

REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ

ISSN 0073-9855
RIALA6



GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE

Volume 73 número 2, 2014



GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE

Coordenadoria de Controle de Doenças
Instituto Adolfo Lutz

REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ

Volume 73 número 2, 2014
Abril – junho 2014

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

INSTITUTO ADOLFO LUTZ

Diretor Geral do Instituto Adolfo Lutz

Hélio Hehl Caiaffa Filho

Editor Chefe

Pedro Luiz Silva Pinto

Editor Adjunto

Adriana Bugno

Editores Assistentes

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

Núcleo de Acervo

Rocely Aparecida Bueno Moita

Conselho Editorial / Editorial Board

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

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

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

1941
2014, 73(2)

ISSN 0073-9855 CDD_{18614.07205}

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

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

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

Os artigos publicados na Revista do Instituto Adolfo Lutz são indexados por: Abstracts on Hygiene and Communicable Diseases; Analytical Abstracts; Bibliografia Brasileira de Medicina Veterinária e Zootécnica; Biological Abstracts; Chemical Abstracts; Food Science and Technology Abstracts; Index Medicus Latino-americano; LILACS, SP: Saúde Pública; Microbiology Abstracts; Sumários Correntes Brasileiros; Toxicology Abstracts; Tropical Diseases Bulletin; e Virology Abstracts.

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

Portal de Revistas Saúde SP
<http://periodicos.ses.sp.bvs.br>

Portal de Revista em Veterinária e Zootecnia
<http://revistas.bvs-vet.org.br/rialutz>

Cartas ao editor:
Endereço / Address
Núcleo de Acervo
Av. Dr. Arnaldo, 355, 01246-902 São Paulo/ SP - Brasil
Tel/ Fax. + 55 11 3068-2869
E-mail: rial@saude.sp.gov.br

■ ARTIGO ORIGINAL/ ORIGINAL ARTICLE

- 1599 Avaliação dos indicadores de qualidade de laboratórios de citopatologia cervical**
Evaluation of quality indicators of cervical cytopathology laboratories
Jacqueline PLEWKA, Maurício TURKIEWICZ, Bruna Fischer DUARTE, Michele Ana Flores CHAVES, Cíntia CESTARI, Daniela Cristina TARTARI 140-147
- 1600 Avaliação de limite de decisão (CC α) e capacidade de detecção (CC β) a partir de curvas analíticas em análises de águas para substâncias com teores permitidos: uma planilha eletrônica para a interpretação de resultados em Laboratórios de Saúde Pública**
Estimating the decision limit (CC α) and the capability of detection (CC β) from analytical curves on water analysis for substances with permitted limits: an electronic spreadsheet for results interpretation in Public Health Laboratories
Sérgio DOVIDAUSKAS, Isaura Akemi OKADA, Marina Miyuki OKADA, Rita de Cássia BRIGANTI, Camila Cardoso de .. OLIVEIRA 148-157
- 1601 Mercury and Methylmercury in the children hair and fish mostly consumed in Cubatão, São Paulo State, Brazil**
Mercúrio e Metilmercúrio em cabelos de crianças e em peixes mais consumidos em Cubatão, estado de São Paulo, Brasil
Luciana Aparecida FARIAS, Deborah Inês Teixeira FÁVARO, Paulo Tadeu Meira Silva OLIVEIRA , Elisabete de Santis BRAGA..... 158-168
- 1602 Estudo da presença da toxina microcistina na água de reservatório de Mundaú (Garanhuns-PE) pelas metodologias ELISA e CLAE**
Study on the occurrence of microcystin toxin in water reservoir of Mundaú (Garanhuns-PE) by ELISA and HPLC methodologies
Catarina Paula da Silva RAMOS, Irapuan Oliveira PINHEIRO, Edvani Maria da SILVA, Kátia Christina LEANDRO.....169-177
- 1603 Incidência de aflatoxinas no amendoim (*Arachis hypogaea* L) cru em casca da região da Alta Paulista-SP, durante o período de 2011 a 2012**
Incidence of aflatoxins in the raw peanut (*Arachis hypogaea* L) in shell of Alta Paulista-SP region during the period from 2011 to 2012
Kely Braga IMAMURA, Jufner Celestino Vaz TONI, Maria Angélica Lopes BOCCHE, Davi Abdou de SOUZA, Juliana Audi GIANNONI 178-187
- 1604 Physicochemical and sensory characteristics of diet and regular biscuits prepared with yacon (*Smallanthus sonchifolius*).**
Características físico-químicas e sensoriais de biscoitos diet e comuns preparados com yacon (*Smallanthus sonchifolius*)
LRaianny da SILVA, Larissa Scarparo ROCHA, Erika Madeira Moreira da SILVA 188-197
- 1605 Análise do potencial antioxidante do consumo oral da farinha produzida com micélio de *Agaricus brasiliensis* em hamsters hipercolesterolêmicos**
The antioxidant potential of oral intake of flour produced from *Agaricus brasiliensis* mycelium in hamsters with hypercholesterolemia
Ana Cláudia THOMAZ, Herta Stutz DALLA SANTA, Elisa PEREZ, Daiana NOVELLO, Melissa dos Santos RAYMUNDO, Fernanda BOVO, Kelly Cristina de Brito OLIVEIRA, Flávia Donadio PITA, Rosilene REBECA 198-207

1606	Avaliação da qualidade da carne-de-sol produzida artesanalmente) Quality evaluation of artisanal sun-dried meat (<i>carne-de-sol</i>) Teresa Emanuelle Pinheiro GURGEL, Maria Gilnara Lima BANDEIRA, Maria Rociene ABRANTES, Êlika Suzianny de Sousa, Kalianne da Silva SILVESTRE, Sidnei Miyoshi SAKAMOTO, Jean Berg Alves da SILVA	208-213
■ COMUNICAÇÃO BREVE/ BRIEF COMMUNICATION		
1607	Pesquisa de <i>Cronobacter</i> spp. em fórmulas infantis desidratadas Screening the dehydrated powdered infant formulae for <i>Cronobacter</i> spp. Marcelo Luiz Lima BRANDÃO, Natália Scudeller UMEDA, Ivano de FILIPPIS	214-218
1608	Desenvolvimento de cookies adicionados de farinha de yacon (<i>Smallanthus sonchifolius</i>): caracterização química e aceitabilidade sensorial entre portadores de Diabetes Mellitus Yacon (<i>Smallanthus sonchifolius</i>) flour added-cookies: chemical characterization and sensory acceptability among the patients with diabetes mellitus Mayla Gabriely Giacomel RODRIGUES, Elisvânia Freitas dos SANTOS, Fabiane La Flor Ziegler SANCHES, Daiana NOVELLO, Maria Raquel MANHANI, Mikael NEUMANN	219-225
1609	Aceitabilidade sensorial de sopas elaboradas com diferentes sais substitutos de cloreto de sódio Sensory acceptability of soup prepared with different salts sodium chloride substitutes Sandy Mary OTTO, Daiane SERBA, Daiana NOVELLO	226-232
1610	Avaliação da contaminação por bromato pães do tipo francês Analysis on the occurrence of bromate contamination in French type bread Dayanna Joyce Marques QUEIROZ, Everlane Ferreira MOURA, Manuela Alves da CUNHA, Anna Cecília Queiroz de Medeiros	233-237
■ RESUMOS DE TESES E DISSERTAÇÕES		
■ INSTRUÇÕES AOS AUTORES		238-243

Avaliação dos indicadores de qualidade de laboratórios de citopatologia cervical

Avaliação dos indicadores de qualidade de laboratórios de citopatologia cervical

RIALA6/1599

Jacqueline PLEWKA¹, Maurício TURKIEWICZ², Bruna Fischer DUARTE¹, Michele Ana Flores CHAVES¹, Cíntia CESTARI¹, Daniela Cristina TARTARI¹

*Endereço para correspondência: ¹Hospital Universitário do Oeste do Paraná, Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Avenida Tancredo Neves, 3224, Bairro Santo Onofre, CEP 85806-470, Cascavel - PR, Brasil. Tel: (45) 3321-5400 e (45) 3321-5230. E-mail: jacqueline.plewka@unioeste.br.

²Laboratório Labcell Citologia Diagnóstica LTDA. Cascavel, PR, Brasil

Recebido: 10.02.2014 - Aceito para publicação: 30.06.2014

RESUMO

Neste trabalho foi avaliado o desempenho dos 13 laboratórios que realizaram o exame citopatológico para o SUS no Paraná, por meio de seis indicadores do monitoramento interno da qualidade (MIQ). Foi realizado estudo retrospectivo, baseado nos dados obtidos no programa do Ministério da Saúde, SISCOLO/CNES, dos laboratórios que efetuaram acima de 1.500 exames de Papanicolaou/ano, de janeiro de 2008 a dezembro de 2012. A avaliação da qualidade dos laboratórios foi feita pela análise do índice de positividade (IP), percentuais de exames compatíveis com ASC entre os exames satisfatórios, ASC entre os exames alterados, exames compatíveis com HSIL, exames insatisfatórios e razão ASC/SIL. Dos laboratórios avaliados, apenas um apresentou produtividade maior que 15 mil exames/ano conforme recomendação da QualiCito, e correspondeu a 82,9 % dos exames realizados no estado. O IP mostrou que 46,1 % dos laboratórios apresentaram resultado muito baixo, 38,5 % baixo, apenas 18,1 % dentro da faixa esperada. Com relação ao percentual de HSIL, 23,1 % dos laboratórios apresentaram percentual igual ou superior a 0,4 %. Portanto, os resultados deste estudo mostraram que os indicadores de qualidade do MIQ, dos laboratórios que realizaram exame citopatológico para o SUS, estão abaixo dos parâmetros recomendado pelo Ministério da Saúde.

Palavras-chave. controle de qualidade, citologia, colo do útero.

ABSTRACT

This study aimed at evaluating the profile of 13 laboratories that perform the Pap smear for the Public Healthcare System in Paraná State, Brazil, through six internal quality monitoring indicators (MIQ). This retrospective study was based on the data obtained from the Ministry of Health Program, SISCOLO/CNES, including laboratories performing over 1500 Pap tests/year, from January 2008 to April 2013. The quality assessment of laboratories was performed by analyzing the positivity rate (PR), the percentage of tests compatible with ASC among satisfactory examinations, the ASC among abnormal tests, the tests compatible with HSIL, the unsatisfactory rate and the ASC/SIL ratio. Of analyzed laboratories, only one demonstrated productivity higher than 15.000 tests/year as recommended by QualiCito, and these corresponded to 82.9 % of tests performed in the State. The PR was very low in 46.1 % of laboratories and low in 38.5 %; 18.1 % of laboratories only were within the expected range. The percentage of HSIL was equal to or greater than 0.4 % in 23.1 % of laboratories. Therefore, this study showed that the quality indicators of MIQ of the laboratories performing the cervical cancer screening are below the parameters recommended by the Ministry of Health.

Keywords. quality control, cytology, uterine cervix.

INTRODUÇÃO

A realização periódica do exame citopatológico do colo uterino, ou Papanicolaou, é uma das estratégias mais efetivas, seguras e de baixo custo para detecção precoce deste câncer, desde que executado com qualidade¹. Vários trabalhos demonstraram variação na sensibilidade, com valores de 43,8 % a 66,7 %, assim como a especificidade de 80,9 % a 98,0 %²⁻⁴. Variações na especificidade e sensibilidade são observadas por diversos fatores, como por exemplo, experiência dos escrutinadores, ser realizado por profissionais habilitados e qualificados, condições adequadas de trabalho e qualidade das amostras nas fases pré-analíticas e analítica^{5,6}.

Uma das estratégias adotadas para avaliar a confiabilidade dos exames citopatológicos é através de Programas de Controle de Qualidade⁷. Segundo a Organização Panamericana de Saúde (OPS)⁸ o monitoramento dos laboratórios de citopatologia deve ser avaliado com base em três indicadores: produtividade obtida pela divisão do número total de citologias avaliadas pelo número de examinadores; qualidade medida pela proporção de resultados por categorias diagnósticas; e desempenho avaliado pelo grau de concordância entre citologia e histologia^{9,10}.

O monitoramento de qualidade dos exames citopatológicos no Brasil foi definido através da Portaria SPS/SAS nº 92 de 16/10/2001, que determina a execução do monitoramento externo e interno da qualidade (MEQ e MIQ) pelos laboratórios de citologia que prestam serviço ao Sistema Único de Saúde (SUS)¹¹. O Estado do Paraná foi um dos pioneiros na implantação de uma Unidade de Monitoramento Externo de Qualidade Citológica (UMEQ) do Programa de Prevenção do Câncer do Colo Uterino¹².

Em 2012 o Ministério da Saúde (MS) e o Instituto Nacional do Câncer (INCA) elaboraram o Manual da Gestão da Qualidade para Laboratórios de Citopatologia, após visitas técnicas pela Força Tarefa do MS para análise dos laboratórios de citopatologia no âmbito do SUS, com o objetivo de melhorar a confiabilidade dos exames citopatológicos¹¹. Sendo ratificado pela portaria nº 1.504 de 23 de julho de 2013, que instituiu a Qualificação Nacional em Citopatologia na Prevenção do Câncer do Colo do Útero (QualiCito)¹³, e retificada pela portaria 3.388 de 30 de dezembro de 2013¹⁴. O Manual e as Portarias estabeleceram critérios para avaliação da qualidade do exame citopatológico do colo uterino,

por meio do acompanhamento do desempenho dos laboratórios prestadores de serviços para o SUS^{11,13,14}.

A QualiCito consiste na definição de padrões e na avaliação da qualidade do exame citopatológico do colo uterino por meio do acompanhamento do desempenho dos laboratórios públicos e privados prestadores de serviços para o SUS¹¹. Tem ainda como objetivos: incentivar o aumento da cobertura desses exames na população feminina de 25 a 64 anos; estabelecer critérios e parâmetros de qualidade para o contrato e o distrato de laboratórios prestadores de serviços para o SUS; promover a educação permanente dos profissionais de saúde; monitorar através do Sistema de Informação do Câncer do MS, os indicadores de qualidade dos exames citopatológicos do colo do útero^{11,13,14}.

A QualiCito é executada por meio do MIQ e do MEQ. O primeiro corresponde a um sistema de controle de qualidade de exames realizados, estabelecendo critérios de avaliação, com registro de critérios de avaliação e dos resultados encontrados, permitindo assim identificação das não conformidades e implementação de ações corretivas e preventivas realizadas pelo próprio laboratório. O segundo compreende diferentes formas de avaliação do produto final e de seus executores, sendo efetuado por pessoal externo ao laboratório¹¹.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o desempenho dos laboratórios que realizaram o exame citopatológico para o SUS do Estado do Paraná, por meio de seis indicadores do monitoramento interno da qualidade.

MATERIAL E MÉTODO

Foi realizado um estudo retrospectivo, com base nos dados obtidos no programa de informática oficial do MS, SISCOLO, e no Cadastro Nacional de Estabelecimentos de Saúde (CNES), dos 22 laboratórios credenciados ao SUS do Estado do Paraná, que efetuaram exame citopatológico no período de janeiro de 2008 à dezembro de 2012.

Do total de 22 laboratórios credenciados para a realização dos exames citopatológicos do SUS nesse Estado no período analisado, apenas 13 laboratórios foram avaliados, tendo como critério de inclusão todas as informações necessárias para os cálculos dos seis indicadores do MIQ, e produção acima de 1.500 exames/ano, ou seja, 10 % do volume mínimo recomendado pela OPS e pela QualiCito, que corresponde a 15.000 exames/ano¹³.

As variáveis estudadas foram: número total dos exames processados, satisfatórios e, alterados classificados como: células escamosas atípicas de significado indeterminado possivelmente não neoplásico (ASC-US); células escamosas atípicas de significado indeterminado não podendo excluir lesão intraepitelial de alto grau (ASC-H); células glandulares atípicas de significado indeterminado possivelmente não neoplásicas; células glandulares atípicas de significado indeterminado não podendo excluir lesão intraepitelial de alto grau; células atípicas de origem indefinida possivelmente não neoplásicas; lesão intraepitelial escamosa de baixo grau (LSIL); lesão intraepitelial escamosa de alto grau (HSIL); lesão intraepitelial escamosa de alto grau não podendo excluir microinvasão; carcinoma epidermóide invasor; adenocarcinoma *in situ*; adenocarcinoma invasor cervical e endometrial e, sem outras especificações¹⁵.

A avaliação da qualidade dos laboratórios se deu por análise de seis indicadores do MIQ, cujas fórmulas para o cálculo dos indicadores são descritas a seguir:

1. Índice de Positividade (IP)

$$\frac{\text{Nº de exames alterados em determinado local e ano}}{\text{Total de exames satisfatórios}} \times 100$$

O IP determina a prevalência de alterações celulares nos exames citológicos, e indica a sensibilidade desse exame no rastreamento para detectar lesões na população examinada¹¹.

Para uma análise mais crítica dos laboratórios, o MS/INCA determinou a seguinte categorização do IP¹¹: muito baixa - inferior a 2,0 %; baixa entre 2,0 % e 2,9 %; esperada entre 3,0 % e 10 %; e acima do esperado superior a 10 %.

2. Percentual de exames compatíveis com ASC entre os exames satisfatórios

$$\frac{\text{Nº de exames com ASC-US e ASC-H}}{\text{Total de exames satisfatórios}} \times 100$$

As células escamosas atípicas de significado indeterminado (incluem ASC-US e ASC-H) representam dúvida diagnóstica, no qual os achados citológicos não são suficientes para o diagnóstico de

lesão intraepitelial. A recomendação do MS/INCA é que o percentual de ASC não seja superior de 4 a 5 % dos exames satisfatórios¹¹.

3. Percentual de ASC entre os exames alterados

$$\frac{\text{Nº de exames com ASC-US e ASC-H}}{\text{Total de exames alterados}} \times 100$$

Esse indicador avalia o percentual de ASC em conjunto com o IP, pois um valor adequado para o IP pode conter um elevado percentual de exames compatíveis com ASC, que representa uma ambiguidade citológica¹¹. O percentual de atipias de células escamosas de significado indeterminado deve ser inferior a 60 % dos exames alterados¹³.

4. Razão ASC/SIL

$$\frac{\text{Nº de ex. compatíveis com ASC-US e ASC-H}}{\text{Nº de exames com LSIL e HSIL}}$$

Essa razão indica dificuldade técnica no diagnóstico de lesões intraepiteliais escamosas (LSIL e HSIL), e permite identificar o baixo desempenho do laboratório no rastreamento do câncer¹⁶. As recomendações atuais para laboratórios são para manter uma relação não superior a 3:1, embora essas recomendações sejam baseadas em dados de pesquisa, em vez de medidas reais de sensibilidade ou especificidade^{11,17}.

5. Percentual de exames compatíveis com HSIL

$$\frac{\text{Nº de exames HSIL}}{\text{Total de exames satisfatórios}} \times 100$$

As lesões intraepiteliais de alto grau apresentam potencial de progressão para o câncer do colo do útero, portanto sua detecção é determinante na prevenção dessa patologia. Esse indicador mede a capacidade de detecção de lesões precursoras, e o percentual deve ser igual ou superior a 0,4 % dos exames satisfatórios^{11,13}.

6. Percentual de amostras insatisfatórias

$$\frac{\text{Nº de amostras insatisfatórias}}{\text{Total de exames}} \times 100$$

A amostra é considerada insatisfatória quando apresenta material acelular ou hipocelular (menos de 10 % da lâmina recoberta por células escamosas); ou quando a leitura de mais de 75 % do esfregaço for prejudicada pela presença de sangue, piócitos, artefatos de dessecamento, intensa superposição celular, dentre outros fatores, desde que não seja observada nenhuma alteração celular. A análise da insatisfatoriedade das amostras é importante para detectar problemas na fase pré-analítica do exame¹¹. O parâmetro da Organização Mundial da Saúde (OMS) para amostras insatisfatórias é de até 5 %¹⁸.

A análise dos dados foi realizada por meio do programa Microsoft Office Excel 97-2003.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com os dados do SISCOLO e CNES, no período avaliado o Estado do Paraná apresentou 22 laboratórios credenciados ao SUS que realizaram 3.363.324 exames citopatológicos. Nesse trabalho, foram avaliados 13 laboratórios que fizeram mais que 1.500 exames/ano e, que apresentaram todas as variáveis utilizadas nos cálculos dos seis indicadores do MIQ, esses

laboratórios realizaram 3.306.301 exames citopatológicos, correspondendo a 98,3 % dos exames produzidos nesse período (Tabela 1).

Conforme os dados apresentados na Tabela 1, observou-se que o Laboratório nº 1 realizou uma média de 82,9 % do total de exames citopatológicos avaliados, enquanto que os demais laboratórios realizaram entre 0,4 a 2,2 % no período avaliado.

A QualiCito recomenda como um dos critérios de qualidade, que o laboratório citopatológico público ou privado conveniado ao SUS tenha uma produção mínima de 15 mil exames/ano¹³. Diante disso, somente o Laboratório nº 1 foi satisfatório para esse requisito, e o Laboratório nº 2 nos anos de 2008 a 2010, sendo que em 2012 podemos observar redução significativa no número de exames avaliados, sem justificativa relatada no SISCOLO.

No Brasil em 2008, apenas 15 % de um total de 1.116 unidades laboratoriais apresentaram produção acima de 15 mil exames/ano. Outros 25 % dos laboratórios realizaram acima de 10 mil exames/ano, e 58 % menos de 5 mil exames/ano¹⁸, portanto, valores próximos foram observados no Estado do Paraná, como verificado neste estudo, e distante do recomendado pela Portaria nº

Tabela 1. Número de exames citopatológicos realizados pelos laboratórios prestadores de serviço ao SUS no Paraná, nos anos de 2008 a 2012

Lab	2008		2009		2010		2011		2012		Média	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
1	503910	82,1	571900	81,5	536368	81,7	576013	83,2	552917	86	548221	82,9
2	17449	2,8	19085	2,7	18828	2,9	14994	2,2	1745	0,3	14420	2,2
3	12922	2,1	11063	1,6	8056	1,2	7767	1,1	7394	1,2	9440	1,4
4	12413	2,0	10068	1,4	8475	1,3	7183	1,1	8593	1,3	9346	1,4
5	12360	2,0	12380	1,8	10085	1,5	9872	1,4	7074	1,1	10354	1,6
6	12400	2,0	14377	2,1	13566	2,1	14425	2,1	12171	1,9	13387	2,0
7	7302	1,2	11046	1,6	9731	1,5	11090	1,6	11506	1,8	10135	1,5
8	8663	1,4	10595	1,5	10484	1,6	10624	1,5	9582	1,5	9989	1,5
9	6633	1,1	7890	1,1	10208	1,6	8707	1,3	8140	1,3	8315	1,3
10	7358	1,2	12096	1,7	10786	1,6	9777	1,4	8447	1,3	9692	1,4
11	5913	1,0	9829	1,4	10617	1,6	11068	1,6	10548	1,6	9995	1,5
12	4414	0,7	8188	1,2	6535	1,0	8377	1,2	2437	0,4	5990	0,9
13	2189	0,4	2956	0,4	2335	0,4	2282	0,3	2095	0,3	2371	0,4
Total	613926	100	701473	100	656074	100	692179	100	642649	100	661655	100

Fonte: SISCOLO - DATASUS

3.388¹⁴ do MS e pela OPS⁸.

