsen. No caso de lâminas positivas realizou-se a contagem bacilar semiquantitativa conforme o índice bacilosκόpicó recomendado pelo MS^{8,21}.

Cultura: após digestão e descontaminação pelo Método de Petroff^{8,22}, os espécimes clínicos foram semeados em Meio de Löwenstein – Jensen (LJ) e meio middlebrook 7H₉ do sistema

MB/BacT™ contendo 0,5ml de Solução Reconstituente. Os meios de LJ foram incubados a 37°C em estufa bacteriológica por até 60 dias. Os frascos de meio de cultura MB/BacT™ foram colocados no Módulo de Incubação do Sistema Automatizado, que consiste numa estufa bacteriológica a 37°C, com monitoramento contínuo, e inspecionados por 42 dias. As culturas positivas foram confirmadas quanto à presença de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR), pela observação de esfregaços corados pelo método Ziehl-Neelsen^{8,21}.

As culturas do sistema automatizado onde se detectou a presença de microrganismos contaminantes foram novamente descontaminadas pelo método de Petroff e semeadas em novo meio de cultura do sistema MB/BacT™.

Leitura dos Frascos: o sistema automatizado monitoriza continuamente a produção de CO₂ pelos microrganismos com base na leitura dos refletômetros de fase sólida sensíveis ao CO₂^{3,10}, pelo tempo mínimo de 42 dias. Todos os meios LJ inoculados são lidos uma vez por semana até o 60º dia.

Identificação: culturas positivas foram encaminhadas ao IAL Central que realizou a identificação de acordo com as técnicas preconizadas pelo Ministério da Saúde; observando-se a pigmentação das colônias, aspecto e realização de provas bioquímicas^{8,21}.

RESULTADOS

A comparação entre os resultados obtidos na detecção das micobactérias em meio de Löwenstein–Jensen (LJ) e meio middlebrook 7H₉ do sistema MB/BacT™, encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1. Comparação entre os resultados obtidos no processamento das 1.317 amostras clínicas, para o isolamento de micobactérias, nos meios de Middlebrook 7H₉ do MB/BacT™ e Löwenstein-Jensen, processadas no Laboratório de Micobactérias do IAL – Santos/SP, no período de janeiro de 2002 a dezembro de 2003.

Meios de Cultura	Total de Amostras	Resultados		
		Positivo (%)	Negativo (%)	Contaminado (%)
Middlebrook 7H ₉ do MB/BacT™	1.317	327 (24,8%)	943 (71,6%)	47 (3,6%)
Lowenstein - Jensen	1.317	257 (19,5%)	934 (71%)	126 (9,5%)

Tabela 2. Resultado do retratamento das 116 culturas contaminadas em meio Middlebrook 7H₉ do MB/BacT™, processadas no Laboratório de Micobactérias do IAL – Santos/SP, no período de janeiro de 2002 a dezembro de 2003.

Total amostras processadas	Total amostras retratadas	Resultado das amostras retratadas		
		Positivas (%)	Negativas (%)	Contaminadas (%)
1.317	116	36 (2,7%)	33 (2,5%)	47 (3,6%)

Efetuada-se cálculos estatísticos para determinação dos valores de concordância entre o sistema automatizado MB/BacT™ e o LJ obteve-se: 94% de concordância bruta, 63% concordância esperada e 85% de concordância ajustada (Kappa). O método automatizado apresentou satisfatória taxa de sensibilidade (98%) e especificidade (99%), com os valores preditivos positivos e negativos de 81% e 99 %, respectivamente; demonstrando assim que a metodologia empregada no sistema MB/BacT™ apresenta boa acurácia.

O sistema automatizado MB/BacT™ detectou 327 (24,8%) culturas positivas, sendo que 185 (14%) com resultado positivo na baciloscopia direta e 142 (10,8%) com resultado negativo. Com o meio LJ foram detectadas 257 (19,5%) culturas positivas para micobactérias (Tabela 1).

O tempo médio de positividade pelo sistema automatizado MB/BacT™ foi de 16 dias, (68% das amostras positivas foram detectadas até o 20º dia de incubação), sendo que pelo método convencional houve um acréscimo médio de duas semanas.

Analisamos a expressão de crescimento da micobactéria nos dois métodos em relação ao tempo, representado em dias (Figura 1).

Na identificação com testes fenotípicos das espécies tivemos no sistema MB/BacT™ 80,4% destas pertencentes ao complexo *Mycobacterium tuberculosis* (Tabela 3).

DISCUSSÃO

Uma das melhores medidas para se prevenir à disseminação da tuberculose é o diagnóstico rápido e preciso

da doença. Pelas características de crescimento lento do bacilo, a detecção do bacilo em meio de cultura, na melhor das hipóteses é de três semanas, representando atraso no início do tratamento e assim, com conseqüências para a sobrevida do paciente, principalmente para os pacientes co-infectados, onde muitas vezes é freqüente a ocorrência de doença causada por micobactérias não tuberculosas.

Ao se fazer o diagnóstico de infecções por micobactérias, os pontos mais importantes que devem ser atingidos são: liberação de resultado do exame microscópico no prazo máximo de 24h após o recebimento da amostra no laboratório; detecção dos bacilos álcool – ácido - resistentes em no máximo 14 dias; realização da identificação no máximo entre 17 a 21 dias; e disponibilização para o médico da

sensibilidade da micobactéria aos tuberculostáticos dentro de no máximo 28 dias⁷.

Em nosso estudo, a baciloscopia detectou apenas 14% das culturas positivas no método automatizado, deixando clara a sua baixa sensibilidade. Em comparação ao método LJ, o sistema MB/BacT™ revelou-nos, uma maior positividade e rapidez na detecção.

O MB/BacT™ detectou-se 327 culturas positivas para micobactérias e o meio de LJ detectou apenas 81% dessas culturas, sendo assim o sistema automatizado apresentou uma taxa de detecção 33% maior do que no método convencional LJ. Porcentagens estas semelhantes à encontrada por Rohner et al.¹⁹ e Manterola et al.²³ que relatam respectivamente os valores de 79,5% e 92,5% de positividade, com meio a base de ovos.

O tempo médio de detecção foi menor (16 dias) quando comparado ao convencional (24,7 dias); essa detecção tardia em meios sólidos nos deixa claro a vantagem da utilização de um sistema automatizado, que possibilite maior agilidade na realização dos testes de identificação, uma vez que em nossos estudos 19,6% das cepas eram outras micobactérias (MNT); sendo 5,5% ao *Mycobacterium kansasii*, e 3,4 % ao *Mycobacterium avium*, espécies estas com alta freqüência de isolamento em doenças pulmonares humanas¹⁴.

Diversos estudos mostram que o meio líquido é mais sensível para a detecção do crescimento de micobactérias, por ser um meio rico em nutrientes, mas algumas vezes apresenta um índice de contaminação mais elevado do que o meio sólido^{12,13}. Em nossos estudos a porcentagem de contaminação das culturas por outros microrganismos foi inicialmente de 8,8% para o meio middlebrook 7H₉ do sistema MB/BacT™ e de 9,5% para o LJ. A menor porcentagem pode ser explicada pelo uso de antibióticos no meio de cultura desse sistema, como também à encontrada nos estudos de Aily et al.¹² que relatam 24% para o MB/BacT™ e 27,3% para o LJ.

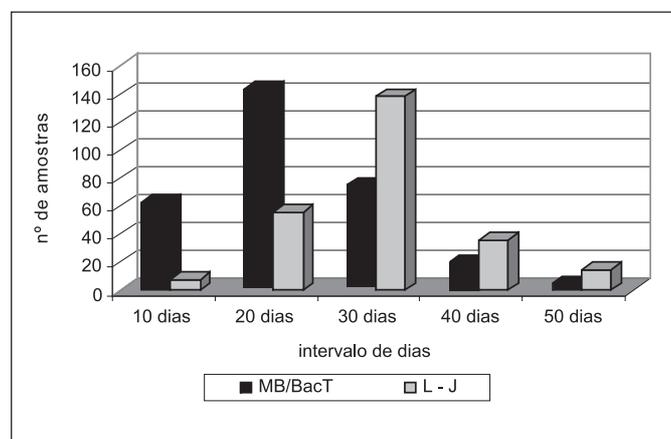


Figura 1. Comparativo entre o tempo de crescimento das culturas processadas pelo método convencional L-J e automatizado MB/BacT™, processadas no laboratório de Micobactérias do IAL – Santos/SP, no período de janeiro de 2002 a dezembro de 2003 .

Tabela 3. Espécies isoladas nas culturas positivas nos meios de Middlebrook 7H₉ do MB/BacT™ e meio Löwenstein–Jensen, processadas no Laboratório de Micobactérias do IAL – Santos/SP, no período de janeiro de 2002 a dezembro de 2003 .

Espécies isoladas	Meio de cultura			
	Middlebrook 7H ₉ do MB/BacT™		Löwenstein-Jensen	
	nº	%	nº	%
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	263	80,4	223	86,7
<i>Mycobacterium avium</i>	11	3,4	4	1,5
<i>Mycobacterium kansasii</i>	18	5,5	16	6,2
<i>Mycobacterium terrae e triviale</i>	1	0,3	1	0,4
<i>Mycobacterium cresc. lento</i>	3	0,9	1	0,4
<i>Mycobacterium abscessus</i>	1	0,3	0	0
<i>Mycobacterium fortuitum</i>	7	2,1	4	1,5
<i>Mycobacterium peregrinum</i>	2	0,6	1	0,4
<i>Mycobacterium cresc. rápido</i>	0	0	1	0,4
outras	21	6,4	6	2,3
Total	327	100	254	100

Importante enfatizar que em nosso estudo utilizamos para a descontaminação das amostras de escarro o método de Petroff e não o método de N-acetil-L-cisteína/ NOH, como indicado pelo fabricante, pelo fato deste fazer parte da nossa rotina laboratorial e ser o método mais usado no Brasil⁸.

O retratamento das culturas do sistema MB/BacTTM em que se detectou presença de microrganismos contaminantes, possibilitou um aumento de 2,7% de culturas positivas, diminuindo a taxa de contaminação para 3,6% (Tabela 2). Devido as suas características, uma contaminação da cultura em meio sólido impossibilita o retratamento, sendo assim essa cultura é descartada e o diagnóstico interrompido, fazendo-se necessário a solicitação de nova amostra.

Ao analisar os dados obtidos na comparação dos dois métodos, os autores ressaltam a importância de uma metodologia automatizada de detecção do crescimento bacteriano, como o MB/BacTTM, pois este agiliza os testes de identificação e sensibilidade às drogas, possibilitando uma intervenção rápida e eficaz no tratamento, representando benefícios para os doentes; justificando assim a sua implantação à rotina laboratorial em programas de combate à tuberculose.

REFERÊNCIAS

1. Hiijar MA. Epidemiologia da tuberculose no Brasil. *Inf Epidemiol SUS* 1992; 53-7.
2. Raviglione MC, Snider DE, Kochi A. A Global epidemiology of tuberculosis: morbidity and mortality of a worldwide epidemic. *JAMA* 1995; 273:220 – 6.
3. Guevara A, Juárez A, Zenteno R. Tuberculosis y la importancia de incorporar nuevas metodologías diagnósticas. *MEDUNAB* 2003; 6 (16): 46-51.
4. Galesi VMN & Santos LAR Tuberculose: A cura em estado de alerta. *Rev Prática Hospitalar* 2004; 32: 37-4.
5. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Centro Nacional de Epidemiologia. Coordenação Nacional de Pneumologia Sanitária. Manual de normas para o controle da tuberculose. Brasília (DF), 1995.
6. Nogueira PA et al. Avaliação das informações de tuberculose (1989-1999) de um Centro de Saúde Escola da cidade de São Paulo. *Rev Bras Epidemiol* 2001; 4 (2): 131-9.
7. Tenover FC et al. The resurgence of tuberculosis: is your laboratory ready? *J Clin Microbiol* 1993; 31: 767-70.
8. Ministério da Saúde, Programa Nacional de Combate da Tuberculose. Manual de Bacteriologia da Tuberculose, 2ª. ed. Rio de Janeiro. Fundação Nacional da Saúde, 1994.
9. Colebunders R; Bastian I. A review of the diagnosis and treatment of smear-negative pulmonary tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2000; 4: 97-107.
10. Jamal L F, Palhares MCA . Tuberculose em pacientes infectados pelo HIV experiência de um serviço de referência para DST/AIDS em São Paulo. *Bol de Epidem* 1999; 7(1): 87-90.
11. Wolinsky E. Convencional diagnostic methods for tuberculosis. *Clin Infect Dis* 1994; 19: 396-401.
12. Aily DCG. et al. Isolamento de micobactérias em espécimes clínicos utilizando o sistema automatizado MB/BacTTM. *Rev Inst Adolfo Lutz* 2003; 62(3): 233-7.
13. Oplustil CP et al. Impacto da automação no diagnóstico de infecções por micobactérias. *J Bras Patol Med Lab* 2002; 38(3): 167-73.
14. Silva EAM et al. Ocorrência de infecção pulmonar devida ao *Mycobacterium kansasii*, em São Paulo, Brasil. *Rev Inst Adolfo Lutz* 1987; 47: 11-7.
15. World Health Organization. (Laboratory Services in Tuberculosis Control.) Part III: Culture. Geneve, 1998.
16. Roberts GD et al. Evaluation of Bactec radiometric method for recovery of mycobacteria and drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* from acid-fast smear positive specimens. *J Clin Microbiol* 1983; 18: 689-96.
17. Conville PS , Witebsk FG. Inter-bottle transfer of mycobacteria by the BACTEC 460. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1989;12:401-5.
18. Alcaide F et al. Evaluation of the BACTEC MGIT 960 and the MB/BacT systems for recovery of mycobacteria from clinical specimens an for species identification by DNA AccuProbe. *J Clin Microbiol* 2000;38(1): 398-401.
19. Rohner P. et al. Evaluation of the MB/BacT system in comparison to the BACTEC 460 system and solid media for isolation of mycobacteria from clinical specimens. *J Clin Microbiol* 1997; 35(12): 3127-3131.
20. Galesi VMN. Mortalidade por tuberculose no Município de São Paulo, análise de uma década, 1986 a 1995 [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP, 1999.
21. Kent PT , Kubica GP. Public Health Mycobacteriology: a guide for the level III laboratory. Atlanta, US Department of Health and Human Services, 1985.
22. Petroff SA . A new rapid method for the isolation and cultivation of tubercle bacilli directly from sputum and feces. *J Exp Med* 1915; 21:38.
23. Manterola JM et al. Comparison of a non radiometric system with BACTEC 12B and Culture on Egg-based Media for Recovery of Mycobacteria from clinical specimens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1998; 17: 773-7.

Culturas mistas de micobactérias: é importante isolar e identificar?

Mixed mycobacterial cultures: is it important to separate and to identify multiple species?