Já em 2009, 85 % dos laboratórios citopatológicos no Brasil (899) realizaram menos de 15 mil exames/ano, e 15 % dos laboratórios (152) tiveram uma produção igual ou maior que 15 mil exames/ano. Dos laboratórios que realizaram mais que 15 mil exames citopatológicos, a distribuição por região brasileira foi: 7 % na região norte (8 laboratórios), 10 % na região nordeste (41), 16 % (15) na região centro-oeste, 19 % na região sudeste (56) e 25 % na região Sul (32)¹⁹.

A Tabela 2 mostra as médias dos resultados dos indicadores do MIQ dos 13 laboratórios avaliados no estado do Paraná.

A análise do IP demonstrou que a maioria dos

laboratórios que realizaram mais de 1.500 exames/ano no Estado do Paraná apresentaram resultado abaixo do esperado, sendo 46,1 % muito baixo e 38,5 % baixo, ou seja, 84,6 % dos laboratórios tiveram um IP abaixo do recomendado, podendo inferir uma alteração do método de revisão do MIQ para essas unidades laboratoriais, como a inclusão de revisão rápida de 100 % dos esfregaços negativos, ou do pré-escrutínio rápido de todos os esfregaços. Um dado preocupante é que o Laboratório n°1, que realizou 82,9 % dos exames citológicos do SUS no Paraná, obteve um IP baixo de 2,1 %.

Os resultados dos IP deste estudo estão de acordo com os dados obtidos por Bortolon et al.¹⁶ os quais observaram que no Estado do Paraná no ano de 2010,

Tabela 2. Média dos indicadores da QualiCito dos laboratórios prestadores de serviço ao SUS no Paraná, no período de 2008 à 2012

Laboratório	IP	ASC/Sat.	ASC/Alt.	ASC/SIL	HSIL/Sat.	Insatisfatórios
1	2,1	1,1	54,5	1,4	0,3	0,3
2	2,8	1,4	44,0	0,9	0,3	0,2
3	2,6	1,4	55,9	1,4	0,3	0,2
4	1,8	1,1	63,4	1,9	0,1	0,1
5	1,6	0,9	54,5	1,4	0,2	0,2
6	4,9	1,5	28,4	0,5	1,8	0,5
7	2,2	1,6	72,3	3,3	0,1	0,1
8	1,5	0,8	53,4	1,3	0,2	0,1
9	1,6	0,3	16,4	0,2	0,4	0,2
10	2,0	1,0	50,4	1,2	0,2	0,1
11	1,7	1,0	59,1	1,8	0,2	0,1
12	2,9	2,1	71,3	5,2	0,1	0,5
13	11,4	7,2	62,2	2,7	0,9	1,5
Média	3,0	1,6	52,8	1,8	0,4	0,3

IP – Percentual de Índice de Positividade; ASC/Sat. – Percentual de células atípicas de significado indeterminado escamosa (ASC) em relação aos exames satisfatórios; ASC/Alt. – Percentual de ASC em relação aos exames alterados; ASC/SIL – razão de ASC em relação às lesões intraepiteliais escamosas (SIL); HSIL/Sat. – Percentual de lesão intraepitelial escamosa de alto grau (HSIL) em relação aos exames satisfatórios, Insatisfatórios – Percentual de insatisfatórios em relação ao total de exames

Fonte: SISCOLO - DATASUS

41 % dos laboratórios apresentavam IP muito baixo, 35 % baixo e, apenas 24 % dentro do esperado, sendo que esses foram responsáveis por apenas 2 % do total de exames realizados no estado.

Os IP baixos, quando comparados com países no qual obtiveram êxitos em programas de prevenção do câncer do colo uterino, como Estados Unidos (IP 6,8 %) ²⁰ e Noruega (IP 4,9 %) ²¹ podem apontar a presença de exames falso-negativos, indicando a necessidade em reavaliar o MIQ destes laboratórios, bem como intensificar a qualificação dos profissionais e o desempenho dos exames cito-histopatológicos ¹¹.

Laboratórios com positividade maior que 10 % devem ser melhores avaliados, pois podem incluir serviços de referência, de média ou alta complexidade para o tratamento de câncer cervical ¹¹, informação não disponível no SISCOLO, como o Laboratório nº 13, que apresentou IP de 11,4 % (Tabela 2).

O percentual de ASC dentre os exames satisfatórios deve ser avaliado em conjunto com o IP dos exames citopatológicos ¹¹. Com exceção do Laboratório nº 13, os demais laboratórios avaliados apresentaram percentuais de ASC/satisfatório condizentes com a literatura (até 5 %) ^{22,23}, porém como seus IP foram abaixo do recomendado, com ressalva do Laboratório nº 6 que teve um IP de 4,9 %, conseqüentemente o percentual ASC/satisfatório será baixo, possibilitando uma ambigüidade na interpretação desse indicador, se o mesmo não for avaliado com cuidado.

No trabalho de Bortolon et al. ¹⁶ no ano de 2010, foi observado um percentual de ASC dentre os exames satisfatórios de 1,1 % nos laboratórios do Paraná, semelhantes aos outros estados da região sul como: 1,1 % no Rio Grande do Sul, e 1,3 % em Santa Catarina. Em um estudo apresentado por Quddus et al. ²⁴ nos Estados Unidos, encontraram uma média de 4,2 % no período de 1998 à 2002, valor mais elevado que o observado neste estudo, porém dentro do recomendado pela Portaria nº 3.388 do MS ¹⁴.

Em nosso trabalho a média do percentual de ASC dentre os exames alterados foi de 52,8 % (Tabela 2), valor próximo ao observado por Fernandes et al. ²⁵ no Serviço Integrado Tecnológico em Citologia do INCA, que apresentou a média de 49,23 %. Porém na análise individual dos laboratórios avaliados, quatro laboratórios 30,8 % apresentaram esse indicador acima do recomendado, de até 60 %. Quando esse indicador é avaliado em conjunto com o IP e, com a percentagem

de exames compatíveis com lesão de alto grau, demonstraram dificuldade na identificação dos critérios citomorfológicos das lesões intraepiteliais de baixo e alto grau. Com exceção dos Laboratórios nº 6 e 13 nos quais seus IP 4,9 % e 11,4 % respectivamente e HSIL/satisfatório 1,8 % e 0,9% indicaram resultados dentro do recomendado, os demais laboratórios apresentaram esses indicadores abaixo do recomendado.

O IP elevado do Laboratório nº 13 11,4 % pode inferir que o mesmo está interpretando muitas alterações citológicas como células atípicas de significado indeterminado, pois o indicador ASC/alterado encontra-se acima de 60 %, e conseqüentemente elevando o IP. Isso pode ser observado nos Laboratórios nº 4, 7 e 12, pois seus IP apesar de estarem abaixo do recomendado poderiam ser mais baixos ainda do apresentado na Tabela 2, devido ao fato que o percentual ASC/alterado desses laboratórios estão acima do recomendado, respectivamente 63,4 %, 72,3 % e 71,3 %, cujas alterações detectadas em sua rotina foram atípicas de significado indeterminado, mostrando a importância em rever os critérios citomorfológicos visando assim melhoria na detecção das lesões precursoras.

Com relação à razão ASC/SIL, 84,6 % dos laboratórios avaliados nesse estudo apresentaram valores dentro do recomendado (até três), e 15,4 % dos laboratórios demonstraram razão maior que três, entretanto a média dessa razão dos 13 laboratórios foi de 1,8 casos de ASC para cada caso de SIL, portanto dentro do esperado. Dois estudos realizados em laboratórios nos EUA ^{20,25} encontraram razões semelhantes para esse indicador de 1,4.

Ainda em relação à comparação de ASC/alterado e ASC/SIL, observou-se que os resultados referentes aos Laboratórios nº 7 (72,3 % e 3,3), e 12 (71,3 % e 5,2) chamaram atenção, pois demonstrou que em sua rotina a maioria dos exames alterados foram classificados como atipia de significado indeterminado, podendo inferir dificuldade na identificação de critérios citomorfológicos de lesões pré-malignas e malignas na fase pré-analítica, bem como a má fixação ou representatividade celular do material citológico coletado na fase pré analítica. No estudo de Rocha et al. ²⁶ em um laboratório do Estado do Maranhão, o percentual de ASC/alterado foi 84,42 %, e a razão de ASC/SIL foi de 5,42, portanto em consonância com os Laboratórios nº 7 e 12, avaliados nesse trabalho.

Quanto ao percentual de HSIL entre os exames satisfatórios, 76,9 % dos laboratórios apresentaram

percentuais inferiores ao recomendado de 0,4 %, mostrando que a maioria dos laboratórios não identificou as lesões de alto grau que são as verdadeiras lesões precursoras do câncer do colo do útero, inclusive o Laboratório nº 1 responsável por mais de 80 % da produção dos exames citopatológicos nesse Estado. No trabalho de Bortolon et al¹⁶, a média do percentual de HSIL entre os exames satisfatórios no Brasil foi de 0,3 %, bem como no Estado do Paraná (0,3 %), sendo que o maior percentual foi observado no Estado de Roraima (0,7 %) e o menor percentual nos Estados de Amapá e Alagoas (0,1 %).

Quanto ao índice de amostras insatisfatórias observou-se uma média de 0,3 % neste trabalho, semelhantes ao encontrado no trabalho de Davey et al²⁰ e Eversole et al²⁷ que apresentaram respectivamente 0,5 % e 0,9 % de amostras insatisfatórias para laboratórios participantes do *College of American Pathologists*, e no trabalho de Quddus et al.²⁵ o indicador variou de 0,68 % a 1,01 % entre 1998 e 2002. No Brasil esse indicador manteve-se abaixo de 1,2 % entre 2002 e 2008¹⁸, sendo que a OPS e a OMS estabelece como padrão de qualidade, o percentual de exames citopatológicos insatisfatórios de até 5 %^{18,28}.

Vale ressaltar que os resultados dos índices do MIQ devem ser sempre avaliados em conjunto, a análise dos seis indicadores desse trabalho demonstrou que apenas um dos laboratórios conveniados ao SUS no Estado do Paraná (Laboratório nº 6) apresentou todos os indicadores dentro das normas da QualiCito, mesmo com produção anual inferior à 15 mil exames/ano.

No Brasil, as taxas de mortalidade por câncer de colo do útero se mantiveram praticamente constantes nas últimas três décadas, com taxas de 5,0 mortes para cada 100 mil mulheres em 2000. Apenas em 2007, quase nove anos após a implantação do Programa Nacional de Combate ao Câncer do Colo do Útero, foi observado um declínio da taxa de mortalidade para esta neoplasia, com 4,7 mortes para cada 100 mil mulheres. De 2007 à 2011 as taxas de mortalidade permaneceram estáveis, com 4,6 mortes para cada 100 mil^{18,29}.

O Paraná entre 1999 a 2003 apresentou taxas de mortalidade nas regiões noroeste e nos campos gerais de 2 a 4,3 para cada 100 mil mulheres, na região norte de 4,4 a 6,3, nas regiões oeste e centro oeste de 6,4, e na região leste de 6,5 a 6,6 mortes para cada 100 mil mulheres³⁰.

Devido a elevadas taxas de mortalidade deste câncer no Brasil, assim como no Estado do Paraná, quando comparado com programas de prevenção bem

sucedidos³¹, observou-se uma deficiência na identificação das lesões precursoras, a necessidade de melhoria da qualidade dos exames citopatológicos realizados e mais investimentos nos programas de prevenção dessa patologia.

O perfil dos laboratórios quanto à natureza da organização, tipo de gestão e categorização dos profissionais envolvidos na leitura dos exames citopatológicos são fatores importantes na avaliação dos indicadores de qualidade desses exames⁹. Nesse estudo conseguimos identificar os profissionais de nível superior habilitado cadastrado no CNES participantes do processo da análise dos exames citopatológicos nos laboratórios, mas nesse sistema não conseguimos identificar a categorização e qualificação dos profissionais que realizaram os exames.

As informações referentes aos indicadores de qualidade dos laboratórios prestadores de serviço ao SUS poderão servir de subsídios aos gestores estaduais e municipais na implementação de estratégias mais eficientes e eficazes para o Programa Nacional de Controle do Câncer do Colo do Útero, como no Estado do Paraná, e conseqüentemente contribuir para a redução da mortalidade desse câncer.

CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo mostraram que os indicadores de qualidade do monitoramento interno da qualidade da maioria dos laboratórios que realizaram exame citopatológico para o SUS no Estado do Paraná, apresentaram parâmetros abaixo dos recomendados pelo Ministério da Saúde. Diante desses resultados faz-se necessário à implementação da qualidade dos laboratórios de citopatologia que atendem ao SUS, tanto na habilitação e qualificação dos profissionais que realizam os exames, na adequação do local de trabalho, produção e carga horária de trabalho, até a avaliação periódica do MIQ e MEQ, recomendada pelo Manual de Gestão da Qualidade e Portaria nº 3.388/dezembro de 2014^{11,14}.

REFERÊNCIAS

1. Albuquerque KM, Frias PG, de Andrade CLT, Aquino EML, Menezes G, Szwarcwald CL. Cobertura do teste de Papanicolaou e fatores associados à não-realização: um olhar sobre o Programa de Prevenção do Câncer do Colo do Útero em Pernambuco, Brasil. *Cad Saúde Pública*.2009;25(2):S301-9.

2. Stofler MECW, Nunes RD, Rojas PFB, Junior AT, Schneider IJC. Avaliação do desempenho da citologia e colposcopia comparados com a histopatologia no rastreamento e diagnóstico das lesões do colo uterino. *ACM*.2011;40(3):30-6.
3. Etlinger D, Pereira SMM, Sakai YI, Yamamoto LSU, Iglezias SD, Basso MC et al. Análise das Discordâncias Diagnósticas dos Exames Citopatológicos do Programa de Monitoramento Externo de Qualidade no Estado de São Paulo, Brasil, 2000-2010. *Rev Bras Cancerol*.2010;58(3):481-8.
4. Bano A, Haq G, Sheikh A. Pap smear versus visual inspection of cervix with acetic acid (VIA) for detection of cervical abnormalities. *Pak J Surg*.2013;29(1):46-51.
5. Amaral RG, dos Santos SHR, Catharino JMR, da Silva LCB, Westin MCA, Cotta AC et al. Revisão rápida de esfregaços cervicais como método de garantia interna de qualidade. *J Bras Patol Med Lab*.2003;39(2):151-5.
6. BC Cancer Agency. 2009 Annual report [Internet]. Vancouver: Cervical Cancer Screening Program; 2010 [acesso em 2013 out. 17]. 30p. Disponível em: [http://www.bccancer.bc.ca/NR/rdonlyres/A6E3D1EC-93C4-4B66-A7E8-B025721184B2/44207/2009CCSP_Annual_ReportFINALFeb1910.pdf]
7. Branca M, Coleman DV, Marsan C, Morosini P, Leonardo da Vinci – Cytotrain Project. Quality assurance and continuous quality improvement in laboratories which undertake cervical cytology. Roma: Pharm It; 2000 [acesso em 2013 out 17]. Disponível em: [<http://www.eurocytology.eu/static/eurocytology/Cytotrain%20CQI.pdf>].
8. Organización Panamericana de La Salud (OPS). Módulo de citología: procedimientos. Washington, D.C.: OPS, 2000.
9. Thuler LCS, Zardo LM, Zeferino LC. Perfil dos laboratórios de citopatologia do Sistema Único de Saúde. *J Bras Patol Med Lab*.2007;43(2):103-14.
10. Jones BA, Davey DD. Quality management in gynecologic cytology using interlaboratory comparison. *Arch Pathol Lab Med*.2000;124(5):672-81
11. Instituto Nacional de Câncer (Brasil). Manual de gestão da qualidade para laboratório de citopatologia. Rio de Janeiro: INCA; 2012. 188 p.
12. Freitas HG & Thuler LCS. Monitoramento externo da qualidade dos exames citopatológicos cervicais realizados pelo Sistema Único de Saúde (SUS) no Estado de Mato Grosso do Sul. *Rev Bras Ginecol Obstet*.2012;34(8):351-6.
13. Ministério da Saúde. Portaria nº 1.504, de 23 de julho de 2013. Institui a Qualificação Nacional em Citopatologia na prevenção do câncer do colo do útero (QualiCito), no âmbito da Rede de Atenção à Saúde das Pessoas com Doenças Crônicas. *Diário Oficial [da] União*. 2013 jul. 24; Seção 1. p. 31-3.
14. Ministério da Saúde. Portaria nº 3.388, de 30 de dezembro de 2013. Redefine a Qualificação Nacional em Citopatologia na prevenção do câncer do colo do útero (QualiCito). *Diário Oficial [da] União*. 2013 dez. 31; Seção 1. p. 42.
15. Instituto Nacional de Câncer (Brasil). Nomenclatura Brasileira para Laudos Citopatológicos Cervicais. 3ª ed. Rio de Janeiro: INCA; 2012.
16. Bortolon PC, Silva MAF, Corrêa FM, Dias MBK, Knupp VMAO, Assis M et al. Avaliação da Qualidade dos Laboratórios de Citopatologia do Colo do Útero no Brasil. *Rev Bras Cancerol*.2012;58(3):435-44.
17. Renshaw AA, Deschênes M, Auger A. ASC/SIL ratio for cytotechnologists: a surrogate marker of screening sensitivity. *Am J Clin Pathol*.2009;131:776-81.
18. Instituto Nacional de Câncer (Brasil). Plano de ação para redução da incidência e mortalidade por câncer do colo do útero: sumário executivo. Rio de Janeiro: INCA; 2010. 40 p.
19. Teixeira VMF, Gomes FMP, Pierantoni CR, França T. Mapeamento dos Trabalhadores de Nível Técnico na Área de Citotecnologia no Brasil. *Rev Bras Cancerol*.2012;58(4):663-73.
20. Davey DD, Neal MH, Wilbur DC, Colgan TJ, Styer PE, Mody DR. Bethesda 2001 Implementation and reporting rates: 2003 practices of participants in the College of American Pathologists Interlaboratory Comparison Program in cervicovaginal cytology. *Arch Pathol Lab Med*.2004;128:1224-9.
21. Nygard JF, Skare GB, Thoresen SØ. The cervical cancer screening programme in Norway, 1992-2000: changes in Pap smear coverage and incidence of cervical cancer. *J Med Screen*.2002;9(2):86-91.
22. International Agency For Research On Cancer. Cervix cancer screening. In: IARC handbooks of cancer prevention, v. 10. Lyon, 2005. 302 p.
23. Miller AB, Nazeer S, Fonn S, Brandup-Lukanow A, Rehman R, Cronje H et al. Report on consensus conference on cervical cancer screening and management. *Int J Cancer*.2000;86(3):440-7.
24. Qudus MR, Sung CJ, Eklund CM, Reilly ME, Steinhoff MM. ASC/SIL ratio following implementation of 2001 Bethesda System. *Diagn Cytopathol*.2004;30(4):240-2.
25. Fernandes F, Furtado Y, Russomano F, Silva KS, Silveira R, Farias P et al. Diagnóstico Citopatológico de ASC-US e ASC-H no Serviço Integrado Tecnológico em Citologia do INCA. *Rev Bras Cancerol*.2012;58(3):453-9.
26. Rocha C, Turkiewicz M, Plewka J, Modesto J. Avaliação de indicadores de rastreamento do câncer cervical de um laboratório do Estado do Maranhão, de 2010 a 2012. 8ª Mostra de Produção Científica da Pós-Graduação Lato Sensu da PUC Goiás. [acesso em 2014 jan. 10]. Disponível em: http://www.cpgls.ucg.br/amostra/Artigos/saude_e_biológicas/avaliação_de_indicadores_de_rastreamento_do_câncer_cervical_de_um_laboratório_do_estado_do_maranhão_de_2010_a_2012.pdf
27. Eversole GM, Moriarty AT, Schwartz MR, Clayton AC, Souers R, Fatheree LA et al. Practices of participants in the College of American Pathologists Interlaboratory Comparison Program in cervical cytology, 2006. *Arch Pathol Lab Med*.2010;134:331-5.
28. Instituto Nacional do Câncer. Informativo Detecção precoce. Boletim ano 3, nº 3 agosto/dezembro de 2012. [acesso em 2014 jan. 13]. Disponível em: [http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/informativo_deteccao_precoce_3_2012.pdf].
29. Instituto Nacional de Câncer (Brasil). Atlas de Mortalidade por Câncer. [acesso em 2014 jan. 07]. Disponível em: [<http://mortalidade.inca.gov.br/Mortalidade/index.jsp>].
30. Secretaria de Estado da Saúde do Paraná. Atlas de Mortalidade por Câncer no Paraná 1999-2003. Curitiba: SESA; 2006. 52 p.
31. Molpus KL, Jones HW. Tumores Ginecológicos. In: Goldman L, Ausiello D. Cecil: Tratado de Medicina Interna. 22ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005. 1433-39

Avaliação de limite de decisão ($CC\alpha$) e capacidade de detecção ($CC\beta$) a partir de curvas analíticas em análises de águas para substâncias com teores permitidos: uma planilha eletrônica para a interpretação de resultados em Laboratórios de Saúde Pública

Estimating the decision limit ($CC\alpha$) and the capability of detection ($CC\beta$) from analytical curves on water analysis for substances with permitted limits: an electronic spreadsheet for results interpretation in Public Health Laboratories

RIALA6/1600

Sérgio DOVIDAUSKAS^{1*}, Isaura Akemi OKADA¹, Marina Miyuki OKADA¹, Rita de Cássia BRIGANTI¹, Camila Cardoso de OLIVEIRA²

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

²Núcleo de Análise e Tratamento de Dados, Centro de Materiais de Referência, Instituto Adolfo Lutz

Recebido: 11.03.2014 - Aceito para publicação: 30.06.2014

RESUMO

Neste trabalho são apresentadas planilhas eletrônicas construídas em software *Microsoft Excel*[®] que possibilitam avaliar as estimativas de limite de decisão ($CC\alpha$) e capacidade de detecção ($CC\beta$) nas regiões do limite de detecção e do Valor Máximo Permitido (VMP). As estimativas são realizadas a partir de curvas analíticas lineares e homoscedásticas construídas em procedimentos de calibração segundo as normas ISO e recomendações IUPAC. Após a validação por processamento manual dos dados, as planilhas eletrônicas foram utilizadas nas determinações de nitrito em águas envasadas (VMP = 0,02 mg/L) e de fluoreto em águas de abastecimento público (intervalo de conformidade = 0,6 a 0,8 mg/L). Na análise de fluoreto, em que existe um valor mínimo requerido (0,6 mg/L) e um valor máximo aceitável (0,8 mg/L) para a concentração, a planilha calcula a concentração crítica em ambos os limites com uma probabilidade de erro tipo I igual a 0,05. Desta forma, as planilhas eletrônicas permitem efetuar a rápida decisão entre conforme e não conforme na interpretação dos resultados.

Palavras-chave. limite de decisão, capacidade de detecção, curvas analíticas, análise de água, planilha eletrônica, interpretação de resultados.