RIALA6/1030

Vânia T. G. INUMARU; Roberta M. BLANCO; Maria Conceição MARTINS; Carmen M.S. GIAMPAGLIA; Suely Y.M. UEKI; Erica CHIMARA; Lucilaine FERRAZOLI; Maria Alice S. TELLES.

* Endereço para correspondência: Instituto Adolfo Lutz, SP, Setor de Micobactérias, Seção de Bacteriologia, Av. Dr. Arnaldo, nº 351 - 9º andar, Cerqueira César. 01246-902, São Paulo, SP.

Recebido: 06/07/2004 – Aceito para publicação: 30/06/2005

RESUMO

A investigação de culturas mistas de micobactérias é importante pois geralmente estas incluem ao menos uma espécie patogênica ou potencialmente patogênica. Dentre 8.036 culturas recebidas entre 1999 e 2000, pelo Setor de Micobactérias do Instituto Adolfo Lutz, foram selecionadas 21 (0,26%) com resultados sugestivos de culturas mistas. Após o isolamento em meio 7H11 as colônias foram repicadas em Löwenstein Jensen e incubadas à 37° C. A identificação dos 32 subcultivos foi feita por métodos fenotípicos e pela análise do perfil de restrição do produto da amplificação de 440 pares de base do gene *hsp65*. Em oito subcultivos foi encontrada a espécie *M. tuberculosis* associada com MNT, em 3 subcultivos foram encontradas 2 espécies de MNT e nos demais foi identificado apenas um tipo de micobactéria. O tempo de crescimento lento das micobactérias inviabiliza o plaqueamento de todas as culturas pois este procedimento acarretaria demora na liberação do resultado final dos testes, além de representar gastos excessivos em áreas endêmicas, geralmente com escassos recursos econômicos. Embora as dificuldades mencionadas, os microbiologistas devem estar atentos quanto à presença de culturas mistas de micobactérias e usar todos os métodos disponíveis para separar e identificar as espécies.

Palavras-Chave. cultura mista, micobactérias, *Mycobacterium tuberculosis*, micobactérias não tuberculosas.

ABSTRACT

Careful examination of occurrence of mixed mycobacterial cultures is important because most of them include at least one pathogenic agent. Among 8,036 mycobacterial cultures samples received between 1999 and 2000 at the Mycobacteria Laboratory of Instituto Adolfo Lutz, 21 (0.26%) classified as mixed cultures were selected for being investigated. For this, the use of 7H11 plate was included for colonies isolation. The isolated colonies were then subcultured into Lowenstein-Jensen media and incubated at 37°C. The isolates were identified by phenotypic tests and by PCR restriction enzyme analysis of *hsp65* gene. The analysis of those 21 mixed cultures showed the occurrence of *M. tuberculosis* and non-tuberculous mycobacteria (NTM) in eight samples, three cultures with two species of NTM, and ten with only one specie of mycobacteria. The results of this study suggest that microbiology technicians should be aware of mixed cultures and apply every practical method available to separate and to identify the involved mycobacteria species.

Key Words. mixed culture, mycobacteria, *Mycobacterium tuberculosis*, non tuberculous mycobacteria

INTRODUÇÃO

As culturas mistas de micobactérias podem ocorrer após o processamento de um único espécime biológico, coletado de paciente com tuberculose cavitária e co-infectado com outra espécie de micobactéria. Contudo, não se pode descartar a possibilidade de colonização ocasional por micobactérias ambientais ou mesmo contaminação cruzada dos espécimes biológicos durante os procedimentos de coleta ou técnico-laboratoriais¹⁻⁶.

A investigação da presença de culturas mistas é importante pois quando duas espécies de micobactérias estão presentes em um espécime biológico geralmente uma é patogênica ou potencialmente patogênica e a falha em identificá-la dificulta o diagnóstico do paciente. Contudo esta não é uma tarefa fácil e requer técnicos experientes capazes de reconhecer diferenças sutis na tentativa de separar culturas mistas sugeridas por resultados aberrantes em meios usados para os testes fenotípicos³. Nas culturas provenientes de pacientes infectados pelo HIV, as espécies do complexo *M. avium* e *M. kansasii*, que geralmente causam doença disseminada podem estar associadas com *M. tuberculosis*^{1,4,7,6}.

Diversos estudos internacionais têm relatado o isolamento de culturas mistas nos espécimes biológicos de pacientes com ou sem Aids. Tsukamura et al.⁸, após o estudo de 97 culturas de micobactérias isoladas de pacientes com tuberculose detectaram 11 (11,3%) culturas mistas com as espécies dos complexos *M. tuberculosis* e *M. avium*. Young et al.⁶, ao estudar 104 culturas de micobactérias isoladas de pacientes com Aids detectaram a presença de seis (5,8%) culturas mistas com as espécies do complexo *M. avium*: cinco com *M. gordonae* e uma com *M. kansasii*. Kiehn e Cammarata⁴ caracterizaram infecção mista em dois pacientes com Aids após o isolamento de duas espécies de micobactérias, *M. tuberculosis* e *M. avium*, do sangue desses pacientes. Bogner et al.¹, analisaram 114 culturas de *M. avium* obtidas após o processamento de materiais biológicos de pacientes com Aids e infecção sistêmica, dentre estas 7 (6,14 %) eram culturas mistas com outra espécie de micobactéria e 1 (0,9 %) incluía *M. genavense* e *M. xenopi*. Em São Paulo, Silva et al.⁹, relataram a associação das espécies *M. tuberculosis* e *M. szulgai* em um paciente com tuberculose pulmonar.

O Setor de Micobactérias do Instituto Adolfo Lutz (IAL) recebe culturas em meio sólido ou líquido, de diversos laboratórios do Estado de São Paulo, para a identificação da espécie e a determinação do perfil de suscetibilidade da espécie *M. tuberculosis* às drogas.

Para direcionamento aos testes adequados, as culturas em meio sólido são avaliadas quanto aos aspectos microscópicos: morfologia dos bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR), formação de corda e macroscópicos: características das colônias, presença de pigmento^{10,11}. Geralmente as culturas em meio líquido são avaliadas apenas quanto ao aspecto microscópico no entanto, a avaliação do tipo de floculação que

se forma ou da presença de pigmento no sedimento pode ser útil.

Foi objetivo desse estudo avaliar a importância do isolamento de colônias e da identificação das espécies presentes em culturas de micobactérias de difícil elucidação, recebidas pelo Setor de Micobactérias do Instituto Adolfo Lutz no período entre 1999 e 2000.

MATERIAL E MÉTODOS

O Setor de Micobactérias do Instituto Adolfo Lutz-São Paulo examinou 8036 culturas entre 1999 e 2000. Dessas, 21 com resultados aberrantes nos testes fenotípicos, foram conservadas à -70°C em miçangas de vidro umedecidas com meio de Sauton adicionado de 10% de glicerol, para posterior elucidação¹².

Essas culturas foram feitas a partir de 18 escarros, dois gânglios e um sangue, colhidos de 19 pacientes. Treze culturas apresentaram aspectos macroscópicos e microscópicos de micobactérias não tuberculosas (MNT) e resultados inconclusivos quando submetidas aos testes fenotípicos. Oito culturas sugeriram a presença de *M. tuberculosis* e MNT por apresentarem crescimento de BAAR em meio de Löwenstein Jensen (LJ), com características morfológicas diferentes daqueles crescidos em meio de LJ adicionado de 500µg/ml de ácido ρ -nitrobenzóico.