ABSTRACT

In this paper the electronic spreadsheets built in *Microsoft Excel*[®] software are presented, and these parameters enable to estimate the decision limit ($CC\alpha$) and the detection capability ($CC\beta$) at the detection limit and of the maximum permitted value (MVP) regions. The estimates are evaluated from linear and homoscedastic analytical curves obtained in calibration procedures based on ISO standards and IUPAC guidelines. After validating by means of manual data processing, the electronic spreadsheets were used for determining the nitrite in bottled waters (MVP = 0.02 mg/L) and the fluoride contents in public supply waters (compliance interval = 0.6 to 0.8 mg/L). For fluoride analysis there are the minimum required value (0.6 mg/L) and the maximum acceptable value (0.8 mg/L) for its concentration; therefore, the spreadsheet computes the critical concentration at both limits with a probability of a type I error equal to 0.05. On that account, the electronic spreadsheets provide the rapid decision between compliant and non-compliant data in the interpretation of results.

Keywords. decision limit, capability of detection, analytical curves, water analysis, electronic spreadsheet, interpretation of results.

INTRODUÇÃO

Os teores de substâncias relacionados aos conceitos “limite de decisão” e “capacidade de detecção” estão entre as mais importantes figuras de mérito a serem avaliadas em um processo de validação de métodos usados para a quantificação dos mais diversos analitos (nutrientes e contaminantes, por exemplo) nas mais diversas matrizes (águas, alimentos, fluidos biológicos, etc.), sendo de particular importância quando o método é utilizado na área de pesquisa, saúde, comércio internacional e segurança¹. Os dois conceitos estão intimamente relacionados, embora em algumas normas e recomendações esta relação não esteja expressa com nitidez, seja pelo uso de terminologias diferentes, seja pela simples omissão do termo “limite de decisão” ou, ainda, pelas diferentes abordagens conceituais – por exemplo, a Comissão das Comunidades Europeias (CCE) utiliza distribuições normais nas estimativas do limite de decisão (designado como $CC\alpha$ e referindo-se a um limite cujo valor, sendo igual ou acima, implica na probabilidade α de um erro tipo I) e da capacidade de detecção (designado como $CC\beta$ e referindo-se a uma quantidade mínima da substância que pode ser detectada, identificada e/ou quantificada em uma amostra com uma probabilidade β de um erro tipo II)², enquanto a International Organization for Standardization (ISO) emprega distribuições t Student para estimativas similares, designadas como x_c (valor crítico da variável de estado que, se excedido, conduz à decisão de que o sistema observado não está em seu estado básico com uma probabilidade α de um erro tipo I) e x_D (valor mínimo detectável da variável de estado, um valor que conduz à conclusão de que o sistema observado não está em seu estado básico com probabilidade $1 - \beta$, em que β é a probabilidade de um erro tipo II)³; o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia), por sua vez, define apenas o menor valor de concentração do analito ou da propriedade que pode ser detectado pelo método, designando-o como limite de detecção (LD) e utilizando distribuições t sem, contudo, especificar a probabilidade β de um erro tipo II⁴. Assim, como já bem apontado por Thompson et al⁵, estas diferenças podem conduzir a alguma confusão quando o analista enfrenta a tarefa de validar um método analítico, particularmente no quesito “capacidade de detecção”, a despeito da aparente simplicidade embutida na ideia de se estabelecer a menor quantidade ou concentração do

analito que possa ser distinguida do valor “zero” com um determinado grau de confiança.

Em adição, existem normas que utilizam o termo “capacidade de detecção” para outras situações além da considerada na região dos sinais analíticos do branco (matriz sem o analito) ou região do limite de detecção – são as situações que envolvem um limite de concentração (a concentração máxima permitida do analito na amostra) ou valor máximo permitido (VMP); tal abordagem pode ser encontrada em normas como a que citamos para a CCE² ou em documentos como o “Guia para validação de métodos analíticos e controle de qualidade interna das análises de monitoramento do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes – PNCRC-Animal” do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento⁶. A capacidade de detecção, neste caso, seria a referência a ser utilizada para se concluir se um dado VMP foi ultrapassado ou não, com um nível de significância estabelecido, tanto para a probabilidade α de um erro tipo I, como para a probabilidade β de um erro tipo II, à semelhança do que é feito quando se realizam estimativas na região do limite de detecção.

Discorrer sobre este assunto e discutir as várias normas, e os argumentos estatísticos nelas empregados, estão fora do escopo deste trabalho. Aqui, demonstra-se que estes dois importantes conceitos podem ser estimados em análises de rotina (após a validação do método) a partir de parâmetros da curva analítica empregada, não somente na região do limite de detecção e na região do VMP, mas também naqueles casos em que existe uma faixa aceitável de concentrações compreendida entre um valor mínimo requerido e um valor máximo aceitável. As estimativas são realizadas através do uso de planilha eletrônica, construída em software acessível (Excel®), cujos cálculos são baseados em normas ISO e recomendações IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry), que permite também a avaliação rotineira da qualidade das curvas analíticas. Em um primeiro exemplo, descreve-se a determinação de nitrito em águas envasadas (VMP = 0,02 mg/L)⁷. Em um segundo exemplo, a aplicação dos dois conceitos é realizada na situação em que existe uma faixa de aceitação de concentrações (faixa de conformidade): é o caso do fluoreto em águas de abastecimento público, cuja concentração, segundo a legislação vigente no Estado de São Paulo, deve estar na faixa entre 0,6 a 0,8 mg/L, considerando-se 0,7 mg/L como o teor ideal⁸. Desta forma, o analista tem à sua disposição uma ferramenta

estatística de fácil utilização que permite a rápida decisão entre “conforme” e “não conforme” para a interpretação dos resultados obtidos para as amostras.

MATERIAL E MÉTODOS

CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

Materiais e reagentes – A água usada nas preparações foi previamente destilada e desionizada. Reagentes utilizados (grau analítico): nitrito de sódio, ácido fosfórico, sulfanilamida, di-hidroclorato de N-1-naftiletilenodiamina, oxalato de sódio anidro, ácido sulfúrico, permanganato de potássio, fluoreto de sódio anidro, hidróxido de sódio, ácido clorídrico, citrato de sódio di-hidratado, cloreto de sódio e ácido 1,2-ciclohexileno-dinitrilo-tetracético mono-hidratado (CDTA). As medidas de absorvância na análise de nitrito foram realizadas em espectrofotômetro, marca Hach, modelo 4000U, usando-se cubetas de quartzo com caminho ótico igual a 1 cm. Nas análises de fluoreto utilizou-se um eletrodo íon-seletivo, marca Digimed, modelo DMI-FL2, acoplado a um potenciômetro marca Orion modelo 370.

Procedimentos – Os dois métodos analíticos utilizados neste trabalho como exemplos estão descritos detalhadamente em literatura pertinente^{9,10}. Resumidamente: (i) A análise de nitrito foi realizada por espectrofotometria Visível (medida de absorvância em 543 nm), após desenvolvimento de cor com sulfanilamida e N-1-naftil-etilenodiamina (reagente de cor), com o uso de 5 soluções-padrão para a construção da curva analítica, de concentrações 0,000 a 0,040 mg/L em nitrito. Em uma análise típica, a 50 mL da amostra são adicionados 2 mL do reagente de cor; após 30 a 45 minutos da homogeneização, segue-se a leitura da absorvância. (ii) Fluoreto foi determinado por Potenciometria com eletrodo íon seletivo, utilizando 5 soluções-padrão para a construção da curva analítica, de concentrações 0,30 a 1,50 mg/L em fluoreto, e tampão TISAB III (tampão contendo citrato de sódio di-hidratado, cloreto de sódio e CDTA, em pH = 6,0 \pm 0,2). Em uma análise típica, a 50 mL da amostra são adicionados 5 mL de solução tampão, seguindo-se medida do potencial da solução mantida sob agitação. Esses dois métodos são rotineiramente utilizados nas análises de águas no Laboratório do Instituto Adolfo Lutz, Centro de Laboratórios, Regional de Ribeirão Preto: no caso do fluoreto, as amostras de águas são coletadas pelas Vigilâncias Municipais e enviadas sob refrigeração

ao Laboratório através do Programa de Vigilância da Água para Consumo Humano do Estado de São Paulo (Proágua); no caso do nitrito, as amostras de águas envasadas são principalmente provenientes de ações da Vigilância Sanitária e de requisições particulares. Os dois métodos foram previamente validados, apresentando, como principais figuras de mérito investigadas:

- Faixa linear: nitrito, 0,0 a 1,0 mg/L; fluoreto, 0,2 a 10,0 mg/L.
- Faixa de trabalho: nitrito, 0,000 a 0,040 mg/L; fluoreto, 0,3 a 1,5 mg/L.
- Limite de detecção: nitrito, 0,0035 mg/L; fluoreto, 0,025 mg/L.
- Limite de quantificação: nitrito, 0,007 mg/L; fluoreto, 0,20 mg/L.
- Precisão (expresso como coeficiente de variação no limite de quantificação): nitrito, menor ou igual a 10 %; fluoreto, menor ou igual a 10%.
- Exatidão (expresso como recuperação): nitrito, entre 95 e 110 % para 0,020 mg/L; fluoreto, entre 95 e 105 % para 1 mg/L.

CONSTRUÇÃO DAS PLANILHAS ELETRÔNICAS

As planilhas foram construídas em software *Microsoft Excel2010*[®] (cálculos estatísticos adicionais, não incluídos nas planilhas desenvolvidas como, por exemplo, cálculos para testar se dados poderiam ser considerados oriundos de uma distribuição normal, foram realizadas no software *OriginPro 9.0*[®]).

Inicialmente ressaltamos que os cálculos efetuados pelas planilhas (descritos a seguir) foram validados através da comparação dos resultados gerados pelas planilhas com aqueles resultantes do processamento manual dos dados. As equações são baseadas nas normas ISO 11095¹¹, ISO 11843-2³ e ISO 8466-1¹², e em recomendações IUPAC¹³.

As determinações de nitrito e fluoreto apresentam curvas analíticas lineares e homoscedásticas, características previamente constatadas durante as respectivas validações. Tal fato permitiu a adaptação de planilhas construídas em estudo anterior¹⁴, nas quais a inserção das medidas experimentais apresentava como resultados: gráfico de calibração com intervalo de predição (curva com limites superior e inferior, 95 % de confiança) e gráfico de resíduos, desvio padrão residual, desvio padrão para coeficiente angular, desvio padrão para intercepto, coeficiente de determinação, valor crítico da absorvância, valor crítico da concentração, valor mínimo

detectável da concentração ou limite de detecção, limite de quantificação e os intervalos de confiança para amostras. As equações inseridas nas planilhas para a construção dos gráficos e para a estimativa destes parâmetros já foram discutidas anteriormente¹⁴ e estão indicadas no Quadro 1. As principais modificações adotadas nas adaptações foram (i) a escolha criteriosa das concentrações das soluções-padrão de modo a promover a maior precisão em torno do VMP (no caso do nitrito) ou no centro da faixa de conformidade (no caso do fluoreto), (ii) uso de logaritmos das concentrações na construção da curva analítica da determinação do fluoreto, em substituição aos valores de concentrações em mg/L, e (iii) a inserção de equações que permitissem as estimativas do limite de decisão e da capacidade de detecção em relação ao VMP do nitrito, ou dos valores críticos (similares aos calculados pelas equações 13 e 14 do Quadro 1) em relação aos extremos da faixa de conformidade do fluoreto (o valor mínimo requerido e o valor máximo aceitável). Estas modificações são discutidas a seguir.

Quanto às concentrações das soluções-padrão,

no caso do nitrito a escolha foi feita de maneira a promover a máxima precisão na região do VMP. Assim, para a sua determinação em águas envasadas (VMP = 0,02 mg/L)⁷, cuja curva analítica é linear e homoscedástica, a maior precisão encontra-se na região central da curva. As concentrações das soluções-padrão escolhidas foram 0,00 (branco); 0,01; 0,02; 0,03; e 0,04 mg/L, de modo a promover o valor médio 0,02 mg/L (o centro da curva) – esta série de soluções-padrão está de acordo com o recomendado no Guia PNCRC-Animal⁶, já citado anteriormente, que estabelece que a curva analítica deve ser obtida a partir de 5 níveis de concentração, equidistantemente distribuídos em torno do limite máximo de resíduo, LMR (0,0 – 0,5 – 1,0 – 1,5 – 2,0 vezes o LMR). No caso da determinação de fluoreto em águas de abastecimento público, a curva analítica é construída colocando-se as medidas de potencial em função do logaritmo da concentração – portanto, as concentrações deveriam ser escolhidas de modo que a média dos logaritmos correspondesse ao valor ideal estabelecido pela legislação vigente (0,7 mg/L)⁸ e a série

Quadro 1. Equações previamente inseridas nas planilhas¹⁴

$$\hat{y} = \hat{a} + \hat{b}x \quad (1) \quad \hat{b} = \frac{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J (x_i - \bar{x})(\bar{y}_{ij} - \bar{y})}{J \cdot \sum_{i=1}^I (x_i - \bar{x})^2} \quad (2) \quad \hat{a} = \bar{y} - \hat{b}\bar{x} \quad (3) \quad \bar{y}_{ij} = \frac{\sum_{l=1}^L y_{ijl}}{L} \quad (4) \quad \bar{y} = \frac{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J \sum_{l=1}^L y_{ijl}}{I \cdot J \cdot L} \quad (5) \quad \bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^I x_i}{I} \quad (6)$$

$$\hat{\sigma} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J (\bar{y}_{ij} - \hat{a} - \hat{b}x_i)^2}{(I \cdot J) - 2}} \quad (7) \quad s_b = \frac{\hat{\sigma}}{\sqrt{J \cdot \sum_{i=1}^I (x_i - \bar{x})^2}} \quad (8) \quad s_{\hat{a}} = \hat{\sigma} \cdot \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^I x_i^2}{I \cdot J \cdot \sum_{i=1}^I (x_i - \bar{x})^2}} \quad (9) \quad R^2 = \frac{SSR}{SST} = \frac{\sum_{i=1}^I (\hat{y}_i - \bar{y})^2}{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J (\bar{y}_{ij} - \bar{y})^2} \quad (10)$$

$$pred_{(\hat{y})} = \hat{y} \pm t_{1-\frac{\alpha}{2}(v)} \cdot \hat{\sigma} \sqrt{\frac{1}{K} + \frac{1}{I \cdot J} + \frac{(x_i - \bar{x})^2}{J \sum_{i=1}^I (x_i - \bar{x})^2}} \quad (11) \quad pred_{(\hat{x}_i)} = \hat{x}_i \pm t_{1-\frac{\alpha}{2}(v)} \cdot \frac{\hat{\sigma}}{\hat{b}} \sqrt{\frac{1}{K} + \frac{1}{I \cdot J} + \frac{(\hat{y}_i - \bar{y})^2}{\hat{b}^2 \cdot J \sum_{i=1}^I (x_i - \bar{x})^2}} \quad (12)$$

$$y_c = \hat{a} + t_{1-\alpha(v)} \cdot \hat{\sigma} \sqrt{\frac{1}{K} + \frac{1}{I \cdot J} + \frac{\bar{x}^2}{J \sum_{i=1}^I (x_i - \bar{x})^2}} \quad (13) \quad x_c = t_{1-\alpha(v)} \cdot \frac{\hat{\sigma}}{\hat{b}} \sqrt{\frac{1}{K} + \frac{1}{I \cdot J} + \frac{\bar{x}^2}{J \sum_{i=1}^I (x_i - \bar{x})^2}} \quad (14) \quad x_D = \delta \cdot \frac{\hat{\sigma}}{\hat{b}} \sqrt{\frac{1}{K} + \frac{1}{I \cdot J} + \frac{\bar{x}^2}{J \sum_{i=1}^I (x_i - \bar{x})^2}} \quad (15)$$

$$\delta_{(v;\alpha;\beta)} \approx 2 \cdot t_{1-\alpha(v)} \quad (16) \quad x_D \approx 2 \cdot t_{1-\alpha(v)} \cdot \frac{\hat{\sigma}}{\hat{b}} \sqrt{\frac{1}{K} + \frac{1}{I \cdot J} + \frac{\bar{x}^2}{J \sum_{i=1}^I (x_i - \bar{x})^2}} = 2 \cdot x_c \quad (17) \quad L_Q = 2 \cdot x_D \quad (18)$$

$$s_{(L_Q)} = \frac{\hat{\sigma}}{\hat{b}} \sqrt{\frac{1}{K} + \frac{1}{I \cdot J} + \frac{(y_{L_Q} - \bar{y})^2}{\hat{b}^2 \cdot J \sum_{i=1}^I (x_i - \bar{x})^2}} \quad (19) \quad L_Q = 2 \cdot x_D \approx 4 \cdot x_c \quad (20) \quad y_{L_Q} = \hat{a} + \hat{b}x_{L_Q} \approx \hat{a} + \hat{b} \cdot 4 \cdot x_c \quad (21) \quad CV_{(L_Q)\%} = \frac{s_{(L_Q)}}{L_Q} \cdot 100 \quad (22)$$

Onde I = n° de soluções-padrão; J = n° de replicatas de soluções-padrão; L = n° de medidas em cada solução-padrão; K = n° de replicatas para amostras.

de concentrações correspondente seria 0,175; 0,35; 0,70; 1,40; 2,80 mg/L. Contudo, a primeira solução-padrão (0,175 mg/L) apresenta sinal de potencial na região não-linear da curva analítica, conforme observado na validação do método – a região linear ocorre acima de 0,20 mg/L. Assim, na prática, a melhor combinação de soluções-padrão encontrada foi 0,30; 0,50; 0,80; 1,00; 1,50 mg/L, que conduz a uma média dos logaritmos que corresponde à concentração de 0,71 mg/L.

Quanto ao uso de logaritmos das concentrações na construção da curva analítica da determinação do fluoreto: tal procedimento é devido ao comportamento da resposta do eletrodo frente às mudanças nas concentrações das soluções as quais é exposto – de acordo com a Equação de Nernst, a resposta depende linearmente com o logaritmo da concentração, em uma função com coeficiente angular (“slope”) negativo, ou seja, a função de calibração é decrescente, com os valores de potencial diminuindo à medida que a concentração de fluoreto aumenta. O valor teórico deste “slope” para um processo monoeletrônico é -0,059 V (ou -59 mV), quando o logaritmo empregado é o de base 10 e a temperatura é mantida em 25 °C. Desta forma, para uma curva analítica construída em termos de potencial *versus* logaritmo da concentração, os resultados e os respectivos intervalos de predição (equação 12, Quadro 1) serão expressos em termos de logaritmos – não obstante, a planilha converte tanto o resultado da amostra, como os extremos do intervalo de predição, para a unidade mg/L, conforme mostrado na Figura 1.

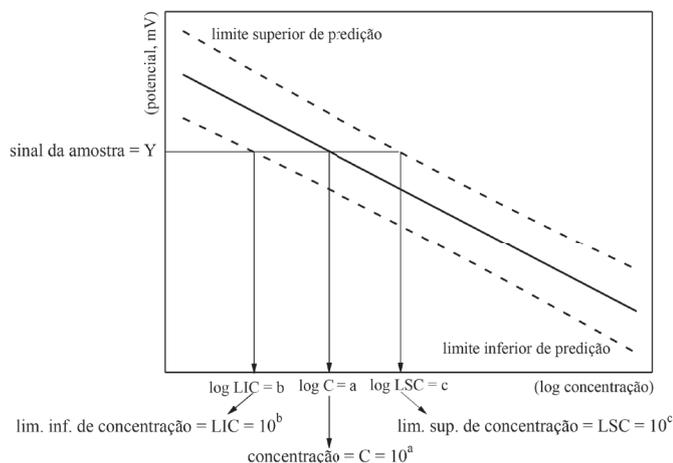


Figura 1. Visualização gráfica da conversão dos dados obtidos na forma logarítmica a partir da curva analítica, para a concentração usual (mg/L) na determinação de fluoreto

No que diz respeito à inserção de equações que permitissem as estimativas do limite de decisão e da capacidade de detecção em relação ao VMP do nitrito em águas envasadas, a estratégia utilizada é basicamente a mesma quando das respectivas estimativas na região do limite de detecção (equações 13 a 17 do Quadro 1), iniciando-se com um teste de hipóteses unilateral, formulado aqui como:

$$H_0: \mu = \text{VMP}$$

$$H_a: \mu > \text{VMP}$$

O limite de decisão e a capacidade de detecção foram simbolizados conforme a CCE e o Guia do PNCRC-Animal, tomando-se o cuidado de se acrescentar um expoente “t”, de modo a diferenciar este trabalho (que utiliza distribuições t Student), e um índice “VMP”, para indicar a região em que as estimativas são realizadas. Assim, temos:

$$\text{Limite de decisão na região do VMP} = CC\alpha_{\text{VMP}}^t$$

$$\text{Capacidade de detecção na região do VMP} = CC\beta_{\text{VMP}}^t$$

A Figura 2A ilustra, no domínio dos sinais (no caso do nitrito, absorbância), a estratégia utilizada: sendo \hat{y}_{VMP} o valor estimado pela equação de regressão (equação 1 do Quadro 1) para o VMP = 0,02 mg/L, os sinais em $CC\alpha_{\text{VMP}}^t$ ($\hat{y}_{CC\alpha_{\text{VMP}}^t}$) e $CC\beta_{\text{VMP}}^t$ ($\hat{y}_{CC\beta_{\text{VMP}}^t}$) podem ser calculados pelas equações 23 e 24, respectivamente ($\alpha = \beta = 0,05$).

$$\hat{y}_{CC\alpha_{\text{VMP}}^t} = \hat{y}_{\text{VMP}} + t_{1-\alpha(v)} \cdot \hat{\sigma} \sqrt{\frac{1}{K} + \frac{1}{I \cdot J} + \frac{\bar{x}^2}{J \sum_{i=1}^I (x_i - \bar{x})^2}} \quad (23)$$

$$\hat{y}_{CC\beta_{\text{VMP}}^t} = \hat{y}_{\text{VMP}} + 2 \cdot t_{1-\alpha(v)} \cdot \hat{\sigma} \sqrt{\frac{1}{K} + \frac{1}{I \cdot J} + \frac{\bar{x}^2}{J \sum_{i=1}^I (x_i - \bar{x})^2}} \quad (24)$$