Para esse estudo as culturas foram recuperadas a partir da inoculação das miçangas de vidro em meio Löwenstein Jensen, seguida de incubação à 37°C por 30 dias. Após o crescimento foi feita uma suspensão da bactéria em água destilada estéril, na turvação da escala 1 de McFarland. Essa suspensão foi semeada em placas com meio Middlebrook 7H11, com auxílio de uma alça de 10µl de modo a obter colônias isoladas. As placas foram incubadas à 37°C por 20 dias e observadas com auxílio de um estereoscópio para a análise quantitativa e qualitativa das colônias¹³.

As colônias isoladas foram subcultivadas em meio de Löwenstein Jensen e após o crescimento os repiques foram submetidos a 22 testes fenotípicos convencionalmente usados para identificação de espécies do gênero *Mycobacterium*^{8,10,14,15}. A identificação genotípica foi realizada pela análise do perfil de restrição do produto da amplificação de 440 pares de bases do gene *hsp65* (PRA) cuja natureza conservada permite a diferenciação das micobactérias¹⁶. Os oligonucleotídeos iniciadores da reação de amplificação foram Tb11 (5'-ACCAACGATGGTGTGTCCAT) e Tb12 (5'-CTTGTCGAACCGCATACCCT) e as enzimas utilizadas na digestão do produto foram *BstEII* e *HaeIII*.

RESULTADOS

Após a semeadura das 21 culturas, em meio de 7H11, onze placas mostraram dois tipos de colônias e dez apenas um

tipo. A Tabela 1 mostra a origem dos 32 subcultivos obtidos. As nove colônias rugosas foram identificadas como pertencentes ao complexo *M. tuberculosis* pelos resultados de produção de niacina, redução do nitrato e inativação da catalase a 68°C. As 23 colônias lisas foram submetidas aos testes fenotípicos e os resultados constam da Tabela 2, bem como os resultados de identificação obtidos com a técnica de PRA.

DISCUSSÃO

O gênero *Mycobacterium* tem como característica o crescimento confluyente que dificulta o isolamento e a definição de mais de um tipo morfológico quando o espécime biológico é cultivado em meio sólido e o tempo de crescimento lento que inviabiliza o plaqueamento de todas as culturas.

A observação de 21 culturas mistas não reflete a freqüência real desta ocorrência em nosso laboratório pois essa busca não foi sistemática mas, mostra a importância da investigação detalhada de culturas mistas, já anteriormente relatada na literatura por Gross et al.³.

Entre 11 culturas com duas espécies bacterianas encontradas nesse estudo, oito (73%) incluíam a espécie *M. tuberculosis*. Esses resultados foram concordantes com os de outras publicações que relataram, na maioria das vezes, a presença de ao menos uma espécie de micobactéria patogênica ou potencialmente patogênica nas culturas mistas^{3,4,6,7,9}.

O isolamento de apenas um tipo de colônia nos subcultivos de dez culturas do estudo é sugestivo de que a outra espécie presente na cultura original não foi recuperada.

O subcultivo 20 apresentou resultado fenotípico inconclusivo. Foram realizados 22 testes, 20 apresentaram resultados compatíveis com o padrão de MAC mas, com hidrólise do tween e redução do nitrato sugestivos de *M. kansasii*. A cultura original foi identificada pelo PRA como *M. kansasii* mas o PRA do subcultivo apresentou apenas o perfil

de *M. avium* I. Esses resultados podem ser explicados pela extrema dificuldade em isolar unidades formadoras de colônias, mesmo entre espécies diferentes, por características de crescimento próprias do gênero.

Os subcultivos 6 e 16 originaram-se de culturas de escarros colhidos do mesmo paciente nos anos de 1999 e 2000. A cultura original mostrou perfil de MAC, exceto pela redução do nitrato que sugeriu a presença conjunta de outra espécie. A cultura original foi identificada pelo PRA como *M. tuberculosis* mas o PRA do subcultivo apresentou apenas o perfil *M. avium* I.

Os subcultivos 8 e 17 originaram-se respectivamente de culturas de escarro e sangue colhidos do mesmo paciente nos anos de 1999 e 2000. As culturas originais mostraram perfil fenotípico inconclusivo: perfil de MAC, exceto pela redução do nitrato que sugeriu a presença conjunta de outra espécie. O método de PRA mostrou a presença da espécie *M. tuberculosis*. Nos dois subcultivos os testes fenotípicos identificaram MAC e o método PRA confirmou a presença da espécie *M. avium* II. Como a presença de *M. avium* no sangue pode sugerir a presença de uma doença disseminada a elucidação imediata do diagnóstico teria sido importante para o estabelecimento de terapêutica adequada ao paciente⁷.

Os resultados obtidos, com os subcultivos 6,8,16,17 onde houve evidências da presença de *M. tuberculosis*, mostram a necessidade de um período de incubação prolongado das placas, mesmo após a visualização de colônias lisas, o que possibilitou o desenvolvimento de colônias a partir de espécies de crescimento mais lento.

Os resultados de identificação obtidos com as duas técnicas utilizadas nesse estudo, mostraram a utilidade da técnica de PRA na elucidação de resultados fenotípicos inconclusivos embora permaneça clara a preocupação com a dificuldade de isolamento de microrganismos com características de crescimento muito diferentes que podem aparecer em associação. Microrganismos capazes de

Tabela 1. Caracterização dos subcultivos originados do plaqueamento das 21 culturas recuperadas para elucidação da identificação das espécies do gênero *Mycobacterium*.

Espécime biológico	Culturas N=21					
	Subcultivos com dois tipos de colônias N=11			Subcultivos com um tipo de colônia N=10		
	L.Acromógena	L.Pigmentada	Rugosa	L.Acromógena	L.Pigmentada	Rugosa
Escarro	N=11 (1,2,3,7,9,11,12,13,18,19a/b)*	N=2 (3a,11a)*	N=7 (1a,2a,7a,9a,12a,13a,18a)*	N=6 (6,8,10,15,16,20)*	N=1 (21)*	N=1 (4)*
Gânglio	N=1 (5)*	-	N=1 (5a)*	N=1 (14)*	-	-
Sangue	-	-	-	N=1 (17)*	-	-

L=lisa, N= número, *=identificador dos subcultivos em placas

Tabela 2. Perfil fenotípico e resultado com a técnica de PRA das micobactérias não tuberculosas (MNT) identificadas após subcultivo de 21 culturas com resultado inicial de cultura mista. Instituto Adolfo Lutz 1999-2000.

Nº da Cepa	1,9,18	2,13	5	7,12	11	11a	3	3a	19	19a	6,14, 8,10, 15,16	20	21
Testes fenotípicos													
Crescimento à 26°C	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Crescimento à 37°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Crescimento à 45°C	V	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-
Pigmento	A	A	A	A	A	E	A	E	A	A	A	A	E
Ácido pícrico 0,2%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrito de sódio 0,2%	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Salicilato de Sódio 0,1%	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Cloro de Sódio 5%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Ácido p-nitro benzóico 500µg/ml	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hidrazida do ácido 2 trefeno carboxílico	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hidroxi lamina 500µg/ml	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Isoniazida 10µg/ml	-**	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-
Rifampicina 25µg/ml	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Etambutol 5µg/ml	V	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-
Cicloserina 30 µg/ml	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-
Ciprofloxacina 5 µg/ml	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-
p-aminosalicilato de sódio 2mg/ml	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ofloxacina 2,5 µg/ml	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	NR
Arilsulfatase 3/15dias	V	-/+	-/+	-/+	+/+	-/+	-/+	-/+	+/+	-/+	V	-/+	+/+
Hidrólise do tween	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+
β-galactosidase	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Redução do nitrato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Identificação fenotípica	MAC	MAC	MAC	MAC	Mche	Mg	MAC	CLA	I	MAC	MAC	I	Mg
Identificação pelo PRA	MaII	MaI	MAC	MI	Mab	MgI	MaI	Mtri	I	MAC	MaI	MaII	MgV

*cepa nº 14(-), ** cepa nº 18 (+), I=inconclusivo - =negativo, += positivo, V=variável, A=acromógena, E=escotocromógena, NR=não realizado, MAC=complexo M. avium, MaI=M. avium I, MaII=M. avium II, MI=M. intracellulare I (cepa 12) e IV (cepa 7), Mche=M. chelonae, Mab=M. abscessus, Mg=M. gordonae, Mtri=M. triviale, PRA=análise do perfil de restrição do produto da amplificação de 440 pares de base do gene hsp65, CLA= micobactéria de crescimento lento acromógena

crescimento mais rápido podem prejudicar a recuperação de outros com características mais lentas por consumo de nutrientes.

O método de PRA foi importante para identificar as espécies *M. avium*, *M. intracellulare* e *M. abscessus* anteriormente relatadas respectivamente como complexos *M. avium* e *M. chelonae* e definir os padrões das espécies *M. avium* I e II e *M. gordonae* I e V. Foi também importante para a identificação do subcultivo 3a como *M. triviale* anteriormente relatado como micobactéria de crescimento lento escotocromógena.

CONCLUSÃO

O tempo de crescimento lento das micobactérias inviabiliza o plaqueamento de todas as culturas pois este procedimento acarretaria demora na liberação do resultado final dos testes, além de representar gastos excessivos em áreas endêmicas, geralmente com escassos recursos econômicos.

Embora as dificuldades mencionadas, os microbiologistas devem estar atentos quanto à presença de culturas mistas de micobactérias e usar todos os métodos disponíveis para separar e identificar as espécies.

RECOMENDAÇÕES

1. Semear em placas aquelas culturas com características de culturas mistas quando:
 - o exame microscópico dos bacilos álcool-ácido resistentes mostrar mais de um tipo morfológico
 - o exame macroscópico das culturas evidenciar mais de um tipo de colônia
 - os resultados dos testes fenotípicos forem aberrantes
 - o crescimento no meio de LJ for sugestivo de *M. tuberculosis* e no meio de LJ com 500 µg/ml de ácido p-nitrobenzóico for sugestivo de micobactérias não tuberculosas.
2. Quando no crescimento em placas forem observadas colônias de um só aspecto, é importante a reincubação por períodos mais longos, para que haja possibilidade do crescimento de outras cujo desenvolvimento seja mais lento.

REFERÊNCIAS

1. Bogner JR, Rüsche-Gerdes S, Mertenskötter T, Loch O, Emminger C, Baumgarten R, et al. Patterns of *Mycobacterium avium* culture and PCR positivity in immunodeficient HIV-infected patients: Progression from Localized to Systemic Disease. *Scand J Infect Dis* 1997; 29: 579-584.
2. De Smet KAL, Hellyer TJ, Khan AW, Brown IN, Ivanyi J. Genetic and serovar typing of clinical isolates of the *Mycobacterium avium-intracellulare* complex. *Tubercle Lung Dis* 1996; 77: 71-6.
3. Gross WM, Hawkins JE. Mixed micobacterial cultures. *Clin Microbiol Newsletter* 1990, 12(3): 20-3
4. Kiehn TE, Cammarata R. Laboratory diagnosis of mycobacterial infections in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *J Clin Microbiol* 1986; 24: 708-11.
5. Tsukamura M, Mizuno S, Murata H. Occurrence of *Mycobacterium tuberculosis* and strains of the *Mycobacterium avium-M. intracellulare* complex together in the sputum of patients with pulmonary tuberculosis. *Tubercle* 1981; 62: 43-6.
6. Young LS, Inderleid CB, Berlin O George, Gottlieb MS. Mycobacterial infections in AIDS patients with an emphasis on the *Mycobacterium avium* complex. *Rev Infect Dis* 1986; 8: 1024-33.
7. Suzuki K, Kimoto T, Tsuyugushi K, Matsumoto H, Niimi A, Tanaka E, et al. Modification of results of drug susceptibility tests by coexistence of *Mycobacterium avium* complex with *Mycobacterium tuberculosis* in a sputum sample: case report and experimental considerations. *J Clin Microbiol* 1998; 36 (9): 2745-7.
8. Tsukamura M. Identification of mycobacteria. *Tubercle* 1967; 48:311-8.
9. Silva EAM, Telles MAS, Fragetti MC Associação de tuberculose e micobacteriose pulmonar: relato de um caso. *J Pneumol* 1989; 15:220-2.
10. Kent PT, Kubica GP. Public Health Mycobacteriology - A guide for level III Laboratory. Atlanta, Centers for Disease Control, 1985 (publication n° 86-216546)
11. Monteiro PHT, Martins MC, Ueki SYM, Giampaglia CMS, Telles MAS. Cord formation and colony morphology for the presumptive identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Brasilian J Microbiol* 2003; 34: 171-4.
12. Watanabe AH, Credidio RA, Giampaglia CMS, Martins MC, Ferrazoli L, et al. Viabilidade das cepas de micobactérias conservadas à temperatura ambiente e à -70°C. *Bol Inst Adolfo Lutz* 2003; 13(2): 24-5.
13. Blanco RM, Inumaru VTG, Martins MC, Giampaglia CMS, Ueki SYM, Chimara E, et al. Estratégias para a identificação de espécies do complexo *M. fortuitum*. *Rev Inst Adolfo Lutz* 2002; 61(2): 23-8.
14. Collins CH, Grange JM, Yates MD. Tuberculosis Bacteriology. Organization and Practice 2nd ed. London, England: Butterworth Heinemann; 1997.
15. Ministério da Saúde. Fundação Nacional da Saúde. Centro de Referência Professor Hélio Fraga. Manual de Bacteriologia da tuberculose. 2^a. ed. Rio de Janeiro; 1994.
16. Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Bottger EC, Bodmer T. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 175-8.

Contaminação de areias em áreas de recreação infantil por ovos e larvas de *Ancylostoma* sp. no município de Ribeirão Preto, SP, Brasil

Contamination of sandpits by *Ancylostoma* sp. eggs and larvae in children recreational areas of Ribeirão Preto county, SP, Brazil

RIALA6/1031

Divani Maria CAPUANO^{1*}; Gutemberg de Melo ROCHA²

* Endereço para correspondência: Instituto Adolfo Lutz – Laboratório I de Ribeirão Preto, Rua Minas, 877 – Campos Elíseos – CEP: 14085-410 Ribeirão Preto/ SP. Tel (0XX16)3625-5046, fax (0XX16)3635-7994, e-mail: dcapuano@ial.sp.gov.br.

¹ Instituto Adolfo Lutz, Laboratório I de Ribeirão Preto.

² Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP.

Recebido: 28/01/2005 – Aceito para publicação: 30/06/2005.