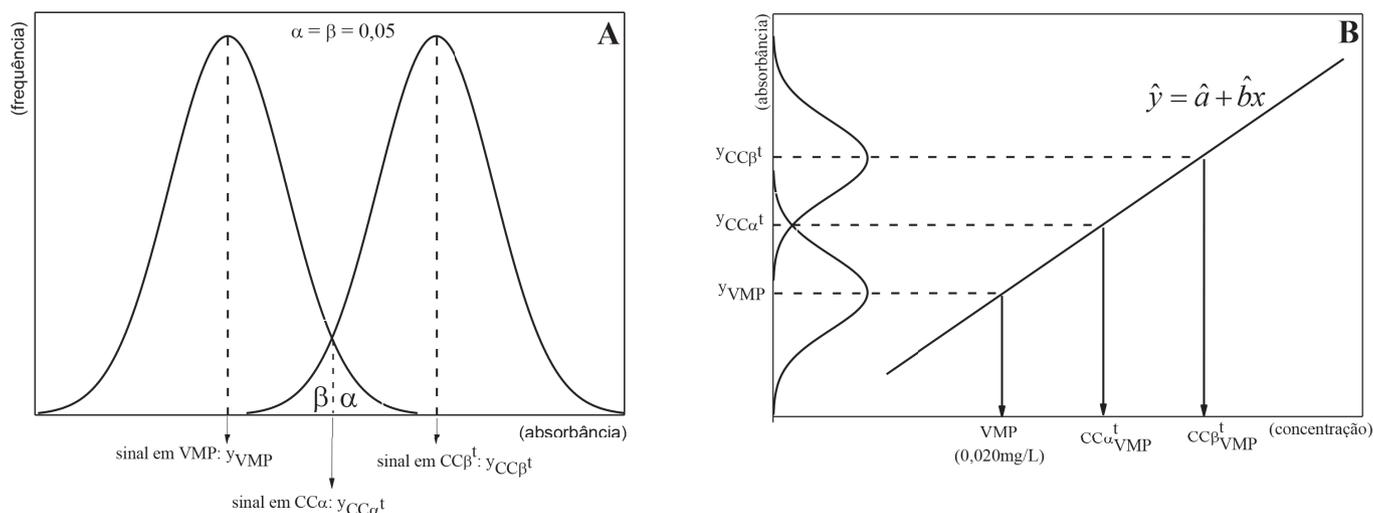


Figura 2. Visualização gráfica: (A) das distribuições amostrais dos sinais de absorbância para o VMP do nitrito (0,020 mg/L) e para a amostra que apresenta uma concentração maior que o VMP, onde α é a probabilidade de um erro tipo I e β é a probabilidade de um erro tipo II; (B) das determinações das respectivas concentrações a partir da reta de regressão da curva analítica

As concentrações $CC\alpha^t_{VMP}$ e $CC\beta^t_{VMP}$ ou seja, o limite de decisão e a capacidade de detecção correspondentes aos sinais $\hat{y}_{CC\alpha^t_{VMP}}$ e $\hat{y}_{CC\beta^t_{VMP}}$ são calculadas a partir da curva analítica (Figura 2B), através das equações 25 e 26.

$$CC\alpha^t_{VMP} = \frac{(\hat{y}_{CC\alpha^t_{VMP}} - \hat{a})}{\hat{b}} \quad (25)$$

$$CC\beta^t_{VMP} = \frac{(\hat{y}_{CC\beta^t_{VMP}} - \hat{a})}{\hat{b}} \quad (26)$$

No caso do fluoreto inicialmente considerou-se a faixa de 0,6 a 0,8 mg/L como um intervalo de conformidade com relação ao valor ideal central de 0,7 mg/L. Para a determinação dos valores críticos (y_c e x_c) em relação ao valor mínimo requerido (0,6 mg/L) e ao valor máximo aceitável (0,8 mg/L), consideraram-se distribuições normais para os sinais analíticos (potenciais em mV) destas concentrações limites. Assim, inicialmente dois testes de hipóteses podem ser formulados, um para cada situação:

para $y_{C\ 0,6\ mg/L}$

- $H_0: \mu = \text{potencial em } 0,6\ \text{mg/L}$
- $H_a: \mu > \text{potencial em } 0,6\ \text{mg/L}$

para $y_{C\ 0,8\ mg/L}$

- $H_0: \mu = \text{potencial em } 0,8\ \text{mg/L}$
- $H_a: \mu < \text{potencial em } 0,6\ \text{mg/L}$

Este raciocínio é ilustrado na Figura 3A onde pode ser observado que acima de um dado valor de potencial ($y_{C\ 0,6\ mg/L}$) a amostra será considerada não-conforme por não apresentar o teor mínimo requerido, e abaixo de um dado valor de potencial ($y_{C\ 0,8\ mg/L}$) a amostra será considerada não-conforme por apresentar excesso de fluoreto. Os cálculos de $y_{C\ 0,6\ mg/L}$ e $y_{C\ 0,8\ mg/L}$ são similares ao realizado pela equação 13 (Quadro 1), substituindo-se a estimativa do coeficiente linear \hat{a} pelas respectivas estimativas de \hat{y} em 0,6 e 0,8 mg/L, e estão indicados nas equações 27 e 28. Nas duas situações considerou-se $\alpha = 0,05$.

$$y_{c(0,6\ mg/L)} = \hat{y}_{(0,6\ mg/L)} + t_{1-\alpha(v)} \cdot \hat{\sigma} \sqrt{\frac{1}{K} + \frac{1}{I \cdot J} + \frac{\bar{x}^2}{J \sum_{i=1}^I (x_i - \bar{x})^2}} \quad (27)$$

$$y_{c(0,8\ mg/L)} = \hat{y}_{(0,8\ mg/L)} - t_{1-\alpha(v)} \cdot \hat{\sigma} \sqrt{\frac{1}{K} + \frac{1}{I \cdot J} + \frac{\bar{x}^2}{J \sum_{i=1}^I (x_i - \bar{x})^2}} \quad (28)$$

Os cálculos das respectivas concentrações críticas ($x_{C\ 0,6\ mg/L}$ e $x_{C\ 0,8\ mg/L}$) são realizados a partir da equação de regressão, utilizando-se os potenciais críticos para 0,6 e 0,8 mg/L, seguido da conversão da escala logarítmica

$$x_{c(0,6\text{mg/L})} = 10^{\frac{y_{c(0,6\text{mg/L})} - \hat{a}}{\hat{b}}} \quad (29)$$

$$x_{c(0,8\text{mg/L})} = 10^{\frac{y_{c(0,8\text{mg/L})} - \hat{a}}{\hat{b}}} \quad (30)$$

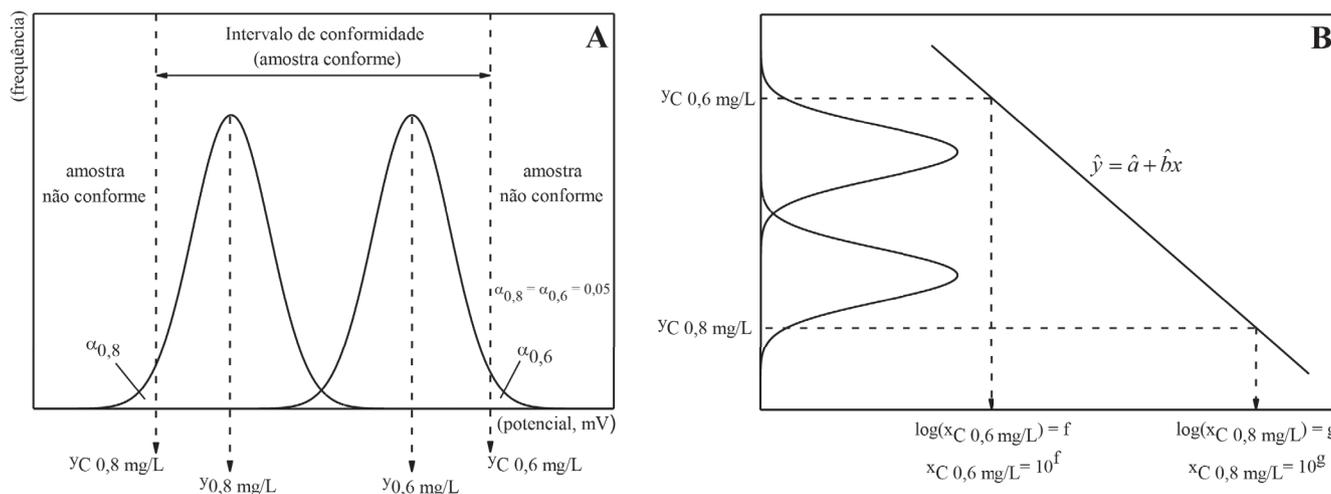


Figura 3. Visualização gráfica: (A) do modelo adotado neste trabalho para a faixa de conformidade do fluoreto; (B) das determinações dos valores críticos no domínio do logaritmo das concentrações e as posteriores conversões para concentrações usuais (mg/L)

para concentração em mg/L. O procedimento é ilustrado na Figura 3B, sendo realizado pelas equações 29 e 30.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O desenvolvimento, a validação e a aplicação geral das planilhas eletrônicas foram previamente descritas¹⁴. Assim, serão discutidos aqui os resultados obtidos com as modificações introduzidas.

No caso da determinação de nitrito em águas envasadas, a Figura 4A exibe a distribuição dos valores determinados para a capacidade de detecção na região do limite de detecção (CC β_{LD}^t), calculados pela equação 17 do Quadro 1 (CC $\beta_{LD}^t = x_D$), em 31 análises. Uma vez que diferentes calibrações (curvas analíticas) produzem diferentes valores de CC β_{LD}^t , a ISO 11843:2³ estabelece que, se m calibrações são realizadas em um dado processo de medida, os respectivos m valores mínimos detectáveis podem ser usados para se determinar um valor mínimo detectável do processo de medida, desde que observadas as seguintes condições: (i) o processo de medida não seja alterado; (ii) a distribuição dos m valores mínimos detectáveis seja unimodal, sem a ocorrência de “outliers”; e (iii)

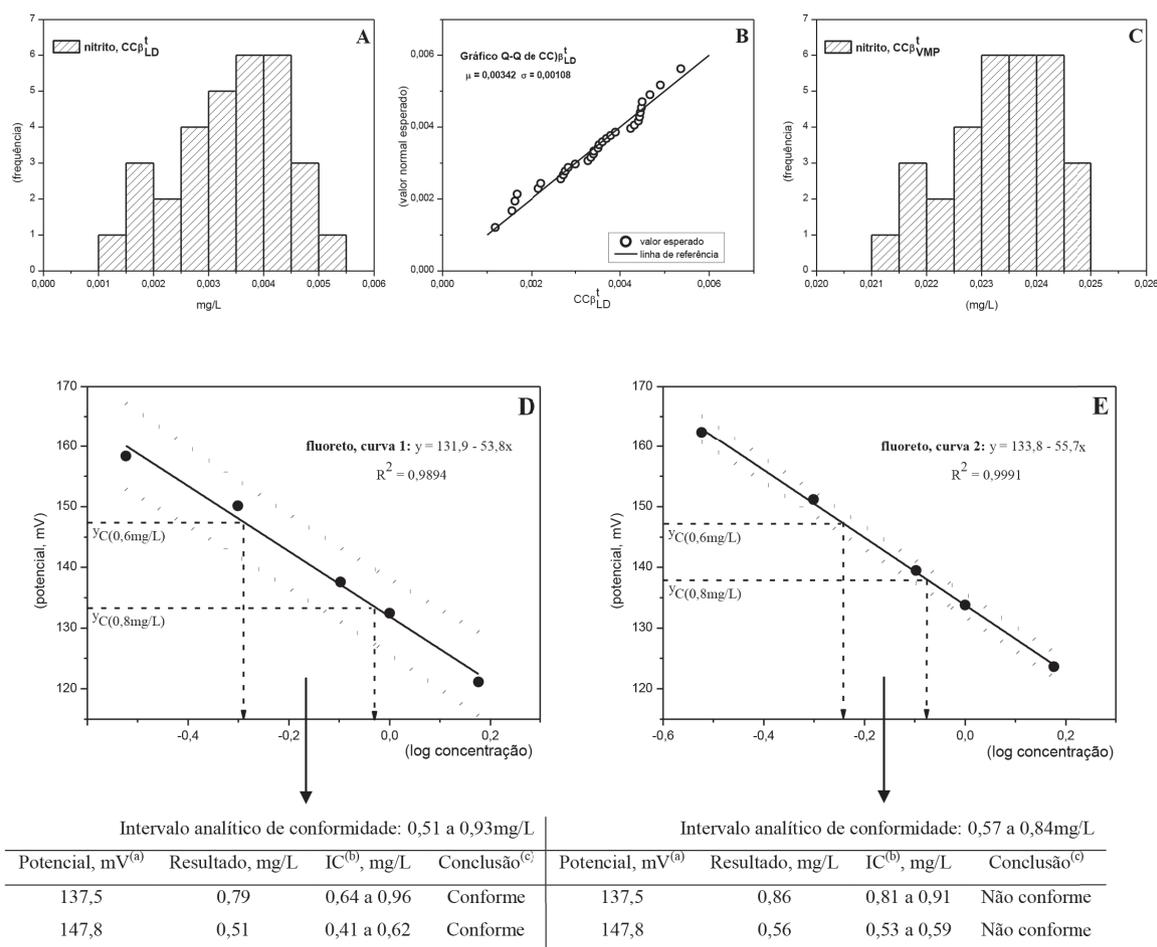
o planejamento experimental (valores de I , J , K e L) seja idêntico para cada uma das calibrações. Sob estas condições, recomenda-se que a mediana dos m valores mínimos detectáveis seja indicado como o valor mínimo detectável do processo de medida.

À primeira vista, a distribuição da Figura 4A sugere curva de densidade unimodal com uma pequena assimetria negativa. Contudo, o gráfico dos quantis normais (gráfico Q-Q, Figura 4B) indicou que a distribuição poderia ser considerada normal, e os vários testes estatísticos empregados indicaram que a hipótese de distribuição normal para os dados não poderia ser rejeitada a um nível de significância igual a 0,05: teste de Kolmogorov-Smirnov (estatística = 0,10334; $p = 0,96597$), teste de Lilliefors (estatística = 0,10334; $p = 0,2$), teste de Shapiro-Wilk (estatística = 0,96474; $p = 0,38698$), e teste de Anderson-Darling (estatística = 0,39377; $p = 0,35436$). Desta forma, visto que todas as condições expressas na ISO 11843:2 são obedecidas, pôde-se expressar o valor mínimo detectável do processo de medida como a mediana dos 31 valores de CC β_{LD}^t , ou seja, CC $\beta_{LD}^t(\text{mediana}) = 0,0035$ mg/L.

Uma vez que o cálculo da capacidade de detecção

na região do Valor Máximo Permitido ($CC\beta_{VMP}^t$) é similar ao cálculo de $CC\beta_{LD}^t$, alterando-se basicamente a estimativa \hat{y}_C que é feita a partir de \hat{y}_{VMP} ao invés de \hat{a} (vide equação 1 do Quadro 1, e equações 24 e 26 do texto), a distribuição dos valores determinados para $CC\beta_{VMP}^t$ (Figura 4C) é semelhante à anteriormente observada, sugerindo curva de densidade unimodal com pequena assimetria negativa. Também de forma semelhante ao caso anterior, a distribuição normal pôde ser considerada a partir do gráfico Q-Q e dos testes estatísticos (nível de significância = 0,05): teste de Kolmogorov-Smirnov (estatística = 0,10492; $p = 0,94559$), teste de Lilliefors (estatística = 0,10492; $p = 0,2$), teste de Shapiro-Wilk (estatística = 0,95018; $p = 0,15791$), e teste de Anderson-Darling (estatística = 0,47489; $p = 0,22397$). No entanto, de forma diferente ao realizado com os dados de $CC\beta_{LD}^t$,

os valores de $CC\beta_{VMP}^t$ não foram combinados de modo a se determinar um valor de referência, como a mediana, por exemplo – cada valor de $CC\beta_{VMP}^t$ pertence a uma curva analítica específica para uso como instrumento de decisão entre conforme e não conforme. Em outras palavras: neste trabalho, o cálculo de $CC\beta_{VMP}^t$ é uma ferramenta estatística para a tomada de decisão (conforme / não conforme) em uma análise específica, não aplicável, portanto, a um processo de medida. Não obstante, é possível associar valores mais altos de $CC\beta_{VMP}^t$ às curvas analíticas de menor precisão: à medida que os intervalos de predição se distanciam da curva de regressão, evidenciando curvas analíticas de menor precisão, os valores de $CC\beta_{VMP}^t$ se distanciam do VMP (igual a 0,020 mg/L, no caso do nitrito). Esta dependência entre precisão de curvas analíticas e valores de decisão é



(a) Simulação. (b) Intervalo de confiança 95%, amostras em duplicata. (c) Baseada na Resolução SS-250, de 15/08/1995.

Figura 4. Resultados: (A) distribuição de valores de $CC\beta_{LD}^t$ estimados em 31 análises de nitrito; (B) gráfico dos quantis normais para a distribuição da Figura 4A; (C) distribuição de valores de $CC\beta_{VMP}^t$ estimados em 31 análises de nitrito; (D) curva analítica de fluoreto com menor precisão (limites de predição em linha pontilhada); (E) curva analítica de fluoreto com maior precisão (limites de predição em linha pontilhada)

mais evidente no caso da determinação de fluoreto, que discutimos a seguir.

As Figuras 4D e 4E exibem duas curvas analíticas de precisões diferentes na determinação de fluoreto em águas de abastecimento público: enquanto os intervalos de predição em 4D estão bastante afastados da reta de regressão, os respectivos intervalos em 4E aproximam-se da reta de regressão a que se referem, indicando uma análise sendo conduzida com maior grau de precisão¹⁴. Como consequência, a capacidade de detectar amostras fora do intervalo de conformidade estabelecido pela legislação⁸ é menos precisa em 4D. De fato, podemos associar um “intervalo analítico de conformidade” à curva construída, ou seja, um intervalo em que o método sendo empregado naquela análise específica seria capaz de indicar se uma amostra está conforme ou não conforme, tendo em mente que os testes de hipóteses procuram essencialmente determinar, com um nível de significância igual a 0,05, abaixo de qual concentração a análise é capaz de rejeitar a hipótese nula ($H_0: \mu = 0,6$ mg/L) e aceitar a hipótese alternativa ($H_a: \mu < 0,6$ mg/L) no limite inferior, paralelamente à determinação da concentração acima da qual a hipótese nula é rejeitada ($H_0: \mu = 0,8$ mg/L) em favor da alternativa ($H_a: \mu > 0,8$ mg/L) no limite superior.

Como exemplos da dependência do “intervalo analítico de conformidade” com a precisão da curva analítica, podemos observar nas Figuras 4D e 4E o estreitamento do intervalo em função da maior precisão obtida na curva 2 (0,57 a 0,84 mg/L) em relação à curva 1 (0,51 a 0,93 mg/L), ambas obtidas em análises de rotina. Em uma simulação indicada na parte inferior das figuras, pode ser observado também que potenciais iguais relacionados às duas curvas podem conduzir a conclusões diferentes: as concentrações determinadas para cada um dos potenciais em cada uma das curvas não podem ser estatisticamente distinguidas (os intervalos de confiança 95% apresentam sobreposição), mas a precisão maior da curva 2 permite constatar (i) que o valor de $x_{C\ 0,6\ \text{mg/L}}$ (igual a 0,57 mg/L) não foi atingido no caso do potencial 147,8 mV, e (ii) que o valor de $x_{C\ 0,8\ \text{mg/L}}$ (igual a 0,84mg/L) foi superado no caso do potencial 137,5 mV. Em adição, pode-se constatar que os intervalos de confiança associados às concentrações calculadas para os potenciais não incluem os valores limites da legislação (0,60 e 0,80 mg/L).

CONCLUSÃO

Dando continuidade ao estudo iniciado em 2013¹⁴, este trabalho demonstrou que as planilhas eletrônicas, inicialmente desenvolvidas para aplicações gerais, podem ser adaptadas para situações específicas no intuito de contemplar as legislações pertinentes a cada analito em particular. Mostrou-se a aplicabilidade no caso do nitrito em águas envasadas; porém, esta planilha pode ser facilmente adaptada para situações como a delineada no Guia PNCRC-Animal⁶: para substâncias proibidas, a probabilidade de um erro tipo I deve ser alterada para 0,01, mantendo-se igual a 0,05 a probabilidade de um erro tipo 2 no cálculo de $CC\alpha_{LD}^t$ ($\hat{y}_{CC\alpha_{LD}^t}$) e de $CC\beta_{LD}^t$ ($\hat{y}_{CC\beta_{LD}^t}$), respectivamente; para substâncias permitidas, os cálculos são similares aos mostrados aqui, ressaltando-se apenas que o Guia PNCRC-Animal utiliza distribuições normais e faz uso do Limite Máximo de Resíduo (LMR) nos cálculos dos respectivos $CC\alpha$ e $CC\beta$ (LMR é a concentração máxima admissível do resíduo em uma matriz cujo valor é estabelecido pela Coordenação de Controle de Resíduos e Contaminantes).

A planilha desenvolvida para o fluoreto, por sua vez, pode ser adaptada para situações similares, em que se apresenta um intervalo de conformidade ao qual se poderia associar um “intervalo analítico de conformidade”. Tal é o caso, por exemplo, dos produtos farmacêuticos que, em geral, devem conter de 90 a 110 % do princípio ativo declarado no rótulo¹⁵. Desta forma, planilhas podem ser adaptadas para substâncias cujas determinações façam uso de curvas analíticas como, por exemplo, dipirona, acetilcisteína, captopril, paracetamol e sinvastatina^{16, 17}.

REFERÊNCIAS

1. Currie LA. Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities. *Pure Appl Chem*.1995;67(10):1699-1723.
2. Commission E. Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. *Off J Eur Comm*. 2002;L221:8-36.
3. International Organization for Standardization - ISO. Capability of detection. 1997:ISO 11843-1,2.
4. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia - INMETRO. DOQ-CGCRE-8: Orientação sobre validação de métodos analíticos - Revisão 04. 2011; 19 p. Disponível em: [http://www.inmetro.gov.br/sidoq/arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8_04.pdf].

5. Thompson M, Ellison S, Wood R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. *Pure Appl Chem*.2002;74(5):835-55.
6. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 24, de 14 de julho de 2009. Define os requisitos e critérios específicos para funcionamento dos Laboratórios de Análises de Resíduos e Contaminantes em Alimentos Integrantes da Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, 22 jul. 2009. Seção 1, p. 7-15.
7. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 274, de 22 de setembro de 2005. Aprova o "Regulamento técnico para águas envasadas e gelo". *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, 23 set. 2005. Seção 1, p. 376-377.
8. Secretaria de Estado da Saúde - SES/SP. Resolução SS-250, de 15 de agosto de 1995. Define teores de concentração do íon fluoreto nas águas para consumo humano, fornecidas por sistemas públicos de abastecimento. *Diário Oficial do Estado*. São Paulo, SP, 16 ago. 1995. Poder Executivo, Seção 1, p.11.
9. American Public Health Association - APHA, American Water Works Association - AWWA, Water Environment Federation - WEF. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 19th ed. Eaton Ad, Clesceri Ls, Greenberg Ae, editors. Washington DC: American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation; 1995.
10. Instituto Adolfo Lutz (São Paulo - Brasil). *Métodos físico-químicos para análise de alimentos: normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz*. 4a. ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária; 2005. 1018 p p.
11. International Organization for Standardization - ISO. *Linear calibration using reference materials*. International Organization for Standardization. 1996:ISO 11095.
12. International Organization for Standardization - ISO. *Water quality - Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics*. International Organization for Standardization. 1990:ISO 8466-1.
13. Danzer K, Currie LA. *Guidelines for calibration in analytical chemistry. Part 1. Fundamentals and single component calibration*. *Pure Appl Chem*.1998;70(4):993-1014.
14. Dovidauskas S, Okada IA, Sakuma AM, Duran MC, Oliveira CC. Emprego de planilhas eletrônicas, baseado nas normas ISO e recomendações IUPAC, em curvas analíticas da análise de água. *Rev Inst Adolfo Lutz*.2013;72(1):13-24.
15. Brasil. Ministério da Saúde. *Formulário Nacional da Farmacopéia Brasileira*. Revisão 02. 2a. ed. Brasília: ANVISA; 2012. 224 p.
16. Polonini HC, Santos FC, Vaz UP, Brandão MAF, Raposo NRB, Ferreira AO. Desenvolvimento e validação de método analítico para determinação do teor de sinvastatina em cápsulas magistrais. *Quím Nova*.2011;34(3):516-9.
17. Schmidt Jr E, Melchert WR, Rocha FRP. Sistemas de análise em fluxo polivalente para a determinação espectrofotométrica de fármacos. *Quím Nova*.2011;34(7):1205-10.