RESUMO

As areias de áreas de lazer podem representar um importante ecótopo para a transmissão de várias zoonoses parasitárias, dentre elas a Larva *Migrans* Cutânea (LMC), causada pela penetração na pele humana das larvas de ancilostomídeos de cães e gatos. Neste estudo investigou-se a contaminação dos tanques de areia por ovos e/ou larvas de *Ancylostoma* sp. das áreas de recreação infantil existentes em 11 praças públicas do município de Ribeirão Preto. Entre maio a dezembro de 2003, foram coletadas cinco amostras de areia de cada área de recreação. A recuperação das larvas foi realizada pelo método de Baermann, enquanto que para a detecção dos ovos utilizou-se a técnica da centrífugo-flutuação com soluções saturadas de sulfato de magnésio contendo 5% de iodeto de potássio ($d = 1,33 \text{ g/cm}^3$) e de sulfato de zinco ($d = 1,20 \text{ g/cm}^3$), após um lavado prévio com Tween 80. A presença de larvas foi observada em seis (54%) áreas de recreação, sendo que em quatro (36%) delas foram encontrados ovos de *Ancylostoma* sp. Estes resultados indicam um risco para a ocorrência da LMC nos usuários destas áreas.

Palavras-Chave. *Ancylostoma* sp. areia, praças públicas, Ribeirão Preto, São Paulo.

ABSTRACT

Sandpits in recreational areas may represent an important environment for transmission of several parasite zoonosis, among them the Cutaneous Larva *Migrans* (CLM), caused by the penetration of *Ancylostoma* sp. larvae from dogs and cats through human skin. Contamination of sandpits by *Ancylostoma* sp. eggs or larvae was investigated in children recreational areas from 11 public squares of Ribeirão Preto. From May to December, 2003, five sand samples were collected from each recreational area. Larvae recovery was performed by means of Baermann's method, while egg detection was done by centrifugal-flotation technique in saturated solutions of magnesium sulphate with 5% potassium iodide ($d = 1,33 \text{ g/cm}^3$), and zinc sulphate ($d = 1,20 \text{ g/cm}^3$), after washing out with Tween 80. The presence of larvae was observed in six (54%) recreational areas. In four (36%) of them *Ancylostoma* sp. eggs were found. These results indicate a risk of acquiring CLM by the users of those areas.

Key Words. *Ancylostoma* sp. sand, public gardens, Ribeirão Preto, São Paulo.

INTRODUÇÃO

Os tanques de areia existentes em áreas de lazer de parques, praças públicas e escolas infantis podem representar um importante local de transmissão de várias zoonoses parasitárias, constituindo um risco para a saúde pública, principalmente para as crianças que brincam nestes locais. Dentre as mais comumente transmitidas ao homem, está a Larva *Migrans* Cutânea (LMC), popularmente conhecida como “bicho geográfico” ou “bicho das praias”, causada pela penetração na pele das larvas de ancilostomídeos, transmitidas de cães e gatos. Os agentes etiológicos mais comumente envolvidos são o *Ancylostoma caninum* encontrado em cães e o *A. braziliense* que infecta cães e gatos¹. Os animais parasitados eliminam os ovos no meio externo através das fezes, onde transformam-se em larvas infectantes de 3º estágio, as quais são muito resistentes às ações adversas do ambiente, podendo permanecer no meio externo até cerca de um ano¹. O homem pode se infectar pela ingestão das larvas ou mais comumente, através da penetração direta pela pele¹. A migração larvária é caracterizada pelo aparecimento de lesões serpiginosas na pele, com a produção de cordões eritematosos e pruriginosos, que podem ser observados entre uma a duas semanas após a exposição. Como o ser humano não é o hospedeiro habitual do parasita, este não consegue completar seu ciclo de vida, sendo que as larvas morrem dentro de poucas semanas, mas ocasionalmente, podem persistir por mais de um ano¹. O

diagnóstico da LMC é essencialmente clínico e apesar da infecção ser autolimitada, muitos pacientes necessitam de tratamento para o alívio dos sintomas. Geralmente a migração larvária se restringe à epiderme, mas recentemente, foi demonstrado que o *A. caninum* pode migrar além da pele, causando manifestações sistêmicas como síndrome de Löeffler² e enterite eosinofílica³. Em diversos municípios do Brasil, já foi relatada a contaminação por ovos e/ou larvas de ancilostomídeos em areias e solos de áreas públicas e de escolas⁴⁻⁹. Surtos de LMC foram descritos em Campo Grande, MS, por Araújo et al.⁶, com o acometimento de 37,5% dos alunos de uma escola infantil, em Belo Horizonte, MG, por Lima et al.⁷, quando 28,3% das crianças matriculadas em uma creche foram afetadas e por Santarém et al.⁹ no município de Taciba, SP, com a ocorrência entre 1999 e 2001, de 4 a 7 casos por mês, de crianças que freqüentavam um parque de recreação público.

O objetivo deste estudo foi investigar a contaminação das areias dos tanques de áreas de recreação infantil existentes em praças públicas do município de Ribeirão Preto, chamando a atenção para o risco da ocorrência da LMC.

O município de Ribeirão Preto, localizado na região nordeste do Estado de São Paulo, possui 160 praças semi ou totalmente urbanizadas, incluindo o Distrito de Bonfim Paulista, segundo cadastro do Setor de Parques e Jardins do município. Dentre estas praças, 11 possuem áreas de recreação infantil com tanques de areia. Entre maio a dezembro de 2003, estas 11 praças foram visitadas uma única vez, recolhendo-se de cada

Tabela 1. Presença de larvas e/ou ovos de *Ancylostoma* sp. nas areias de áreas de recreação infantil de 11 praças públicas. Município de Ribeirão Preto, SP, Brasil.

Praças Investigadas*	PRAÇAS CONTAMINADAS COM <i>Ancylostoma</i> sp.		
	OVOS		LARVAS
	MgSO ₄	ZnSO ₄	método de Baermann
Adv. Francisco Montezuma	(-)	(-)	+
Augusto Aparecido Mazza	(-)	(-)	(-)
Chico Mendes	(-)	(-)	(-)
Com. Rômulo Morandini	(-)	(-)	(-)
Coração de Maria	+	+	+
Da Paz	+	+	+
Jardim Interlagos (sem denominação)	(-)	(-)	(-)
Papa João Paulo I	+	(-)	+
Professor Makiguchi	(-)	(-)	(-)
Santa Luzia	+	+	+
São Mateus	(-)	(-)	+
Total	04 (36,0%)	03 (27,0%)	06 (54,0%)
	07 (64,0%)	08 (73,0%)	05 (46,0%)

+ : presença (-): ausência

*Fonte: cadastro do Setor de Parques e Jardins da Prefeitura Municipal de Ribeirão Preto

área de recreação, cinco amostras de areia de aproximadamente 250 gramas cada, preferencialmente das áreas úmidas e sombreadas, respeitando-se uma distância mínima de 1 metro de qualquer material fecal visível. As amostras foram coletadas até uma profundidade de 5 cm da superfície, armazenadas em sacos plásticos e transportadas em caixa de isopor com gelo até o laboratório. A recuperação das larvas de *Ancylostoma* sp. foi realizada pelo método de Baermann¹⁰, utilizando 30 gramas de areia. Para a pesquisa de ovos de *Ancylostoma*, foram retiradas 20 gramas de cada amostra de areia, sendo divididas em duas alíquotas de 10 gramas que foram colocadas em tubos de centrifugação de 50 ml. As amostras foram lavadas com Tween 80, deixando-as repousar por 20 minutos. Após este tempo, ressuspendeu-se os sedimentos, completando-se os tubos com soluções saturadas de sulfato de magnésio com 5% de iodeto de potássio ($d = 1,33 \text{ g/cm}^3$) e de sulfato de zinco ($d = 1,20 \text{ g/cm}^3$). Após centrifugação, alíquotas do material sobrenadante foram transferidas para lâminas de vidro, adicionando-se lugol e examinadas em microscopia óptica.