Mercury and Methylmercury in the children hair and fish mostly consumed in Cubatão, São Paulo State, Brazil

Mercúrio e Metilmercúrio em cabelos de crianças e em peixes mais consumidos em Cubatão, estado de São Paulo, Brasil

RIALA6/1601

Luciana Aparecida FARIAS¹, Deborah Inês Teixeira FÁVARO^{2*}, Paulo Tadeu Meira Silva OLIVEIRA², Elisabete de Santis BRAGA³

*Correspondence address: ²Laboratório de Análise por Ativação Neutrônica, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP. Av. Professor Lineu Prestes 2242, CEP: 05508-000, São Paulo, SP, Brazil. Phone: 55 11 31339977, FAX: 55 11 31339960, e-mail: defavaro@ipen.br

¹Departamento de Ciências Exatas e da Terra, Universidade Federal de São Paulo, UNIFESP

³Laboratório de Nutrientes, micronutrientes e traços nos oceanos - LABNUT, Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo
Research sponsored by Brazilian Research Agencies FAPESP (process n. 2005/50769-2 and 2009/18233-6) and CNPq, (process n.304883/2006 -9)

Recebido: 21.03.2014 - Aceito para publicação: 30.06.2014

ABSTRACT

This study evaluated Hg and MeHg concentrations in fish muscle and children hair from Cubatão, using as strategies: i) Hg and MeHg determinations in the mostly consumed fish species, ii) Hg and MeHg determinations in 93 children hair samples (from 04 to 14 years old), and iii) analysis on the children diet consumption questionnaire answered by the respective parents. The results obtained in a similar study in Cananéia were used as references. These two regions show different environmental anthropogenic impacts and distinct eating habits. The quantity and the frequency of fish consumption were the most important factors of Hg bioaccumulation in children hair. In both cities, 95 % of mercury contents in hair were $>1 \text{ mg.kg}^{-1}$ (US EPA reference) in analyzed children, and MeHg were between 67 and 83 % of total Hg. The median for total Hg concentration in fish muscle (wet basis) ranged from 10 to $179 \mu\text{g.kg}^{-1}$ for Cananéia and 10 to $181 \mu\text{g.kg}^{-1}$ for Cubatão, values lower than the Brazilian limits for Hg in fish. Considering the Hg contents detected in the mostly consumed fish and hair, they indicate that the children are not at risk for Hg and MeHg contamination.

Keywords. mercury, methylmercury, children, hair, fish, food habit.

RESUMO

Este estudo avaliou a concentração de Hg e MeHg em amostras de peixes e de cabelos de crianças de Cubatão, usando-se como estratégia: i) Hg total e MeHg em peixes mais consumidos; ii) Hg total e MeHg em cabelos de 93 crianças (04 a 14 anos); iii) análise do inquérito alimentar respondido pelos pais. Os dados obtidos em estudo similar realizado em Cananéia foram usados como referência. Essas duas regiões estuarinas, sob diferentes graus de impacto ambiental, apresentam diferentes hábitos alimentares. A quantidade e a frequência de consumo de peixes foram os fatores mais importantes na bioacumulação de Hg nos cabelos. Em ambas as cidades, 95 % das concentrações de Hg total nos cabelos foram abaixo de 1 mg.kg^{-1} (limite US EPA) e o percentual de MeHg ocorreu entre 67 e 83 % em relação ao teor de Hg total. As medianas para Hg total nos músculos (base úmida) variaram de 10 a $179 \mu\text{g.kg}^{-1}$ para peixes de Cananéia e 10 a $181 \mu\text{g.kg}^{-1}$ de Cubatão, inferiores ao limite da legislação brasileira para Hg. A partir dos teores para Hg total e MeHg em peixes mais consumidos e cabelos, as crianças parecem não estar em risco de contaminação.

Palavras-chave. mercúrio, metilmercúrio, cabelo, crianças, peixe, hábito alimentar.

INTRODUCTION

Recent studies of European and Asian fish consumers revealed significant associations between high fish consumption and high mercury (Hg) and methylmercury (MeHg) levels^{1,2}. Fish consumption is considered the primary pathway for human accumulation of Hg and MeHg. This, in turn, results in statistically significant differences between high and low fish consumer groups³. In spite of the possible negative effects upon human health, fish consumption remains a very important protein source in the human diet. Fish is also a primary source of nutrients for child development. Many articles^{4,5} and a review⁶ discussing the risk-benefit considerations of fish consumption have been published in recent years. In the Mozaffarian and Rimm⁴ study, the conclusion presented was that for major health outcomes among adults, based on both the strength of the evidence and the potential magnitudes of the effects, the benefits of fish intake outweigh the potential risks. According to Mahaffey et al study⁵, essential polyunsaturated fatty acids, such as docosahexaenoic acid (DHA), confer benefits to brain and visual system development in infants and reduce risks of certain forms of heart disease in adults which mitigate against CH₃Hg effects. For women of childbearing age, benefits of modest fish intake, with the exception of a few selected species also outweigh risks. Myers et al⁷ presented a review about nutrient and MeHg exposure from consuming fish giving emphasis to the findings from a large prospective cohort study of a population that consumes fish daily, the Seychelles Child Development Study. Preliminary findings from this study suggest that the beneficial influence of nutrients from fish may counter any adverse effects of MeHg on the development nervous system. Facing this dilemma of risk and benefit of fish consumption FAO and WHO held an Expert Consultation Workshop in 2011⁸. Some conclusions from this workshop were: consumption of fish provides energy, protein and a range of essential nutrients; eating fish is part of the cultural traditions of many peoples and in some populations, fish is a major source of food and essential nutrients; and among infants, young children and adolescents, evidence is insufficient to derive a quantitative framework of health risks and benefits. However, healthy dietary patterns that include fish consumption and are established early in life influence dietary habits and health during adult life. Some recommendations were also described such

as develop, maintain and improve existing databases on specific nutrients and contaminants, particularly methylmercury and dioxins, in fish consumed in their region and develop and evaluate risk management and communication strategies that both minimize risks and maximize benefits from eating fish⁸.

Generally in Brazil, the communities such as indigenous groups, riverside populations and coastal dwellers (low-income groups) mainly obtain protein from fish consumption due to the fact of cheap and higher supply and cultural fishing habits. On the other hand, high-income communities have more protein options and for this reason do not frequently consume large amounts of fish. A similar trend was observed in the study conducted by Farias et al⁹ that studied children from 3 public schools (PS₁, PS₂ and PS₃) in Cananéia city observing a direct relation between total Hg content in hair and the low economic level of the family. In general, most families of the 3 schools studied presented lower income (1 to 5 minimum salaries, US\$ 300 to 1,500/month). These low-income families showed a greater dependency of protein intake from aquatic origin, in relation to bovine protein due to a greater availability and lower cost in the coastal region⁹. The majority of the studied families stated that fish consumption is derived from the families' fishing activities. Garcia¹⁰ in his study also observed the same relationship.

Continuing the study started in Cananéia, similar study was developed in Cubatão, considering the importance of assessing mercury levels in hair and commercial fish in coastal populations and their association with eating habits¹¹.

The purpose of this study was to evaluate total Hg and MeHg concentration in fish muscle and children hair, using as strategy: *i*) total Hg and MeHg determinations in the most consumed fish species; *ii*) total Hg and MeHg determination in 93 children hair samples (aged 4 to 14) in Cubatão and *iii*) analyses of answers to a diet consumption questionnaire by the parents of the children participating in the study. The results obtained for Hg in children hair in a previous study in Cananéia⁹ were used for comparison and discussion purposes. These two estuarine regions are undergoing different environmental anthropogenic impacts¹²⁻¹⁵. Cananéia is considered a naturally preserved area and recognized as a World Biosphere Reserve by UNESCO. Cubatão is located in an area under strong environmental impact caused by complex industrial activities. Eating habits

of these local populations are also undergoing different socio-economic changes. From the results of this study it is hoped that an estimation of the children population exposure to Hg and MeHg by means of hair analysis and fish intake can be obtained. Since, there are no references values for total Hg in children's hair, this study can also be used as a contribution for a pool of referential values in hair for Brazilian coastal children populations. In Brazil, total Hg levels in children hair have mostly been focused on different Amazonian communities^{16,17}.

MATERIAL AND METHODS

Studied areas

The Baixada Santista is a coastal area located in São Paulo State that includes four important coastal cities: São Vicente, Santos, Guarujá and Cubatão. Santos city has the busiest South American port. Cubatão city is one of the country's most important industrial poles with a population of 118,720 inhabitants¹⁸. Santos Bay, Santos and São Vicente estuarine channels and rivers are part of an important hydrological polluted system, which includes Cubatão city's industrial center and complex with over a hundred industries including the largest Brazilian steel plant¹⁹. Nowadays, there has been a reduction of hydrological pollution but not enough to reestablish the base-line values. In regards to Hg, some studies offer some environmental data for this region²⁰⁻²² revealing Hg contamination in sediments.

Cananéia city is located in the south coast of São Paulo state, far from the Santos-Cubatão system and is a part of the estuarine-lagoon complex of Cananéia-Iguape. In the southern part, Cananéia is surrounded by a preserved estuarine system^{15,23} that includes the Comprida, Cananéia and Cardoso Islands. This integral system is recognized by UNESCO (United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization) as a World Biosphere Reserve. Cananéia city is also one of the oldest cities in Brazil and has one of the largest preserved natural Brazilian mangrove areas. The city has two main economic activities, which are tourism, and fishing and its 12,226 inhabitants make their living primarily of these two activities¹⁸. The extensive mangrove provides a rich breeding and feeding ground for an extremely wide variety of aquatic fauna and flora^{10,23}. This scenario contributes to the presence of a large fishing population, which consumes large quantities of fish and seafood. Figure 1 presents the regions studied.



Figure 1. Map from Cananéia and Cubatão cities, Brazil

Sample Collection

Hair sampling and preparation

The hair samples from the children (4-14 years old) from the two cities were collected at the schools indicated by the Cities Educational Departments observing that sampling was to be in communities close to the estuarine system and/or where the students were members of a fishing family. In Cubatão, hair (93) and fish (58 individuals) samples were collected in March 2008 and in Cananéia⁹, 105 hair samples and 53 fish samples were obtained in August 2007. The most adequate communities to participate in this study were located at: i) Jardim Casqueiro and Ilha Caraguatá in Cubatão and ii) Vila Cabana, Acarau and Carijo in Cananéia. These communities were also chosen based on the number of fishing families located in each region. Children from public schools (PS) in both cities were invited to participate in the study. All parents and/or guardians signed a consent agreement for their children's participation in the study. Excluding factors were those children whose parents did not sign the consent agreement and children whose hair was too short to cut, mainly boys. In order to ascertain the daily dietary intake a questionnaire was filled out by the participating families about fish weekly intake, fish species most consumed, age, gender, social and economic status. This kind of questionnaire was used in a previous study⁹. The children selected had to present the signed consent agreement, have enough hair for collection and also a filled out questionnaire. Children hair samples were collected with a single cut from the

occipital region very close to the scalp with steel scissors, in the approximate amount of 1g. A small recipient containing 1 g of hair sample was used for comparison during *in situ* sampling. The study was approved by the Ethics Committee of the Nuclear and Energy Research Institute (IPEN/CNEN-SP) (Project n^o 109/CEP-IPEN/CNEN-SP)⁹.

Fish selection and preparation for analysis

Tabulated data from this study identified the 5 most consumed fish species in Cubatão which were: three carnivorous species: *Macrodon ancylodon* (King weakfish – Pescada*), *Menticirrhus americanus* (Southern king croaker - Perna de Moça*) and *Micropogonias furnieri* (Whitemouth croaker – Corvina*) and two planktivorous species, *Mugil liza* (Mullet – Tainha*) and *Sardella braziliensis* species (Sardine – Sardinha*). In Cananéia only four fish species were cited on the questionnaires which were: three carnivorous species, *Macrodon ancylodon* (King weakfish – Pescada*), *Centropomus parallelus* (Fat snook – Robalo peba*) and *Micropogonias furnieri* (Whitemouth croaker – Corvina*) and one planktivorous species, *Mugil liza* (Mullet – Tainha*). The families that took part in this study informed that they usually bought fish from the local markets, except the fishing families. Due to this, all the fish samples analyzed in this study were bought in local markets as well. (*Popular fish name in Portuguese).

The fish samples were bought directly from local street markets in Cubatão during March of 2008 and in Cananéia city in August 2007. All samples were assessed for quality indicators and external organoleptic characteristics (eyes, gills and scales). Fish were conditioned in isothermic boxes in crushed ice (-4 °C) and then identified before registering the biometric information (total length, total weight and body weight). In the laboratory, the samples of fish muscle were obtained from the 58 fishes from Cubatão and the 53 from Cananéia. The samples were dried at 40 °C in a ventilated oven until constant weight. Dried samples were ground, homogenized and prepared for total Hg determination. These dried samples were then analyzed and consequently, the results for total Hg and MeHg were obtained on a dry weight basis. After that, dry weight results obtained were transformed to wet weight basis by using humidity %.

Total Hg and MeHg determination

Total Mercury and MeHg determinations

were performed by Cold Vapor Atomic Absorption Spectrometry (CV AAS), using a FIMS (Flow Injection Mercury System) from Perkin Elmer. The experimental procedure applied in hair and fish samples have already been described in previous papers^{9,24}. The methodology validation for total Hg and MeHg determinations was carried out using human hair reference material (IAEA-086), Dogfish muscle (DORM-1, NRCC) and Dogfish liver (DOLT-3, NRCC), for fish samples. The detection limit (DL) for total Hg determination is 0.001 mg.kg⁻¹ and quantification limit (QL), 0.010 mg.kg⁻¹ 24.

All analyses were performed at the Neutron Activation Analysis Laboratory in Nuclear and Energy Research Institute – LAN/IPEN, SP-Brazil.

Statistical treatment

The statistical analysis was processed by the IBM SPSS Statistics Version 17.0 software (Tulsa, OK, USA).

For fish and total Hg in children hair from the different public schools investigated, the Shapiro Wilkis data treatment was used. However, since no normal Hg level distribution was found, the non-parametric Kruskal Wallis was applied to verify the significance of the differences in the Hg levels in the fish samples. The Spearman correlation test was used for the Hg and other variables.

RESULTS AND DISCUSSION

The precision and accuracy for total Hg and MeHg determinations were checked by means of reference material analyses in fish muscle (Dorm-1 – Dogfish muscle and Dolt-3 – Dogfish liver) and hair (IAEA-086). The results for total Hg and MeHg determinations in the IAEA-086 reference material showed relative standard deviation (RSD) of 3.6 and 6.3 % (n=10) and relative error (RE) of 1.0 and 1.5 %, respectively. For fish samples, the results showed RSD from 4.2 to 11.7 and RE from 0.9 to 12.0% (n=10). These results showed good precision and accuracy for both analytical methodologies in both matrices.

The fish samples were submitted to a biometric procedure that was applied to each individual before the muscle sampling and mercury analyses. Table 1 presents the total body length, feeding habits, median and interval for total Hg and MeHg (%) concentrations in fish muscle of the different species analyzed from Cananéia and Cubatão cities. In general, fish from a non-polluted costal region (without effective Hg contamination) present total Hg concentrations around

0.15 mg.kg⁻¹ (wet weight) whereas fish in contaminated regions can reach total Hg levels up to 2 mg.kg⁻¹ (wet weight). Benthic species can reach concentrations from 10 to 20 mg.kg⁻¹, values considered lethal for fish²⁵. In the present study, the higher total Hg levels found in Cananéia and Cubatão fishes, were 0.442 mg.kg⁻¹ and 0.348 mg.kg⁻¹ (wet weight), respectively, both in *Micropogonias furnieri* (Whitemouth croaker), a detritivorous species. These values are lower than the maximum levels established by the current Brazilian legislation (2013)²⁶ considering predatory and non-predatory fishes, 1.0 and 0.5 mg.kg⁻¹, respectively. In the present study, total Hg values for the individuals analyzed ranged from < 0.010 to 0.442 mg.kg⁻¹ (median of 0.010 mg.kg⁻¹ for *Mugil liza* (Mullet) to 0.179 mg.kg⁻¹ for *Micropogonias furnieri* (Whitemouth croaker), for fish available for consumption in Cananéia city. For

Cubatão, the values ranged from < 0.010 to 0.348 mg.kg⁻¹ (median of 0.010 mg.kg⁻¹ for *Mugil liza* to 0.181 mg.kg⁻¹ for *Micropogonias furnieri*). All data are presented in wet weight. According to the limits proposed for fish and fish products, considering the predatory and non-predatory species sampled, none surpassed the limits established by Brazilian legislation²⁶.

The percentage of MeHg determined in fish muscle showed values ranging from 14 % to 99 % taking into account the total Hg level. In general, the predominant form of Hg in fish muscle is methylmercury²⁷. In other tissues such as liver and kidney Hg presents itself as inorganic form exceeding the values of Hg found in the muscle^{25,28}. An exception is the Pacific blue Marlin that presents a 20 % level of MeHg in its muscle tissue. In general, the % of MeHg follows the pattern: muscle >

Table 1. Total length, weight, feeding habits, median and range for total Hg and MeHg (%) content in different fish species analyzed from Cananéia and Cubatão

Fish species (n)*	Feeding Habits	Weight (g)	Total length (mm)	Total Hg (mg.kg ⁻¹) (wet weight)	Total Hg (mg.kg ⁻¹) (dry weight)	% MeHg (interval)
					Muscle	Muscle
CANANÉIA						
Whitemouth croaker (11)	Detritivorous	1134 832 - 1711	454 414 - 507	0.179 0.114-0.442	0.812 0.516 - 2.008	63 (34 - 85)
King weakfish (16)	Carnivorous	298 220 - 613	320.5 200 - 385	0.039 0.012- 0.100	0.180 0.056 - 0.456	66 (37 - 99)
Fat snook (12)	Carnivorous	481 312 - 584	399.5 318 - 424	0.032 0.015-0.178	0.129 0.061 - 0.712	45 (18 - 67)
Mullet (14)	Planctivorous	1514 807 - 1936	567.5 432 - 600	0.010 <0.010-0.025	0.032 <0.010 - 0.098	---
CUBATÃO						
Whitemouth croaker (11)	Detritivorous	720 607 - 909	426 360 - 453	0.181 0.041-0.348	0.789 0.178 - 1.512	37 (18 - 61)
Southern king croaker (12)	Carnivorous	1736 1446 - 2170	324 301 - 385	0.105 0.043-0.184	0.499 0.206 - 0.878	53 (22 - 68)
King weakfish (16)	Carnivorous	304 234 - 374	355 200 - 368	0.046 0.012-0.062	0.193 0.051-0.257	42 (18 - 61)
Sardine (16)	Planctivorous	104 91 - 120	223 210 - 235	0.027 <0.010-0.040	0.091 0.026 - 0.135	31 (14 - 61)
Mullet (5)	Planctivorous	1416 1302 - 1710	547 520 - 555	0.010 <0.010-0.023	0.029 0.013 - 0.090	56 (56 - 68)

n: number of samples analyzed; --- : Values for MeHg < 0.010 mg.kg⁻¹

gills > kidneys > liver²⁹. Some studies verified that the % of MeHg in muscle tissues is higher in upper trophic levels. In marine ecosystems the % of MeHg was higher in tertiary carnivorous species (C₃) than secondary ones (C₂) while their total Hg levels were of the same order. These observations demonstrated the biomagnification capacity of Hg throughout the trophic food chain and reflect the fact that the upper trophic fish present higher levels of MeHg³⁰.

Observing the data assembly according to Kruskal-Wallis statistical treatment, the differences between Total Hg observed in function of the fish species analyzed (*carnivorous and non-carnivorous*) presented a high significant difference ($p < 0.05$), as expected, once carnivorous species are exposed to a more intense Hg bioaccumulation rate than the non-carnivorous species³⁰

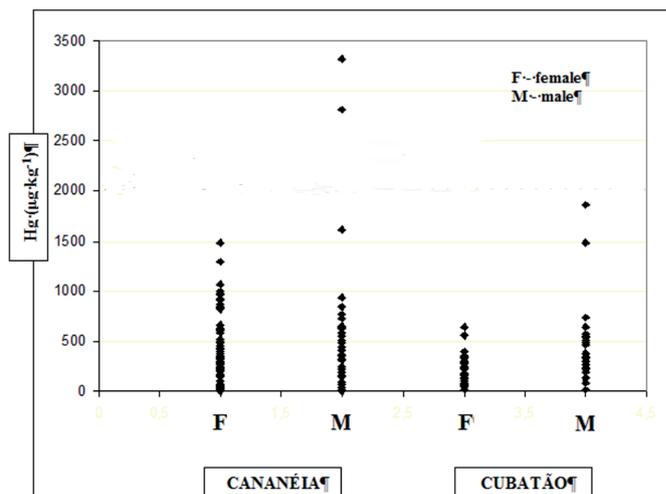


Figure 2. Total Hg concentrations distribution in hair samples in female and male groups from Cananéia and Cubatão cities, Brazil

Table 2. Total Hg and % MeHg results in children's hair from Cubatão public schools and weekly fish intake

(Total Hg – mg.kg ⁻¹)	CUBATÃO		CANANÉIA ^a		
	PS _{Ct1}	PS _{Ct2}	PS _{Ca1}	PS _{Ca2}	PS _{Ca3}
Female (n)	31	36	7	26	35
Mean ± std	0.236 ± 0.145	0.338 ± 0.345	0.041 ± 0.035	0.462 ± 0.258	0.461 ± 0.361
Median	0.235	0.324	0.033	0.394	0.326
range	0.016 – 0.637	< 0.010 – 1.330	< 0.010 – 0.112	< 0.010 – 0.959	0.038 – 1.479
Age (median) (range)	11 (9-14)	10 (7-13)	5 (4-9)	8 (5-12)	6 (4-12)
% MeHg (median)	74	71	74	69	79
Male (n)	13	13	8	12	17
Mean ± std	0.458 ± 0.169	0.483 ± 0.554	0.249 ± 0.262	0.636 ± 0.881	0.745 ± 0.787
Median	0.467	0.296	0.203	0.379	0.506
range	0.220 – 0.741	<0.010 – 1.859	< 0.010 – 0.770	0.076 – 3.321	< 0.010 – 2.814
Age (median) (range)	10 (9-12)	10 (8-12)	6 (4-8)	9 (3-10)	7 (5-10)
% MeHg (median)	83	72	68	83	83
Total (n)	44	49	15	38	52
Mean ± std	0.301 ± 0.182	0.376 ± 0.362	0.152 ± 0.216	0.641 ± 0.537	0.576 ± 0.547
Median	0.270	0.319	0.043	0.384	0.405
Range	0.016 – 0.741	< 0.010 -1.859	<0.010 – 0.770	<0.010 – 3.321	< 0.010 – 2.814
age (median) (range)	11 (9-14)	10 (7-13)	5 (4-9)	8 (4-12)	7 (4-12)
% MeHg (median)	74	71	72	70	81
Fish weekly intake (%)					
Rarely	34	44	13	8	7
1 - 2 times/week	57	49	48	45	43
> 2 times/week	9	7	39	47	50

a: Farias et al⁹; n: number of individuals; PS_{Ct1, Ct2}: are public schools from Cubatão; PS_{Ca1, Ca2, Ca3}: are public schools from Cananéia

in function of its position in the food chain.