Dentre as 11 áreas de recreação investigadas, seis (54%) apresentaram larvas de *Ancylostoma* sp., sendo que em quatro (36%) delas foi constatado também a presença de ovos de ancilostomídeos. Na Tabela 1 estão indicadas as praças onde foram encontrados ovos e/ou larvas de *Ancylostoma* sp., de acordo com a técnica diagnóstica empregada.

O encontro de larvas e/ou ovos de ancilostomídeos em amostras de solo e areia de diferentes municípios do Brasil, tem sido relatado por vários autores^{4,5,6,7,8,9}. Entretanto, as comparações dos achados ficam prejudicadas devido a vários fatores como a diversidade das condições climáticas e ambientais das localidades pesquisadas, métodos de coleta utilizados, técnicas diagnósticas empregadas, etc. Chieffi et al.⁵ analisando amostras de solo de 15 localidades urbanas do município de Londrina, PR, detectou a presença de ovos de *Ancylostomidae* em uma delas. Em Salvador, BA, Alcântara et al.⁴ investigaram amostras de solo de 12 parques e praças públicas, 18 ruas e 9 praias, encontrando uma frequência de 0,6% de ovos de ancilostomídeos. Nunes et al.⁸ avaliando as areias de áreas de lazer de 28 escolas infantis do município de Araçatuba, SP, no verão e no inverno, observaram larvas de *Ancylostoma* sp. em 37,5% das escolas no verão e em 46,4% no inverno e a presença de ovos de *Ancylostoma* sp. em 0,56% das amostras analisadas. No município de Taciba, SP, Santarém et al.⁹, investigando 4 caixas de areia de um parque de recreação pública, encontraram larvas de *Ancylostoma* sp. nas amostras do campo de futebol e da área de lazer infantil.

Os resultados obtidos neste estudo demonstram pioneiramente a existência de um problema de saúde pública em Ribeirão Preto, devido ao risco da infecção humana por larvas de *Ancylostoma* sp. nas áreas de recreação investigadas, particularmente para as crianças que frequentam estes locais. No momento da pesquisa, observou-se que apesar de todas as áreas de recreação possuírem cercas de telas, algumas estavam danificadas e que os portões estavam abertos, permitindo o livre acesso de animais a estes locais. Os autores recomendam como medidas de prevenção da ocorrência de LMC, o conserto das telas de proteção, a manutenção dos portões fechados, a troca de areia destes locais e a orientação educativa da população.

REFERÊNCIAS

1. Centers for Disease Control and Prevention. Division of Parasitic Diseases. Guidelines for Veterinarians - Prevention of zoonotic transmission of ascarids and hookworms of dogs and cats. Available from: <http://www.cdc.gov/ncidod/diseases/roundworm.htm>
2. Schaub NA, Perruchoud AP, Buechner SA. Cutaneous larva *migrans* associated with Löeffler' syndrome. *Dermatology* 2002; 205(2):207-9.
3. Croese J, Loukas A, Opdebeeck J, Fairley S, Procvic P. Human enteric infection with canine hookworms. *Ann Intern Med* 1994; 120(5): 369-74.
4. Alcântara N, Bavia E, Silvão RM, Carvalho E. Environmental contamination by *Toxocara* sp eggs in public areas of Salvador, Bahia State, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 1989; 22(4):187-90.
5. Chieffi PP, Müller EE. Prevalência de parasitismo por *Toxocara canis* em cães e presença de ovos de *Toxocara* sp no solo de localidades públicas da zona urbana do município de Londrina, Estado do Paraná, Brasil. *Rev Saúde Pub*, 1976; 10:367-72.
6. Araújo FR, Araújo CP, Werneck MR, Górski A. Larva *migrans* cutânea em crianças de uma escola em área do centro-oeste do Brasil. *Rev Saúde Pub*, 2000; 34(1): 84-5.
7. Lima WS, Camargo MCV, Guimarães MP. Surto de larva *migrans* cutânea em uma creche de Belo Horizonte, Minas Gerais (Brasil). *Rev Inst Med Trop* 1984; 26(2): 122-4.
8. Nunes CM, Pena FC, Negrelli GB, Anjo CGS, Nakano MM, Stobbe NS. Ocorrência de larva *migrans* na areia de áreas de lazer das escolas municipais de ensino infantil, Araçatuba, SP, Brasil. *Rev Saúde Pub*, 2000; 34(6): 656-8.
9. Santarém VA, Giuffrida R, Zanin GA. Larva *migrans* cutânea: ocorrência de casos humanos e identificação de larvas de *Ancylostoma* spp em parque público do município de Taciba, São Paulo. *Rev Soc Bras Med Trop* 2004m 37(2): 179-81.
10. Pessoa SB, Martins AV. *Pessoa Parasitologia Médica*. 10ª ed. Rio de Janeiro: Ed Guanabara Koogan; 1977.

Standardization and evaluation of molecular methods to detect oocysts of *Cryptosporidium* spp. (Apicomplexa: Cryptosporiidae) in faecal samples: extraction of genomic DNA and PCR (polymerase chain reaction)

Carvalho-Almeida, T. T. **Padronização e avaliação de métodos moleculares para detecção de oocistos de *Cryptosporidium* sp. (Apicomplexa: Cryptosporiidae) em amostras fecais: extração de DNA genômico e PCR (reação em cadeia pela polimerase).** São Paulo - SP. 2004. [Tese de Doutorado – Área: Práticas em Saúde Pública – Faculdade de Saúde Pública – USP]. Orientadora: Profa. Dra. Maria Helena Matté.

The protozoan parasite *Cryptosporidium parvum* has become recognised as important emerging human pathogens. For molecular studies, most of the techniques to extract genomic DNA require the use of imported kits to concentrate, rupture the very resistant oocyst wall, and purify the DNA from the samples matrix. The aim of this study was to develop a simple and rapid method based on polymerase chain reaction (PCR) to detect *Cryptosporidium* in preserved faeces. Oocysts were concentrated from faecal specimens by flotation on sucrose gradient. Genomic DNA was prepared from purified oocysts by adding a lysis buffer containing 70 mM β -mercaptoethanol, digested with proteinase K and extracted with phenol-chlorophorm-isoamyl. The standardization was started by performing a one step PCR to detect *Cryptosporidium* spp. using a generic set of primer (AWA).

To detect *C. parvum* a one step PCR was assayed using the specific primer (LAX). To increase the sensitivity of the method, were tested nested-PCR assays, using an outer primer (XIA). Thirty nine DNA samples were analysed from the standard calf, 52 samples from 17 patients and 45 samples from 14 animals. The results were: 54.28% positive samples by single PCR AWA, 71.42% by nested-PCR, 67.74% by single PCR LAX and 44.44% by nested-PCR for the standard calf. The overall positivity for human and animal samples were: 34.48% by single PCR and 54.83% by nested-PCR for *Cryptosporidium* spp. and 16.00% by single PCR and 50.00% by nested-PCR for *C. parvum*. Using Vistra Green for staining agarose gel, yielded the visualisation of the amplicons. These results show that this simple and cheap method could be improved to be used on the routine laboratory work.

Tese disponível na Biblioteca da Faculdade de Saúde Pública – USP.

Tese disponível online: www.teses.usp.br/teses/disponiveis/6/6135/tde-22032005-093557.