Table 2 shows the mean, median and interval for the total Hg results in children's hair, as well as, median age, MeHg (%) and fish weekly intake for female and male groups, from Cananéia and Cubatão communities. Some data for total Hg in children hair from Cananéia city obtained in a previous study of our group were already published⁹. Hair mercury content was lower than the US EPA reference limit³¹ of 1 mg.kg⁻¹ in 95 % of the studied children; 4 % presented levels between 1 and 2 mg.kg⁻¹ and 1 %, higher than 2 mg.kg⁻¹. The normal level of Hg in hair is 1-2 mg.kg⁻¹, however those who consume fish one or more times per day may have Hg levels in hair exceeding 10 mg.kg⁻¹³².

Figure 2 shows the total Hg concentrations distribution in hair samples in female and male groups from Cananéia and Cubatão cities. The mean values for male groups were higher in both counties (Table 2). Nakagawa (1995), *apud* Yasutake et al³³ observed that gender can be an important variable for total Hg concentration in hair and verified that the content in males is much higher than in females. On the other hand, there are studies where a significant correlation between gender and total Hg content in hair was not observed³⁴. Presently, there is still no agreement about the influence of gender on the total Hg content in hair.

In the present study, a negative correlation between age and total Hg among the entire sampled group was also found. The Spearman correlation coefficient was found to be $r_s = -0.336$, indicating a weak negative correlation between age and total Hg content in children's hair.

The PS_{Ct1} School individuals sampled from the Cubatão region presented a total Hg mean of 0.236 mg.kg⁻¹ for females and 0.458 mg.kg⁻¹ for the male group. At the PS_{Ct2} School, the mean was 0.338 mg.kg⁻¹ for females and 0.483 mg.kg⁻¹ for the male group. Cananéia region, at the PS_{Ca1} School, individuals presented total Hg mean of 0.041 mg.kg⁻¹ for the female group, 0.249 mg.kg⁻¹ for the male group; PS_{Ca2} School, 0.462 mg.kg⁻¹ for the female group, 0.636 mg.kg⁻¹ for the male group and PS_{Ca3} School, 0.461 mg.kg⁻¹ for the female group and 0.745 mg.kg⁻¹ for the male group. Table 2 also shows the median of MeHg (%) in the hair samples analyzed. The MeHg % ranged from 71 to 83 % for both groups in Cubatão and from 68 to 83 %, in Cananéia. In the literature, the average value of 80 % of MeHg in relation to total Hg content in hair is commonly found³⁵.

According to the questionnaire answers regarding

eating habits in Cananéia city (Table 2), a frequency of 1-2 times/week of fish and seafood intake occurred in 48 %, 45 % and 43 % for children from PS_{Ca1}, PS_{Ca2} and PS_{Ca3}, respectively. Furthermore, according to the questionnaire data 39, 47 and 50 % reported consuming fish > 2 times/week, respectively. Rare fish consumption was reported by 13 %, 8 % and 7 %, respectively, showing the importance of fish in the diet of the local population. In general, the sampling revealed that most families (67.6 %) belonged to a low socio-economic level, receiving 1 to 5 minimum salaries in Brazil (US\$ 300 to 1500), contributing to a higher fish and seafood consumption due to the fact that most families make their living by fishing⁹.

In Cananéia, the children hair samples from public school PS_{Ca1} presented median values for total Hg, for both male and female groups, much lower than the PS_{Ca2} and PS_{Ca3} values. Furthermore, schools PS_{Ca2} and PS_{Ca3} presented the higher number of fishermen as parents (45 %). This fact may explain why these children consume more fish/seafood and as a result presented higher total Hg levels in their hair than the children from PS_{Ca1}.

In Cubatão, the children hair samples from public schools PS_{Ct1} and PS_{Ct2} presented very similar median values for total Hg (0.270 and 0.319 mg.kg⁻¹) and higher mean values for the male group in both schools as well (Table 2).

According to eating habits in Cubatão city, the present study verified, observing the parents answers to the questionnaire (Table 2), that a 1-2 times/week of fish and seafood intake frequency occurred in 57 % and 49 % for PS_{Ct1} and PS_{Ct2}, respectively. Furthermore, 9 and 7 % reported consuming fish more than 2 times/week. Rare fish consumption was observed in 34 % and 44 %, respectively. These results indicate a different frequency in fish and seafood consumption in Cubatão when compared to the fish consumption data from Cananéia. This difference may also explain the higher mean Hg levels in children's hair (female and male groups) in Cananéia (except for PS_{Ca1}) than Cubatão as Hg concentration in fish species most consumed were similar in both communities. This seems to confirm the influence of higher fish intake frequency in Cananéia.

In Cubatão, the sampling also revealed that most families (59 %) belonged to a low socio-economic level, receiving 1 to 5 minimum salaries. The majority of the parents interviewed answered that they consumed fish acquired in the weekly open street market.

Table 3. Total Hg concentrations in children's hair from different localities in Brazil and other countries

Brazil	Total Hg (mg kg ⁻¹)	
	Mean ± s.d.	Interval
São Luiz do Tapajós – age group: 0 - 5 years (Pará State – Northern Brazil) ²⁵	21.06 ± 14.38	0.10 – 94.5
Barão do Melgaço – age group: 3 – 7 years (Mato Grosso State – Central Brazil) ³⁸	5.37 ± 3.35	0.58 – 17.14
River Madeira basin: children and adults (Amazon region – Northern Brazil) ¹⁷	15.2 ± 9.6	0.36 – 150
Manaus city – age group: 2 – 7 years (Amazon region- Northern Brazil) ¹⁶	1.93 ± 3.90	0.02 – 34.4
Cubatão – age group: 1- 10 years (São Paulo State - Southeastern Brazil) ¹⁹	0.88 ± 0.61	–
Cananéia – age group: 4 - 12 years (São Paulo State- Southern Brazil) ⁹	0.46 ± 0.35	< 0.01 – 3.33
Cubatão – age group: 4 - 14 anos (São Paulo State - Southern Brazil) (present study)	0.34 ± 0.29	< 0.01 – 1.86
Other countries	Total Hg (mg kg ⁻¹)	
	Mean ± s.d.	Interval
Spain – age: 4 years ²	0.99 ± 0.20	< 0.01 – 5.63
Japan – age: 7 years ³³	1.4 ± 0.89	0.45 – 6.32

The available information in regards to the Hg content in children hair from different Brazilian regions is focused primarily on data from the Amazon region^{16,17}. Hacon et al³⁶ and Passos and Mergler³⁷ published two reviews showing the mercury concentration in the Amazon.

Table 3 presents total Hg levels in children hair from Cananéia⁹ and Cubatão (present study) and children living in the Amazon region and two other countries. Total Hg levels in children hair found in the present study were much lower when compared to values obtained from the Amazon region and lower than values published by ACPO¹⁹. The values observed in this study were also lower than values from other countries, despite the difficulty for comparison based on age differences between participants. However, considering these different studies, fish consumption is often cited as the most significant factor for human mercury bioaccumulation, particularly in its organic form. The results presented in this study suggest that the concentration of total Hg and MeHg found

in children hair samples were mainly dependent on eating habits of the population, the same observed by Tavares et al³⁸ and Marques et al³⁹ in studies developed with children in Brazil as well as low economic level families.

It was expected that the highest Hg and MeHg levels were to be found in children hair living in Cubatão in relation to those observed in children living in the Cananéia city due to the association of the fish source from the polluted estuarine system in Cubatão (industrial activities and the largest Brazilian steel plant) as mentioned before. However, this was not the case. The fish consumed in Cubatão did not necessarily come from local waters. Furthermore, there are fewer fishing families in this industrial region. On the other hand, the number of fishing families in Cananéia city was much higher than in Cubatão, probably resulting in the higher fish consumption in Cananéia. In both locations, the families were classified as low-income varying from 1 to 5 minimum salaries (67.6 % in Cananéia and 59 % in Cubatão) according to POF (Family Budget Survey -

POF 2008-2009 (the Brazilian census¹⁸). This fact also seems to favor fish/seafood consumption for protein in coastal cities. It should be noted that Cubatão city offers more options for protein sources than Cananéia. This behavior could be associated to the high price of fish and to the pollution estuarine history of Cubatão which may contribute to lower fish consumption. On the other hand, Cananéia estuary has an extensive mangrove area that provides a rich breeding and feeding ground for an extremely wide variety of aquatic fauna and flora, producing a large amount of fish and seafood.

In relation to total Hg fish concentrations, both Cananéia and Cubatão fish presented levels below the fish Hg limits established by Brazilian legislation for human consumption (predatory and non-predatory fishes, 1.0 and 0.5 mg.kg⁻¹, respectively). In Cubatão city, the origin of the fish in the local markets was verified by questioning the sales person during the purchase. They stated that most commercialized fish originated from the coastal areas of Santa Catarina State, in the southern Brazilian region, far from this polluted region.

Researchers from Duke University, USA, recently published a study about photolytic degradation of MeHg in brackish waters where the Hg concentrations in freshwater are much greater than those found in salt water. However, when fish are ingested, it is the saltwater fish that offer greater risk to human health⁴⁰. The MeHg is potentially more dangerous than inorganic Hg forms and in the water system is associated with dissolved organic matter and in the sea, is also associated with chloride, ie, salt. One way nature transforms the MeHg in a less toxic form is through photochemical reactions promoted by sunlight. When MeHg is associated to dissolved organic matter such as plants or animals detritus, the sunlight breaks the molecule. However, in ocean water, the MeHg remains strongly linked to chloride and is not easily degraded by sunlight. Since MeHg is not broken down by sunlight in sea water, its residence time is much greater in saltwater than in freshwater, which increases the rate of intake by marine animals⁴⁰. Fish and seafood have a natural tendency to store MeHg in their bodies characterized therefore as the main source of metal intake in humans. In the marine environment, bacteria can methylate the Hg and transform it into an easily assimilated form especially in surface marine sediments. According to the same study it is also important to direct research and policy control of Hg for saltwater, mainly in the coastal areas those are submitted to anthropogenic

inputs. To date, most efforts have been directed to the presence of the metal in freshwater. This fact is particularly true in Brazil, given that most studies with Hg are located in the Amazon region.

Finally, the results obtained in the present study indicated the necessity of obtaining more data concerning Hg values for different coastal regions of Brazil in order to contribute to establishing values considered characteristic for different parts of the country and in relation to human populations. Children, in particular, need intensive and continuous studies because they are most sensitive to the deleterious effects of this element.

CONCLUSION

The fish species analyzed were the most consumed by the coastal populations studied and presented Hg levels in muscles lower than the limit established by Brazilian legislation (0.5 – non-carnivorous species and 1.0 mg.kg⁻¹ – carnivorous species, respectively) in both studied regions. The median values for total Hg levels in the fish species analyzed were very similar in both coastal cities.

The Hg concentrations in children hair were lower than the US EPA reference limit of 1 mg.kg⁻¹ in 95 % of the studied children. This value was used as reference since at present there is no value set for children. The mean values for total Hg in children's hair (female and male groups) in Cananéia were higher than in Cubatão, except for PS_{Ca1} School. From these results, it seems that the quantity and frequency of fish ingested are the main factors that contribute to the exposure and bioaccumulation of Hg, as the total Hg levels in fish were similar in both communities.

To complement information about Hg in communities outside the Amazon region it is important to determine the profile of Hg and MeHg distribution in Brazil, considering the wide diversity of ecosystems, cultural patterns and socio-economic conditions particularly considering the frequency and type of fish people consume.

The results from this study can also be used as a contribution for referential values for total Hg levels in hair for Brazilian coastal children populations.

Considering the Hg levels in those fish species most consumed and hair, children from both communities studied appear not be at risk of Hg and MeHg contamination.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to the Municipal Education Department from Cananéia and Cubatão cities, from São Paulo State and especially to the schools participating in the study; the Oceanographic Institute of the São Paulo University for the logistic support in Cananéia City and for financial support from the Research Agencies FAPESP (process n^o 2005/50769-2 and 2009/18233-6) and CNPq (process n^o 304883/2006 - 9).

REFERENCES

1. Endo T, Haraguchi K. High mercury levels in hair samples from residents of Taiji, a Japanese whaling town. *Mar Pollut Bull.*2010;60:743-7.
2. Freire C, Ramos R, Lopez-Espinosa MJ, Díez S, Jesús V, Ballester F, et al. Hair mercury levels, fish consumption, and cognitive development in preschool children from Granada, Spain. *Environ Res.* 2010;110(1):96-104.
3. Chien LC, Gao CS, Lin HH. Hair mercury concentration and fish consumption: risk and perceptions of risk among women of childbearing age. *Environ Res J.*2010;110(1):123-9.
4. Mozaffarian D, Rimm EB. Fish intake, contaminants, and human health: evaluating the risks and the benefits. *JAMA.*2006;296(15):1885-99.
5. Mahaffey KR, Sunderland EM, Chan HM, Choi AL, Grandjean P, Marien K, et al. Balancing the benefits of n-3 polyunsaturated fatty acids and the risks of methylmercury exposure from fish consumption. *Nutr Rev.*2011;69(9):493-508.
6. Costa, LG. Contaminants in fish: risk-benefit considerations. *Arh Hig Rada Toksikol.* 2007; 58:367-74.
7. Myers G, Davidson PW, Strain JJ. Nutrient and methylmercury exposure from consuming fish. *J Nutr.*2007;137:2805-8.
8. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization - FAO/WHO. Report of the Joint FAO/WHO expert consultation on the risks and benefits of fish consumption, 25-29 January 2010, Report # 979; Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization: Rome. 2011.
9. Farias LA, Santos NR, Fávoro DIT, Braga ES. Mercúrio total em cabelo de crianças de uma população costeira, Cananéia, São Paulo, Brasil. *Cad Saúde Pública.*2008;24(10):2249-56.
10. Garcia TR. Impactos da implantação de uma cooperativa de produção de ostras junto a comunidades extrativistas caiçaras do litoral sul/SP: um estudo de caso [dissertação de Mestrado]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo; 2005.
11. Díez S, Montuori P, Pagan A, Sarnocchiaro P, Bayona JM, Triassu M. Hair mercury levels in an urban population from southern Italy: fish consumption as a determinant of exposure. *Environ Int.*2008;34:162-7.
12. Abessa DMS, Carr RS, Rachid BRF, Sousa ECPM, Hortelani MA, Sarkis JES. Influence of a Brazilian sewage outfall on the toxicity and contamination of adjacent sediments. *Mar Pollut Bull.*2005;50(8):875-85.
13. Amorim EP, Favaro DIT, Berbel GBB, Braga ES. Assessment of metal and trace element concentrations in the Cananéia estuary, Brazil, by neutron activation and atomic absorption techniques. *J Radioanal Nucl Chem.*2008;278 (2):485-9.
14. Braga ES, Bonetti CVDH, Burone L, Boneti Filho J. Eutrophication and bacterial pollution caused by industrial and domestic wastes at the Baixada Santista Estuarine System - Brazil. *Mar Pollut Bull.*2000;40(2):165-73.
15. Mahiques MM, Burone L, Figueira RCL, Oliveira AA, Wanderley L, Capellari B, et al. Anthropogenic influences in a lagoonal environment: A multiproxy approach at the Valo Grande Mouth - Cananéia-Iguape System (SE-Brazil). *Braz J Oceanogr.*2009;57(4):325-37.
16. Farias LA, Favaro DIT, Pessoa A, Aguiar JPL, Yuyama LKO. Mercury and methylmercury concentration assessment in children's hair from Manaus, Amazonas State, Brazil. *Acta Amazon.*2012;42(2):279-86.
17. Bastos WR, Gomes JPO, Oliveira RC, Almeida R, Nascimento EL, Bernardi JVE. Mercury in the environment and riverside population in the Madeira River Basin, Amazon, Brazil. *Sci Total Environ.*2006;368:344-51.
18. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008/2009. Análise do consumo alimentar pessoal no Brasil. [Accessed 2013 September 13th]. Available from:[http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2008_2009/default.shtm].
19. Associação de Consciência à Prevenção Ocupacional - ACPO. O Hg na Baixada Santista. [Accessed 2013 September 13th]. Available from:[<http://www.acpo.org.br/principal.php>].
20. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo - CETESB. Sistema Estuarino de Santos São Vicente, Relatório Técnico. [Accessed 2013 September 13th]. Available from: [<http://www.cetesb.sp.gov.br/agua/aguas-superficiais/35-publicacoes/-relatorios.%202011>].
21. Hortellani MA, Sarkis JES, Bonetti J, Bonetti C. Evaluation of mercury contamination in sediments from Santos-São Vicente Estuarine System, São Paulo State, Brazil. *J Braz Chem Soc.*2005;16(6A):1140-9.
22. Luiz-Silva W, Matos RHR, Kristosch GC. Geoquímica e índice de geoacumulação de mercúrio em sedimentos de superfície do Estuário de Santos - Cubatão (SP). *Quím Nova.*2002;25(5):753-6.
23. Braga ES. Nutrientes dissolvidos e produção primária do fitoplâncton em dois sistemas costeiros do estado de São Paulo [dissertação de Mestrado]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo, 1995.
24. Farias LA, Fávoro DIT, Vasconcellos MBA. Determinação de mercúrio e metilmercúrio em amostras de cabelo e peixes. *Rev Inst Adolfo Lutz.*2009;68(3):451-60.
25. Malm O, Branches FJ, Akagi H, Castro MB, Pfeiffer M, Harada M, et al. Mercury and methylmercury in fish and human hair from Tapajos River Basin, Brazil. *Sci Total Environ.*1995;175(2):141-50.
26. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC n^o 42, 29 de agosto de 2013. Aprova o Regulamento técnico sobre Limites Máximos de Contaminantes Inorgânicos em Alimentos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 30 agosto 2013. Seção 1, n^o 168, p.33-34.
27. Driscoll CT, Mason RP, Chan HM, Jacob DJ, Pirrone N. Mercury as a global pollutant: sources, pathways, and effects. *Environ Science Tech.*2013;47:4967-83.

28. Kehring HÁ, Costa M, Moreira IE, Malm O. Total mercury and methylmercury in a Brazilian estuary. *Mar Pollut Bull.*2002;44:1018-23.
29. Baêta AP. Mercúrio total e metilmercúrio em diferentes espécies de peixes da Baía de Guanabara [tese de doutorado]. Rio de Janeiro (RJ): Pontifícia Universidade Católica; 2004.
30. Gray JS. Biomagnification in marine systems: the perspective of an ecologist. *Mar Pollut Bull.*2002;45:46-52.
31. (US. Environmental Protection Agency, Office of Science and Technology, Office of Water) - USEPA, 2001. Water quality criterion for the protection of human health. Methylmercury. [Accessed 2014 March 25th]. Available from: [<http://water.epa.gov/scitech/swguidance/standards/criteria/health/methylmercury.cfm>].
32. World Health Organization - WHO, 2008. Guidance for identifying populations at risk from Hg exposure. Issued by UNEP DTIE Chemicals Branch and WHO Department of Food Safety, Zoonosis and Foodborne Diseases. [Accessed 2013 September 13th]. Available: [<http://www.who.int/foodsafety/publications/chem/mercuryexposure.pdf>].
33. Yasutake A, Matsumoto M, Yamaguchi M, Hachiya N. Current hair mercury levels in Japanese: survey in five districts. *Tohoku J Exp Medicine.*2003;199:161-9.
34. National Academy of Sciences. Toxicological Effects of Methylmercury. Committee on the Toxicological Effects of Methylmercury, Board on Environmental Studies and Toxicology, National Research Council, 2000. [Accessed 2014 March 25th]. Available on: [http://www.nap.edu/openbook.php?record_id=9899].
35. Magos L, Clarkson T. The assessment of the contribution of hair to methylmercury excretion. *Toxicol Letters.*2008;182:48-9.
36. Hacon S, Barrocas PRG, Vasconcellos ACS, Barcellos C, Wasserman JC, Campos RC, et al. An overview of mercury contamination research in the Amazon basin with an emphasis on Brazil. *Cad Saúde Pública.*2008;24(7):1479-92.
37. Passos CJS, Mergler D. Human Mercury exposure and adverse health effects in the Amazon: a review. *Cad Saúde Pública.*2008;24(Suppl 4): S503-20.
38. Tavares LMB, Câmara VM, Malm O, Santos ECO. Performance on neurological development tests by riverine children with moderate mercury exposure in Amazonia, Brazil. *Cad Saúde Pública.*2005;21(4):1160-7.
39. Marques RC, Dórea JG, Bastos R, Rebelo MF, Fonseca MF, Malm O. Maternal mercury exposure and neuro-motor development in breastfed infants from Porto Velho (Amazon), Brazil. *Int J Hyg Environ Health.*2007;210:51-60.
40. Zhang T, Hsu-Kim H. Photolytic degradation of methylmercury enhanced by binding to natural organic ligands. *Nature Geosc.*2010; 3:473-6.

Estudo da presença da toxina microcistina na água de reservatório de Mundaú (Garanhuns-PE) pelas metodologias ELISA e CLAE

Study on the occurrence of microcystin toxin in water reservoir of Mundaú (Garanhuns-PE) by ELISA and HPLC methodologies

RIALA6/1602

Catarina Paula da Silva RAMOS^{1,2*}, Irapuan Oliveira PINHEIRO³, Edvani Maria da SILVA¹, Kátia Christina LEANDRO⁴

*Endereço para correspondência: ¹Laboratório de Cianobactérias, Coordenação de Diagnóstico Laboratorial em Vigilância Ambiental e Toxicologia, Gerência de Diagnóstico Laboratorial em Vigilância Sanitária e Ambiental, Laboratório Central de Saúde Pública (LACEN-PE), Rua Fernandes Vieira, s/n, Boa Vista, CEP 50050-210, Recife, PE/Brasil. Tel: (81) 31816560 E-mail: catarinasramos@yahoo.com.br

²Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE

³Laboratório de Processos e Produtos Biotecnológicos (LPPB), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Pernambuco - UPE

⁴Laboratório de Eletroanalítica, Departamento de Química, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz

Recebido: 02.09.2013 - Aceito para publicação: 19.06.2014

RESUMO

As cianobactérias são responsáveis pela produção de cianotoxinas que, uma vez acumuladas, podem causar sérios danos à saúde humana e animal. As microcistinas são o tipo mais comum de cianotoxinas e são promotoras de tumores hepáticos. O reservatório de Mundaú, localizado no município de Garanhuns-PE, foi o local escolhido por apresentar histórico de florações de cianobactérias produtoras de microcistinas. Neste trabalho foi investigada a presença de microcistinas em amostras de água bruta do reservatório do rio Mundaú utilizando-se as técnicas de Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Durante quinze meses consecutivos, as amostras de água foram coletadas em duplicata no ponto de captação deste manancial e analisadas por ambas metodologias ELISA e CLAE. A presença de microcistinas foi detectada em 100 % das amostras, confirmando-se a relevância do monitoramento de microcistinas em águas de abastecimento público, pois assim como o rio Mundaú, vários mananciais de Pernambuco apresentam florações de cianobactérias que podem ser tóxicas. Este trabalho deixou como legado a implantação da referida análise no Laboratório Central de Saúde Pública (LACEN-PE), e demonstrou sua importância como metodologia complementar à contagem das cianobactérias, para fornecer subsídios às ações preventivas de vigilância à saúde.