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

Evaluation of immune response and protection induced by immunization with A2 and Lack antigens against experimental *Leishmania major* and *Leishmania amazonensis* infection

Coelho, E. A. F. **Avaliação dos níveis de proteção e da resposta imune induzida pela imunização com os antígenos A2 e Lack na infecção experimental com *Leishmania (Leishmania) major* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.** Belo Horizonte, MG, 2004 [Tese de doutorado Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais] Orientador: Carlos Alberto Pereira Tavares

In an attempt to select candidate antigens for a leishmaniasis vaccine, we investigated the protective effect of A2 and Lack antigens against *L. amazonensis* and/or *L. major* infections in BALB/c mice. The Lack and A2 antigens were

administered as Lack-MBP and A2-HIS recombinant proteins associated or not to adjuvants (rIL-12 and/or allumen) or as DNA plasmids (pCDNA3-A2 and pCI Neo-Lack) associated or not to pCI-IL-12 DNA, as adjuvant. BALB/c mice were immunized in their left hind footpads with 2 doses of proteins in 15 days interval. Mice immunized with plasmid DNA, received *intramuscularly* 2 doses in 21 days interval. One month after, mice were infected in their right hind footpads with 1×10^5 or 1×10^6 stationary phase promastigotes of *L. amazonensis* or *L. major*. Immunization with recombinant proteins, associated to adjuvants or with DNA plasmids, was able to induce a robust Th1 immune response prior to challenge infection. However, only mice immunized with A2 antigen were protected against *L. amazonensis* challenge. A high and sustained IFN- γ production, increased levels of A2-specific IgG2a antibodies and low levels of parasite-specific IgG antibodies

were detected. A2 protein administered alone did not induce protection against infection; however, A2 DNA associated or not by IL-12 DNA induced protection against *L. amazonensis* challenge. In contrast, mice immunized with Lack protein or Lack DNA, associated or not by adjuvants, had low levels of IFN- γ and high levels of both Lack-specific and parasite-specific IgG1 antibodies and were not protected against *L. amazonensis* infection. However, mice immunized with Lack antigen were protected against *L. major* infection. Curiously, the association between A2 and Lack antigens in the same vaccine completely abrogated the A2 specific immune responses and, consequently, the protective effect of this antigen against *L. amazonensis* challenge. We concluded that A2, but not Lack, fits the requirements to compose a safe vaccine against tegumentary leishmaniasis.

Tese disponível na Biblioteca do Instituto de Ciências Biológicas e na Biblioteca Central da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).
e-mail: dudaffercoelho@yahoo.com.br

Study of quantification and validation methodologies of soy proteins and collagen and technological uses in meat products

Della Torre, J.C.M. **Proteínas de soja e colágeno: validação das metodologias de quantificação e avaliação tecnológica do uso em produtos cárneos.** Campinas – SP. 2004. [Dissertação de Doutorado – Área: Tecnologia de Alimentos – Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP Campinas] Orientador: Dr. Nelson José Beraquet.

Comminuted meat products, such as frankfurters, fresh ground sausages and hamburgers are exposed to fraud by the abusive use of protein extensors of the types collagen and soy proteins, used in meat products because of their technological benefits, with reduced processing costs, although they are considered limiting, with regard to essential amino-acids, and producing adverse effects in sensory characteristics. The effective control of addition levels is not properly controlled by the Sanitary Surveillance bodies in Brazil, due to the lack of a validated quantitative analytical methodology for soy proteins and because there are no legal limits to collagen inclusion in meat products. As a contribution to the establishment of maximum contents and effective control of soy proteins and collagen, this project sought: a) to validate intra-laboratorially the official AOAC methodologies in the quantification of hydroxyproline (collagen) and soy proteins in meat products; b) to evaluate proximate composition and technological influence of extensors addition to Lyoner sausage, and c) to present both sensorial and physicochemical Adolfo Lutz Institute analytical routine results of commercial products like

frankfurters, fresh ground sausages and minced beef meat. The formulation and processes were the commercially used for meat emulsion batter, Lyoner sausage and canned emulsion. Beef meat, pork backfat and ice quantities were balanced in order to keep constant the 4.7 humidity : protein ratio as well as the 20% lipid level, replaced with either texturized soy proteins (TSP, Maxten E-100), texturized concentrated (CSP, Proteimax TR-120) and isolated (ISP, Supro 500E) in concentration of 0 to 6% or connective tissue from cooked pork rind or fresh beef connective tissue recovered from cuts obtained by using the Skyner machine, in the range 0 to 15%. The color parameters L* (luminosity), a* (red) and b* (yellow) were measured using a spectrophotometer (Minolta) and the compression hardness was measured using a Texture Analyser (TAXT2i/25). The proximate composition and pH were carried out according to Adolfo Lutz Institute's Analytical Norms. Emulsion stability was reported as percent fat and gelatin released from sterilized canned emulsion. A trained 9-member panel evaluated the sensory attributes using an unstructured 10 cm line scale, following the randomized complete block design, with replicate judgments. Laboratorial

consumer acceptance test was carried out using hedonic scale. The results were analyzed by ANOVA and Tukey test ($p=0.05$). The intra-laboratorial validation of aminoacid hydroxyproline analysis methodology, using FAPAS/MAFF/UK inter-laboratorial control canned meat conserve revealed sensibility (quantification limit 0.0075g/100g), precision (CV below 4%), accuracy (recovery rates 90-95%) and operation simplicity. The ELISA immunoassay for soy protein quantification using raw batter emulsion, pasteurized Lyoner sausage and sterilized canned meat added with TSP, CSP and ISP, totalizing 39 treatments, revealed specificity, intra assay precision (CV below 6%), calibration curve linearity ($r=0.980$), sensibility (quantification limit of 0.14g/100g for soy protein in sample); however low accuracy, making necessary the standardization of the method, since the comparative assays using kit ELISA-TEK allowed rapid aqueous extraction of meat samples into a liquid form suitable for the assay, with higher accuracy results. The utilization of 0 to 6% soy proteins in Lyoner sausage revealed the influence of TSP on red color improvement, with no influence on final product firmness and flavor. Moisture and protein decreased, with slight increase on ash and pH, improving emulsion stability. The use of CSP reduced moisture and red color intensity, resulted no changes in firmness and flavor,

increased pH and stabilized the emulsion. The presence of ISP resulted product's decreased red color intensity, firmness and characteristic flavor, with lower moisture level and higher pH, without improvement in the emulsion stability. The utilization of 0 to 15% pork rind and beef connective tissue to Lyoner sausage resulted an increase on toughness and residual connective tissue remaining at the end of mastication, as well as linear increases on collagen levels ($r=0.97$ and 0.99 , respectively) and decrease the emulsion stability. The characteristic flavor and color attributes were decreased by the pork rind replacement, resulting in lower consumer's acceptability. The commercial frankfurter-type sausages revealed collagen median value of 1.7% and commercial fresh ground sausages 1.8%, from total 103 samples analyzed. The routine analysis of beef minced meat revealed appearance alterations due to connective tissue at high levels, presenting collagen median values 123% higher compared with beef minced meat bought in meat stores. Beef connective tissue fibers addition in fresh minced beef meat revealed linear increase in collagen ($r=0.986$) and fat, and decrease in moisture, ash, pH and red color values, causing lower product acceptance. The formulated hamburger revealed higher firmness, demanding a greater number of mastications and presenting a less intense characteristic flavor.

Tese disponível na Biblioteca da
Faculdade de Engenharia de Alimentos UNICAMP (Campinas – SP) e
Biblioteca do Instituto Adolfo Lutz (São Paulo - SP)
E-mail: jussarat@ial.sp.gov.br

ISSN 0073-9855



9 770073 985009