Palavras-chave. microcistinas, ELISA, CLAE, cianotoxinas, água.

ABSTRACT

Cyanobacteria are responsible for the production of cyanotoxins, and once accumulated, it might cause serious harm to the human and animals health. Microcystins are the most common type of cyanotoxins and they cause liver tumor. The Mundaú reservoir, located in the municipality of Garanhuns-PE, was the selected site for presenting historical blooms of microcystins-producing cyanobacteria. This study analyzed the occurrence of microcystins in raw water samples from the Mundaú reservoir by using Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) and High Performance Liquid Chromatography (HPLC) methodologies. During the consecutive fifteen months, water samples were collected in duplicate at the intake point of this water source, and they were analyzed by both ELISA and HPLC techniques. The presence of microcystins was detected in 100 % of analyzed samples, confirming the relevance of performing the microcystins monitoring in public water supplies. And as well as the Mundaú river, various water sources of Pernambuco show cyanobacterial blooms, which might be toxic. The techniques used in this study were implemented in the Central Laboratory of Public Health of Pernambuco (LACEN-PE), and they showed to be a relevant tools as a complementary methodology to the cyanobacteria counting assay for providing preventive subsidies to the health surveillance.

Keywords microcystin, ELISA, HPLC, cyanotoxins, water.

INTRODUÇÃO

A contaminação das águas naturais representa um dos principais riscos à saúde pública, sendo amplamente conhecida a estreita relação entre a qualidade da água e as enfermidades que acometem as populações, especialmente aquelas não atendidas por serviços de saneamento. No Brasil, as péssimas condições sanitárias resultam na degradação generalizada dos elementos naturais e, certamente, dos recursos hídricos¹.

Como consequência, ocorre a eutrofização dos mananciais, tornando-os propícios à proliferação excessiva de algas, comprometendo a qualidade da água e restringindo a sua utilização para abastecimento público^{2,3}.

O crescimento excessivo de algas em reservatórios brasileiros é uma realidade e tem prejudicado o uso da água para diversas finalidades. Alguns grupos de algas, em especial as do grupo das cianofíceas ou cianobactérias, podem causar gosto e odor desagradáveis na água. Porém, o maior problema está no fato de que podem produzir toxinas, tais como as microcistinas, que causam a morte de animais, domésticos e selvagens, e também intoxicação humana⁴⁻⁶.

Devido à morte ou lise celular das cianobactérias, ocorre a liberação das cianotoxinas, que podem causar problemas de saúde nos seres humanos, como lesões no fígado (hepatotoxinas), no sistema nervoso (neurotoxinas) ou, apenas, irritação na pele (dermatotoxinas)⁷⁻⁹.

O tipo mais comum de intoxicação envolvendo cianobactérias é ocasionado por hepatotoxinas, que apresentam uma ação mais lenta podendo causar morte num intervalo de poucas horas a poucos dias. As espécies já identificadas como produtoras dessas toxinas estão incluídas nos gêneros *Microcystis*, *Anabaena*, *Nodularia*, *Oscillatoria*, *Nostoc* e *Cylindrospermopsis*¹⁰.

Há evidências de que populações abastecidas por reservatórios que apresentam extensas florações podem estar expostas a baixos níveis de toxinas por longo período. Essa exposição prolongada deve ser considerada como um sério risco à saúde uma vez que as microcistinas são o tipo mais comum de hepatotoxinas de cianobactérias, sendo potentes promotoras de tumores¹¹ e, portanto, este consumo continuado de pequenas doses pode levar a uma maior incidência de câncer hepático na população exposta. Como consequência, é importante que os efeitos crônicos de exposições prolongadas por ingestão oral de baixas concentrações de cianotoxinas

sejam avaliados tanto do ponto de vista epidemiológico como toxicológico.

Um estudo recente mostrou que as microcistinas apesar de serem comumente caracterizadas como hepatotoxinas, mostram uma neurotoxicidade potencial, mas os efeitos neurotóxicos do seu mecanismo não estão claros¹².

A Portaria nº 2914/2011¹³, do Ministério da Saúde, estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, sendo que dentre outras análises, determina que a pesquisa e microcistinas na água seja obrigatória e tenha acompanhamento semanal sempre que a densidade de cianobactérias estiver acima de 20.000 cel.mL⁻¹.

Segundo Chorus e Bartram¹⁴, a Organização Mundial de Saúde, no sentido de proteger a saúde pública, estabeleceu como limite máximo aceitável para microcistina na água destinada ao consumo humano o valor de 1 µg.L⁻¹. O Brasil foi o primeiro país a criar uma legislação específica, a qual estabeleceu o valor máximo de microcistinas permitido na água de abastecimento público em 1 µg.L⁻¹, porém para águas de abastecimento de hospitais que realizam hemodiálise, esse valor tem que ser igual a zero¹⁵.

No Brasil, 32 espécies de cianobactérias tóxicas já foram descritas para regiões tropicais e subtropicais do país e estão distribuídas nas seguintes ordens: 12 *Chroococcales*, 10 *Oscillatoriales* e 10 *Nostocales*. A região tropical do Brasil apresenta menos biodiversidade de cianobactérias tóxicas (14 espécies) do que a parte subtropical do país (27 espécies). *Microcystis* (7 espécies) e *Anabaena* (6 espécies) são os gêneros com maior número de espécies tóxicas¹⁶.

Pesquisas da comunidade fitoplanctônica em mananciais no estado de Pernambuco demonstraram intensa proliferação de cianobactérias, apresentando em alguns meses densidade média acima de 10⁶ cel. mL⁻¹, constituindo indicativo de potencial tóxico com relação à presença de cianotoxinas. Entretanto, estudos desta natureza no estado, até o momento, são escassos. A presença de cianotoxinas também foi observada em florações de *Anabaena spiroides* Klebahn, *Pseudanabaena* sp., *Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenaya & Subba Raju e *Microcystis aeruginosa* (Kützing) Kützing ocorridos em importantes reservatórios do estado¹⁷.

Foi também em Pernambuco, na cidade de Caruaru em 1996, o primeiro caso confirmado de

mortes humanas causadas por cianotoxinas, quando 130 pacientes renais crônicos, após terem sido submetidos a sessões de hemodiálise passaram a apresentar um quadro clínico compatível com uma grave hepatotoxicose. Desses, 60 pacientes vieram a falecer até 10 meses após o início dos sintomas. As análises confirmaram a presença de microcistinas e cilindrospermopsina no carvão ativado utilizado no sistema de purificação de água da clínica, e de microcistinas em amostras de sangue e fígado dos pacientes intoxicados^{18,19}. Além disso, as contagens das amostras do fitoplâncton do reservatório que abastecia a cidade demonstraram uma dominância de gêneros de cianobactérias comumente relacionados com a produção de microcistinas.

A literatura também apresenta registros de intoxicação de peixes obtidos em ambientes eutrofizados com presença de cianotoxinas, chegando em alguns casos a ser evidenciada mortalidade de toneladas desses animais em decorrência do processo denominado bioacumulação²⁰. Portanto, torna-se necessário o monitoramento de microcistinas em água destinada a população e ao uso em serviços de saúde pública, para evitar todos os riscos adversos à saúde humana.

Os principais objetivos deste trabalho foram verificar a presença de microcistinas em amostras de água do reservatório de Mundaú, localizado no município de Garanhuns-PE, utilizando os métodos de detecção ELISA e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e também implementar estas técnicas de detecção e quantificação no Laboratório Central de Saúde Pública de Pernambuco Dr. Milton Bezerra Sobral (LACEN-PE), a fim de criar dados para subsidiar ações de vigilância ambiental, epidemiológica e sanitária no estado de Pernambuco.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo

O reservatório do Mundaú (latitude 8°56'42,8"S e longitude 36°29'27,4"W) localiza-se a 232 km do Recife-PE, no município de Garanhuns. Faz parte da Bacia hidrográfica do Rio Mundaú, que apresenta nascente em Garanhuns e foz na Lagoa do Mundaú, Maceió-AL, com extensão de 4.090,39 km², a qual atinge 15 municípios no estado de Pernambuco, além de outros municípios no estado de Alagoas²¹. O reservatório apresenta capacidade de acumulação de

água de aproximadamente 1.968.600 m³ e é considerado um importante sistema de abastecimento, pois fornece água para o município de Garanhuns na Região Agreste recebendo grande carga poluidora de esgotos domésticos e industriais da região²² e, frequentemente, apresenta florações de cianobactérias.

Procedimento de coleta

Amostras de água de 500 mL foram coletadas pelos técnicos da Agência Pernambucana de Vigilância Sanitária (APEVISA), no ponto de captação do reservatório de Mundaú-PE, antes do envio para a estação de tratamento. Após a coleta, as amostras foram colocadas em frascos de polietileno denso, acondicionadas a 4 °C e transportadas ao abrigo da luz. Foram adicionados 2 mL de ácido clorídrico p.a às amostras destinadas a pesquisa de microcistina visando à conservação das mesmas. Antes da adição do conservante, alíquotas de 3 mL de cada uma das amostras foram coradas com lugol 1 % e sedimentadas em cubetas de Utermöhl²³ de 3 mL por um período de 24 horas para a contagem de cianobactérias.

Foram analisadas 15 amostras de água em duplicata coletadas mensalmente, no período de janeiro de 2011 a abril de 2012, no Laboratório Central de Saúde Pública de Pernambuco Dr. Milton Bezerra Sobral (LACEN-PE).

Análise de microcistinas

Os métodos de análise utilizados foram o de imunoenensaio enzimático - ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) e o cromatográfico - CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência).

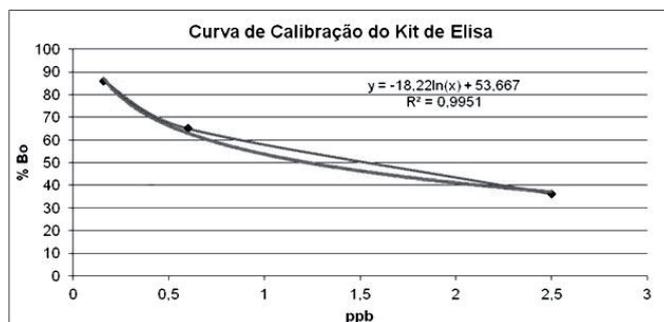


Figura 1. Curva analítica obtida para o kit de Elisa utilizado na quantificação de microcistinas

Fonte: Elaborado pelo autor

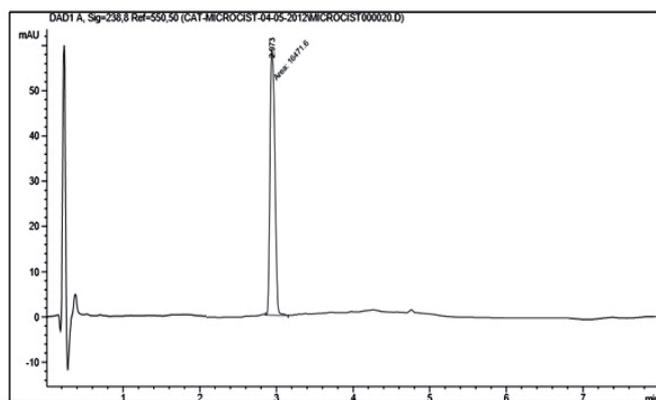


Figura 2. Cromatograma representativo do padrão de microcistina-LR no CLAE

Fonte: Elaborado pelo autor

Preparo das amostras para o ELISA

De cada uma das 15 amostras coletadas no reservatório de Mundaú foram retiradas alíquotas de 15 mL, após homogeneização, e colocadas em vidros de penicilina. Estas amostras tiveram o pH ajustado entre 6,8 e 7,2, foram mantidas sob refrigeração e levadas à Companhia Pernambucana de Saneamento - COMPESA, a fim de serem submetidas à sonicação (processo de rompimento das membranas celulares para fragilização das possíveis células de cianobactérias, e consequente liberação da toxina) no desruptor de células ultrassônico (modelo MA-103, Marconi). Em seguida, as amostras foram filtradas em filtros de fibra de vidro de 0,45 μm e estocadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o dia da análise de microcistina total pelo método ELISA²⁴ através do kit de placa para extração de microcistinas da marca Envirologix® (Portland, EUA) com limite de quantificação de 0,175 $\mu\text{g/L}$ e limite de detecção de 0,147 $\mu\text{g/L}$.

Os resultados obtidos foram analisados espectrofotometricamente a 450 nm, com o auxílio de leitor de ELISA STAT-FAX 2100 (Awareness Technology INC).

Com base nos resultados obtidos para os controles positivos, com o auxílio de um software de análise de dados, foi construída uma curva de calibração. Baseado nesta curva e nos valores obtidos por espectrofotometria para cada amostra foi possível determinar a concentração de microcistina nas amostras.

Preparo das amostras para o CLAE

Amostras de 500 mL coletadas no reservatório de Mundaú foram levadas para a Universidade Federal Rural

de Pernambuco, na Unidade Acadêmica de Garanhuns, a fim de serem liofilizadas, para concentrar a toxina e extrair a microcistina total.

Depois de liofilizadas, as amostras foram submetidas a um processo para extração da microcistina total que consiste na adição de 20 mL de metanol 100 % contendo 0,1 % de ácido trifluoracético (TFA). O material foi transferido para um béquer de vidro de 100 mL e deixado por uma hora no banho de ultrassom a 40 kHz (modelo Q335D, Quimis) para que houvesse o rompimento da membrana celular e a toxina fosse extraída. Em seguida, a amostra foi centrifugada por 10 minutos a 591 g e o sobrenadante guardado. Este mesmo procedimento foi realizado três vezes seguidas. Os sobrenadantes das três extrações, foram colocados em um único béquer, homogeneizado, transferido para um balão de fundo chato com tampa esmerilhada e secado em rotavapor (modelo 803, Fisatom) a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, a 60 rpm até que o metanol evaporasse completamente. Em seguida, o material foi ressuspensionado em 10 mL de metanol a 20 %²⁵.

A extração em fase sólida foi feita utilizando-se o extrator Manifold (modelo Varian, Agilent Technologies). As amostras foram secadas em rotavapor nas mesmas condições anteriores, ressuspensionadas em 1 mL de metanol grau CLAE e filtradas em filtros Millex LCR com membrana de PTFE modificada de 0,45 μm e 13 mm, para então serem injetadas no cromatógrafo. Os extratos concentrados ficaram conservados em freezer a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento da análise cromatográfica²⁵.

A concentração da toxina em cada amostra foi determinada utilizando padrão de microcistina-LR puro na concentração de 0,5 mg (Alexis Corporation-Lauesen, Switzerland). A toxina foi identificada comparando o tempo de retenção do pico extraído com o do padrão de microcistina-LR.

As determinações analíticas de microcistina foram feitas no Laboratório de Processos e Produtos Biotecnológicos da Universidade de Pernambuco empregando um cromatógrafo Agilent série 1200 equipado com um detector de arranjo de diodos. Foi utilizada uma coluna Phenomenex C18 Synergi Fusion (50 mm x 2,0 mm x 2,5 μm) mantida a uma temperatura de $60\text{ }^{\circ}\text{C}$. A fase móvel foi constituída por água ultrapura Milli-Q e acetonitrila grau CLAE ambos contendo 0,1 % de TFA. A acetonitrila foi previamente filtrada em membrana de polipropileno hidrofílica de 0,22 μm . A separação cromatográfica foi feita com uma taxa de fluxo

de 1 mL/minuto, usando um gradiente de eluição que começou com 20 % de acetonitrila, aumentando até 70 % ao fim de 4 minutos, seguido de uma diminuição até os 20 % aos 5 minutos e se mantendo constante até o final dos 7 minutos. O volume injetado foi de 20 μ L. As microcistinas foram detectadas devido a sua capacidade de absorvância aos 238 nm²⁶. As concentrações foram determinadas a partir da comparação do tempo de retenção da amostra com o tempo de retenção do padrão de microcistina-LR previamente injetado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A eutrofização em lagos e reservatórios é um problema que ocorre em todo o mundo, tendo como alguns efeitos adversos, as florações de cianobactérias²⁷. No reservatório de Mundaú, tais circunstâncias foram observadas com a ocorrência de florações durante todo o período de estudo. No ponto de captação do reservatório de Mundaú foram realizadas 15 amostragens em duplicata entre os meses de janeiro de 2011 a abril de 2012, sendo detectada a presença de cianobactérias produtoras de toxinas para todas as datas com quantidades acima de 20.000 cel.mL⁻¹, condição suficiente para que seja recomendada a análise de microcistinas segundo preconizado pela Portaria nº 2914/11 do Ministério da Saúde¹³. O critério utilizado para avaliar os valores máximos permitidos (VMP) para as densidades celulares é o preconizado pela RDC 357/2005, CONAMA²⁸.

A primeira etapa da análise foi a amostragem, cuja qualidade é determinante para um resultado preciso e exato²⁹. Microcistinas podem sofrer degradação caso as amostras não sejam devidamente armazenadas e transportadas, podendo levar a graves erros na determinação da concentração na amostra original. Essa degradação pode ser evitada pela refrigeração das amostras a uma temperatura igual ou inferior a 4 °C ou pela adição de algum conservante ou agente biocida e, segundo Utkilen e Gjolme³⁰, o metanol pode retardar esta degradação³⁰. Portanto, para evitar que houvesse degradação das amostras, o processamento das amostras para o ELISA se deu no mesmo dia em que foram coletadas, uma vez que o solvente final é a própria água. Em seguida, as amostras foram estocadas a -20 °C até o dia da análise. Para a CLAE, as amostras foram congeladas para serem liofilizadas e como o processo de extração é muito longo, este só era interrompido nas etapas em que havia adição de metanol para evitar que

houvesse degradação.

Outro fator importante para ser observado é o ajuste do pH da amostra entre 6,8 e 7,2. O objetivo deste ajuste é evitar que as toxinas não sejam co-extraídas durante a extração em fase sólida. Para este ajuste foi utilizado o ácido clorídrico p.a.

Com relação ao método imunológico, para cada uma das amostras analisadas via CLAE, também foi realizada a quantificação por ELISA. A equação de regressão linear e o coeficiente de determinação (R²) foram calculados a fim de obter a curva analítica para avaliar a eficácia do teste e também quantificar as microcistinas presentes nas amostras de água. Estes resultados são mostrados na Figura 1 e estão diretamente relacionados com a sensibilidade e a linearidade do método.

A curva analítica obtida para a microcistina foi linear, apresentando coeficiente de determinação superior a 0,99. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária recomenda um coeficiente (R) igual ou superior a 0,99³¹ e o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial um valor acima de 0,90³². Este coeficiente de determinação foi satisfatório, o que demonstra que a resposta do método foi linear nos intervalos de concentração empregados neste estudo.

A precisão do teste foi avaliada através dos coeficientes de variação dos resultados obtidos ao nível de repetibilidade, sendo, portanto, feita em curto intervalo de tempo. Apesar dos ensaios terem sido feitos apenas em duplicata, foi observado que os coeficientes de variação variaram de 0,193 a 13,127 % (Tabela 1) entre amostras e controles. Para o estudo da precisão, sabe-se que os intervalos dos coeficientes de variação são considerados adequados até ± 20 % dependendo da complexidade da amostra. Os resultados obtidos neste estudo foram considerados precisos e dentro da faixa aceitável. Porém, para aumentar a precisão, faz-se necessário aumentar o número de réplicas.

Da equação da reta pode-se estimar a sensibilidade da técnica, definida como dy/dx , que apresentou valor de 18,22, sendo, portanto, considerada satisfatória.

A Portaria 2.914/2011¹³ do Ministério da Saúde, estabelece os procedimentos e responsabilidades relativas ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. A portaria exige que os responsáveis pelo controle da qualidade da água de sistemas de abastecimento supridos por mananciais superficiais monitorem as cianobactérias no ponto de captação de água

Tabela 1. Resultado da quantificação das amostras pelo método ELISA

Amostras Coletadas	Média das densidades ópticas	% Desvio Padrão	% Coeficiente de Variação	% Bo	Conc. Microcistina (ppb)
CN	1,463	0,003	0,193	100	NA
CP 0,16 ppb	1,262	0,008	0,672	86	NA
CP 0,60 ppb	0,950	0,054	5,734	65	NA
CP 2,5 ppb	0,520	0,033	6,255	36	NA
Amostra 1	0,818	0,051	6,224	56	0,88
Amostra 2	0,687	0,037	5,459	47	1,45
Amostra 3	0,694	0,074	10,706	47	1,41
Amostra 4	0,707	0,057	8,107	48	1,34
Amostra 5	0,555	0,044	7,899	38	2,37
Amostra 6	0,464	0,032	6,865	32	3,34
Amostra 7	0,492	0,006	1,150	34	3,00
Amostra 8	0,584	0,040	6,907	40	2,13
Amostra 9	0,697	0,033	4,667	48	1,39
Amostra 10	0,556	0,055	9,920	38	2,36
Amostra 11	0,576	0,066	11,427	39	2,20
Amostra 12	0,536	0,042	7,915	37	2,55
Amostra 13	0,610	0,016	2,668	42	1,93
Amostra 14	0,523	0,069	13,127	36	2,68
Amostra 15	0,640	0,044	6,850	44	1,72

CN (controle negativo); CP (controle positivo); NA (não avaliado)

mensalmente, quando o número de células de cianobactérias não exceder 10.000 células.mL⁻¹, e semanalmente, quando o número de células de cianobactérias exceder esse valor. Também exige que sempre que o número de cianobactérias no ponto de captação exceder 20.000 células.mL⁻¹ seja realizada a análise semanal das cianotoxinas. Esta Portaria determina no 5º parágrafo do Artigo 40 que “quando as concentrações de cianotoxinas no manancial forem menores que seus respectivos VPMs para água tratada será dispensada a análise de cianotoxina na saída do tratamento de que trata o Anexo XII a essa

Portaria”. Com exceção da amostra 1, em todas as demais foi detectada a presença de microcistina no ponto de captação do manancial, antes do tratamento, acima do valor máximo permitido, indicando a importância desta análise em águas de abastecimento público. As análises das amostras sedimentadas nas cubetas de Utermöhl, para contagem de cianobactérias apresentaram valores superiores a 1.000.000 cel.mL⁻¹, constituindo um grande indicativo da presença de cianotoxinas neste manancial.

As análises confirmaram a presença da toxina na maioria das amostras e a maior concentração da toxina

determinada foi de $3,34 \mu\text{g.L}^{-1}$ de microcistina-LR, três vezes maior do que o limite máximo permitido pela legislação.

Para a CLAE, a fase de extração das microcistinas é determinante para a análise. Logo, algumas considerações iniciais com relação a esta etapa são necessárias.

Sabe-se que a microcistina-LR é um composto hidrofóbico, e sua concentração em águas superficiais é encontrada em níveis de partes por bilhão ($\mu\text{g.L}^{-1}$) ou ainda menores e, como a determinação direta não pode ser viável devido à sensibilidade inadequada dos métodos de detecção utilizados para os níveis de concentração usualmente encontrados, uma etapa de concentração é normalmente necessária. Essa etapa, além de concentrar os analitos presentes nas amostras, também serve como uma etapa de limpeza ajudando a diminuir a interferência de substâncias que possam ser co-extraídas com os analitos de interesse, podendo assim interferir nas análises, tanto na separação cromatográfica, como na supressão do sinal da toxina³³. Portanto, foi realizada uma extração em fase sólida para concentrar a toxina.

Estudos mostram a importância da escolha dos cartuchos. Trabalhos realizados por Wang et al³⁴ e Mekebre et al³⁵ a fim de avaliar a eficiência de extração de alguns tipos de cartucho mostraram que aqueles que são compostos por uma mistura de C18 e sílica são menos eficientes na recuperação do analito de interesse, quando comparados com os compostos apenas de C18, possuindo uma relação custo-benefício bem melhor. O cartucho de extração utilizado neste trabalho foi um C18 com sílica que é bastante utilizado para esta finalidade, o que pode explicar o fato dos resultados das amostras na CLAE terem sido menos expressivos que os do ELISA.

Rivasseau et al³⁶ avaliaram o efeito de lavagens com diferentes concentrações de metanol em água e observaram que a melhor recuperação se deu utilizando o metanol 20 % pela maior eficiência na remoção de interferentes da amostra. Esta mesma concentração foi utilizada para a limpeza dos cartuchos durante a extração de fase sólida das amostras analisadas neste estudo.

Rivasseau et al³⁶ também fizeram um estudo em cartucho C18 para avaliar três diferentes solventes em relação a recuperação da toxina retida no cartucho e observaram que o metanol acidificado com 0,1 % de TFA foi o que obteve melhor resultado. Para tanto, todas as amostras analisadas no cromatógrafo foram

ressuspensas em metanol acidificado.

Com relação aos índices de recuperação das amostras, em se tratando da quantidade de amostra a ser filtrada e concentrada, Bogiatti et al³⁷ fizeram um estudo com três diferentes volumes de amostras (500 mL, 1 L e 2 L) e concluíram que a amostra com menor volume apresentava um maior índice de recuperação, possivelmente devido a menor concentração de possíveis interferentes na etapa de extração. Logo, o volume da amostra escolhido para ser filtrado neste estudo foi de 500 mL.

A etapa de eluição do cartucho, ou seja, a recuperação do analito depende do tipo de composto a ser analisado e do tipo de cartucho. Em cartuchos que retêm fortemente compostos hidrofóbicos na presença de água, como os do tipo C18, na presença de solventes orgânicos essa força de interação é bem menor, por isso, solventes orgânicos puros, como acetonitrila e metanol, são geralmente empregados. Portanto, estes foram os solventes de escolha para reconstituição das amostras durante a análise³⁷.

Para o método cromatográfico, após terem sido determinadas as condições ideais para a análise de microcistina utilizando uma coluna de ultra eficiência, injetou-se o padrão de microcistina-LR. O comprimento de onda correspondente à absorção máxima do analito em estudo foi de 238 nm. Análises anteriores a este estudo realizadas por nosso grupo utilizando cepas produtoras de microcistinas e também padrão de microcistina-LR da marca Alexis® mostraram que o pico referente à microcistina para coluna Synergi® apresenta um tempo de retenção de aproximadamente 2,9 minutos.

Neste estudo, foi possível detectar a presença de microcistina em 100 % das amostras analisadas, uma vez que no mesmo tempo de retenção do padrão utilizado (aproximadamente aos 2,9 minutos) surgiram em todas as amostras picos quase que idênticos (Figura 2) sendo possível inferir que há presença de microcistina nas amostras analisadas (dados não mostrados).

Na análise cromatográfica não foi possível a quantificação das microcistinas presente nas amostras, sendo feita apenas uma análise qualitativa (presença ou ausência). Vale ressaltar que isto ocorreu possivelmente devido ao uso de um padrão de microcistina que já havia sido utilizado anteriormente em outras análises e não se tinha a concentração exata do mesmo. Sendo assim, quando o padrão foi diluído para construção da curva de calibração não apareceu nenhum pico no cromatograma,

apenas foi identificado o pico referente à microcistina quando foi injetado o padrão na concentração inicial. Logo, não foi possível fazer uma curva de calibração e, por conseguinte, não foi possível quantificar as amostras.

Nesse sentido, faz-se necessária a validação de ambos os métodos utilizando um material de referência certificado contendo concentrações conhecidas de microcistinas, a fim de obter resultados confiáveis para a implementação final das referidas metodologias.

CONCLUSÃO

O estudo mostrou a importância da análise de microcistinas na água de abastecimento público, pois assim como Mundaú, vários mananciais de Pernambuco apresentam florações de cianobactérias. Além disso, permitiu a implementação da análise de microcistina pelos métodos ELISA e CLAE no LACEN-PE, tendo em vista que os resultados das análises indicaram a presença da toxina. Também mostrou sua importância como método complementar à contagem das cianobactérias, fornecendo subsídios às ações preventivas de vigilância à saúde.

Espera-se que este estudo sirva de base para avaliar o uso das metodologias e, dependendo da amostra de água a ser analisada, escolher a metodologia mais apropriada. A ideia central seria utilizar o método ELISA para a água tratada, indústria de injetáveis e clínicas de hemodiálise e a CLAE para a água bruta, uma vez que o ELISA é mais sensível. Isso reduziria os custos das análises para o LACEN-PE, pois o kit empregado no ELISA tem pouco custo-benefício por ser muito caro e analisar um pequeno número de amostras. Já a CLAE é um pouco menos sensível, mas muito específica e é recomendada pela Organização Mundial de Saúde como um dos métodos mais seguros.

Cabe ressaltar que, para a liberação dos resultados dessas análises para a Vigilância Sanitária, os procedimentos analíticos devem ser submetidos à validação estatística, com o objetivo de conhecer suas limitações e confiabilidade dos resultados obtidos para aplicação correta dos métodos de acordo com as amostras que se deseja analisar. Apesar destes métodos já serem validados para a análise de microcistinas em água^{25,26}, como se trata de uma implementação, faz-se necessário uma revalidação antes de serem utilizados como análises de rotina para o monitoramento desta toxina.

AGRADECIMENTOS

À química Tânia Maria de Oliveira da Companhia de Pernambuco de Abastecimento (COMPESA) por ceder o desruptor de células para a sonicação das amostras, ao Prof. Dr. Renato José Reis Molica da Universidade Federal Rural de Pernambuco na Unidade Acadêmica de Garanhuns por ceder o liofilizador para extração das toxinas das amostras, às Vigilâncias Ambiental e Sanitária pelo suporte durante as coletas no reservatório e ao Laboratório Central de Saúde Pública (LACEN-PE) por ceder a estrutura, equipamentos e reagentes necessários à realização deste trabalho.

REFERÊNCIAS

1. Libânio M. Fundamentos de qualidade e tratamento de água. Campinas, São Paulo: Átomo; 2008.
2. Sanches SM, Vieira EM, Prado EL, Beneti F, Takayanagui AMM. Estudo da presença da toxina microcistina - LR em água utilizada em clínica de hemodiálise e validação de um método analítico. *Ecl Quim*.2007;32(4):43-8.
3. Cerione EM, Cavagioni MG, Breir TB, Barrella W, Almeida VP. Levantamento de espécies de algas planctônicas e análise da água do lago do Zoológico Quinzinho de Barros, Sorocaba (SP). *REB*.2008;1(2):18-27.
4. Codd GA, Azevedo SMFO, Bagchi SN, Burch MD, Carmichael WW, Harding WR, Utiklen HC. Cyanonet - A global network for cyanobacterial bloom and toxin risk management. Initial situation assessment and recommendations. IHP-VI Technical Document in Hidrology, n. 76. Unesco, Paris, Working Series SC 2005/WS/55, 2005.
5. Oberholster PJ, Myburghb JG, Govender D, Bengis R, Botha AM et al. Identification of toxigenic *Microcystis* strains after incidents of wild animal mortalities in the Kruger National Park, South Africa. *Ecotoxicol Environm Saf*.2009;72:1177-82.
6. Fernandes VO, Cavati B, Oliveira LB, Souza BDA. Ecologia de cianobactérias: fatores promotores e consequências das florações. *Oecol Bras*.2009;13(2):247-58.
7. Carneiro TG, Leite F. Cianobactérias e suas toxinas. *Rev Analyt*.2008; 32:36-41.
8. Abramsson-Zetterberg LU, Sundh R, Mattsson R. Cyanobacterial extracts and microcystin-LR are inactive in the micronucleus assay in vivo and in vitro. *Mutat Res*.2010;699(1-2):5-10.
9. Nybom SNK, Dziga D, Heikkilä J, Kull T, Salminen SJ, Meriluoto JAO. Characterization of microcystin-LR removal process in the presence of probiotic bacteria. *Toxicon*.2012;59(1):171-81.
10. Carmichael WW. The toxins of cyanobacteria. *Sci Am*.1994;270:78-86.

11. Falconer IR. Tumor promotion and liver injury caused by oral consumption of cyanobacteria. *Environm Toxicol*.1991;6:177-84.
12. Meng G, Sun Y, Fu W, Guo Z, Xu L. Microcystin-LR induces cytoskeleton system reorganization through hyperphosphorylation of tau and HSP27 via PP2A inhibition and subsequent activation of the p38 MAPK signaling pathway in neuroendocrine (PC12) cells. *Toxicology*.2011;290:218-29.
13. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº 2914, de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, 14 dez. 2011. Seção 1. p. 39.
14. Chorus I, Bartram J. *Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management*. World Health Organization. London: E & FN Spon;1999. 416pp.
15. Brasil. Ministério da Saúde. 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, e dá outras providências. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, 26 mar. 2004.
16. Sant'Anna CL, Azevedo MTP, Werner VR, Dogo, CR, Rios FRC. Review of toxic species of Cyanobacteria in Brazil. *Algol Stud*.2008;126:215-65.
17. Molica RJR, Onodera H, Garcia C, Rivas M, Adrendo D, Nascimento S, et al. Toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanophyceae) isolated from Tabocas reservoir in Caruaru, Brazil, including demonstration of a new saxitoxin analogue. *Phycologia*.2002; 41:606-11.
18. Azevedo SMFO. Toxic cyanobacteria and the Caruaru tragedy. IV Simpósio da Sociedade Brasileira de Toxicologia; 1996; p.84.
19. Jochimsen EM, Carmichael WW, An JS, Cardo DW, Cookson ST, Holmes CE, et al. Liver failure and death after exposure to microcystin toxins at a hemodialysis center in Brazil. *N Engl J Med*.1998;13(338):873-78.
20. Chellappa NT, Chellappa SL, Chellappa S. Harmful Phytoplankton Blooms and Fish Mortality in a eutrophicated reservoir of Northeast Brazil. *Braz Arch Biol Technol*.2008;51(4):833-41.
21. Agência Pernambucana de Águas e Clima. Rio Mundaú [Internet]. Recife [acesso em 20 dez.2012]. Disponível em: http://www.apac.pe.gov.br/pagina.php?page_id=5&subpage_id=19
22. Secretaria de Recursos Hídricos de Pernambuco (SRH). Plano Estadual de Recursos Hídricos do Estado de Pernambuco. Documento Síntese, Recife, 2000. 267pp.
23. Utermöhl H. Zur vervollkommener quantitativen phytoplankton methodik. *Mitt Int Ver. Theor Angew Limnol*.1958;5:567-96.
24. Harada K, Kondo F, Lawton L. Laboratory Analysis of Cyanotoxins. In: Chorus I, Bartram J. *Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management*. World Health Organization. London: E & FN Spon;1999. p.362-400.
25. Fastner J, Fliieger I, Neumann U. Optimised extraction of microcystins from field samples - a comparison of different solvents and procedures. *Water Res*.1998;32:3177-81.
26. Lawton LA, Edwards C, Codd GA. Extraction and high-performance liquid chromatographic method for the determination of microcystins in raw and treated waters. *Analyst*.1994;119(7):1525-30.
27. Heo WM, Kim B. The effect of artificial destratification on phytoplankton in a reservoir. *Hydrobiologia*.2004;524:229-39.
28. Brasil. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, 18 mar. 2005. Seção 1. p. 53.
29. Mozaz SR, Alda MJL, Barcelo D. Advantages and limitations of on-line solid phase extraction coupled to liquid chromatography-mass spectrometry technologies versus biosensors for monitoring of emerging contaminants in water. *J Chromatogr A*.2007;1152:97-115.
30. Utkilen H, Gjolme N. Iron-Stimulated Toxin Production in *Microcystis aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol*.1995;61:797-800.
31. Agência Nacional de Vigilância Sanitária; ANVISA. Resolução n. 899, de 29 de maio de 2003. Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, 2 jul. 2003.
32. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. DOQ-CGCRE-008: Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. Rio de Janeiro (RJ): INMETRO; 2011. Revisão 4. 20 p.
33. Msagati TAM, Siame BA, Shushu DD. Evaluation of methods for the isolation, detection and quantification of cyanobacterial hepatotoxins. *Aquat Toxicol*.2006;78:382-97.
34. Wang D, Weston DP, Lydy MJ. Method development for the analysis of organophosphate and pyrethroid insecticides at low parts per trillion levels in water. *Talanta*.2009;78:345-51.
35. Mekebri A, Blondina GJ, Crane DB. Method validation of microcystins in water and tissue by enhanced liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*.2009;1216:3147-55.
36. Rivasseau C, Martins S, Hennion MC. Determination of some physicochemical parameters of microcystins (cyanobacterial toxins) and trace level analysis in environmental samples using liquid chromatography. *J Chromatogr A*.1998;799:155-69.
37. Bogialli S, Bruno M, Curini R, Di Corcia A, Fanali C, Laganà A. Monitoring algal toxins in lake water by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Environ Sci Technol*.2006;40:2917-23.

Incidência de aflatoxinas no amendoim (*Arachis hypogaea* L) cru em casca da região da Alta Paulista-SP, durante o período de 2011 a 2012

Incidence of aflatoxins in the raw peanut (*Arachis hypogaea* L) in shell of Alta Paulista-SP region during the period from 2011 to 2012

RIALA6/1603

Kely Braga IMAMURA¹, Jufner Celestino Vaz TONI¹, Maria Angélica Lopes BOCHE², Davi Abdou de SOUZA³, Juliana Audi GIANNONI³

¹Endereço para correspondência: ¹Instituto de Química – UNESP Araraquara, R Melchiades Nery de Castro, 151 - Centro, CEP. 17400-000, Garça, SP. Tel: (16) 98835-5588. E-mail: kely.imamura@hotmail.com

²Faculdades Adamantinenses Integradas, São Paulo, SP, Brasil

³Faculdade de Tecnologia de Marília – FATEC, Marília, SP, Brasil

Recebido: 02.12.2013 - Aceito para publicação: 30.06.2014

RESUMO

As aflatoxinas são metabólitos secundários produzidos pelas espécies do gênero *Aspergillus* e a frequente ingestão de alimentos contendo teores de aflatoxinas tem sido correlacionada às neoplasias hepáticas pela *International Agency for Research on Cancer* (IARC). Foram analisadas 966 amostras de amendoim cru em casca, coletadas no período de fevereiro a maio, correspondente à época de colheita das safras 2010-2011 e 2011-2012. Para detecção de aflatoxinas foram utilizadas as metodologias de coluna de imunoafinidade acoplada à fluorometria (CIA) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), seguindo-se os parâmetros estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Foram detectadas aflatoxinas acima do limite máximo tolerado pela legislação em 12,6 % e 19,5 % das amostras, respectivamente nas safras de 2011 e 2012. Na safra de 2010-2011, a faixa de contaminação foi de 21-52 µg/kg, e na safra de 2011-2012 a faixa de contaminação variou de 28-260 µg/kg, cujo valor é cinco vezes maior quando comparado ao obtido em 2011. Os maiores índices de contaminação foram encontrados nos períodos com menor índice pluviométrico, tanto em 2011 quanto em 2012. Por conseguinte, a realização de rastreamento é necessária durante toda a cadeia produtiva do amendoim, com a finalidade de propiciar alimentos seguros à saúde humana e animal.

Palavras-chave. *Aspergillus spp.*, micotoxinas, aflatoxicoses, saúde.

ABSTRACT

Aflatoxins are the secondary metabolites produced by the species of *Aspergillus* genus, and the frequent intake of aflatoxin-containing foods has been correlated with the occurrence of hepatic neoplasms by the International Agency for Research on Cancer (IARC). This study analyzed 966 samples of raw peanuts in shell, collected in the period from February to May, corresponding to the harvest seasons of 2010-2011 and 2011-2012. For detecting aflatoxins, immunoaffinity column coupled with fluorometry (CIA) and high performance liquid chromatography (HPLC) methodologies were employed, following the parameters established by the *Agência Nacional de Vigilância Sanitária*. Aflatoxins were detected in amount above the maximum tolerated by the legislation in 12,6 % and 19,5 % of samples, corresponding to 2011 and 2012 harvests, respectively. In the 2010-2011 season the range of contamination was 21-52 µg/kg, and for 2011-2012 crop the range of contamination varied from 28 to 260 µg/kg, being the value five times higher than those observed in 2011. The highest contamination indices were found in periods with lower rainfall in both 2011 and 2012. Therefore, the peanut tracking is required during the entire production chain of this product in order to provide safe food for human and animal health.

Keywords. *Aspergillus spp.*, mycotoxins, aflatoxicosis, health.

INTRODUÇÃO

Os fungos, principalmente dos gêneros *Aspergillus* spp, *Penicillium* spp e *Fusarium* spp são abundantes na natureza, contaminando alimentos frescos, secos e alimentos processados, de origem vegetal e animal como o amendoim, milho, trigo, castanha, amêndoas, frutas secas, arroz, leite e a carne, resultando em grandes prejuízos para a agroindústria e riscos tanto à saúde humana como de animais¹. O estudo das micotoxinas iniciou-se na Inglaterra, em 1960, quando mais de 100.000 perus morreram em curto espaço de tempo, após consumirem ração que possuía em sua constituição torta de amendoim contaminada com aflatoxinas².

Entretanto, de acordo com Romero e Gloria³, a maioria dos fungos capaz de produzir micotoxinas está frequentemente envolvida na contaminação de produtos agrícolas. Os alimentos são susceptíveis à invasão de fungos micotoxigênicos durante os estágios de produção, processamento, transporte e armazenamento, sendo que as micotoxinas são estáveis, permanecem no substrato mesmo após a destruição do fungo⁴, além de serem resistentes aos processos de torrefação e pasteurização.

Os principais fatores que influenciam o crescimento fúngico e a produção de micotoxinas são umidade relativa, temperatura, danos mecânicos, infestações por insetos⁵ e períodos de seca. A presença de aflatoxinas em alimentos tem sido reportada no mundo todo, principalmente em milho, amendoim, cacau e arroz. No Brasil, a maior incidência de contaminação tem sido descrita em milho e amendoim em grãos⁶, alimentos destinados ao consumo humano e animal.

De acordo com Shundo et al⁷, as espécies de *Aspergillus* produtoras de aflatoxinas e a consequente contaminação de grãos e alimentos são frequentes em áreas geográficas com clima quente e úmido, desse modo, o Brasil, por ser um país de clima predominantemente tropical, apresenta condições favoráveis ao desenvolvimento destes fungos.

As aflatoxinas são metabólitos secundários produzidos pelas espécies do gênero *Aspergillus* spp., principalmente *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* e, eventualmente, *Aspergillus nomius*⁸. Esses fungos são contaminantes naturais de produtos agrícolas, pois ocorrem naturalmente em solos e suas micotoxinas podem causar várias doenças no homem e nos animais, constituindo, de acordo com Silva⁹, um fator de risco importante para o carcinoma hepatocelular.

Entre os 18 tipos conhecidos de aflatoxinas, quatro são de interesse médico sanitário e são identificados como aflatoxinas B1, B2, G1 e G2, devido à coloração da fluorescência (“Blue” ou “Green”) emitida quando expostas à luz ultravioleta de ondas longas³. Apesar de apresentarem quimicamente fórmula molecular bastante semelhante, as aflatoxinas do grupo B possuem anel ciclopentenona B1(C₁₇H₁₂O₆) e B2 (C₁₇H₁₄O₆), enquanto as do grupo G, lactona insaturada G1 (C₁₇H₁₂O₇) e G2 (C₁₇H₁₄O₇). De acordo com Oliveira et al⁶, o metabólito B1 é considerado o mais potente hepatocarcinogênico natural.

Devido à biotransformação das aflatoxinas B1 e B2, no organismo de mamíferos que tenham ingerido alimentos contaminados, em M1 e M2, estudos tem demonstrado a presença desta toxina na carne, no leite de bovinos e humanos e em outros produtos lácteos¹⁰.

Após a ingestão, as aflatoxinas são absorvidas no trato gastrointestinal por difusão passiva, alcançam a circulação sistêmica e são distribuídas pelo organismo. No fígado, a aflatoxina sofre ativação oxidativa pelo citocromo P450 sendo convertida para metabólitos como aflatoxicol, aflatoxina Q1, aflatoxina P1, aflatoxina M1 e aflatoxi-;8,9-epoxi¹¹. De acordo com Silva⁹, a ligação da AFB₁-epóxido com o DNA modifica a sua estrutura, inibindo a sua síntese, interferindo na síntese do RNA e na síntese proteica, iniciando assim, lesões hepáticas, mutagênicas, carcinogênicas e teratogênicas, representando um risco à saúde humana e animal.

De acordo com Batina et al¹², a prevenção de contaminação por aflatoxinas é difícil, devido às condições climáticas do Brasil no período da colheita, que não favorecem a secagem dos grãos. O armazenamento em locais úmidos e sem ventilação, bem como o transporte inadequado, favorecem não apenas a contaminação com esporos, mas também o crescimento fúngico nos produtos já contaminados e consequentemente o aumento da contaminação, devido ao aumento do número de micro-organismos toxigênicos. Para tanto, em termos nacionais, a RDC n° 7, de 2011, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, recomenda limites máximos admissíveis de aflatoxinas totais, B1, B2, G1 e G2 em amendoim e seus derivados, de 20,0 µg/kg e o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, adota o limite de 50 µg/kg de aflatoxinas totais para alimento destinado ao consumo animal¹³.

A facilidade e frequência com que as micotoxinas contaminam os produtos agrícolas constituem um

problema de saúde pública com grande impacto econômico para a agroindústria, uma vez que o quadro clínico da aflatoxicose está diretamente relacionado ao grau de contaminação do produto, tempo e quantidade de alimento contaminado ingerido além do estado nutricional do indivíduo. O amendoim na sua forma *in natura* ou industrializada são cada vez mais consumidos pela população, portanto, o nível de aflatoxinas deve ser avaliada para verificar a segurança do produto final ao consumidor. Sendo assim, este estudo, avalia a ocorrência de aflatoxinas totais em amendoim cru na região da Alta Paulista-SP, na época da safra, nos anos de 2011 a 2012. A investigação de aflatoxinas na maior região produtora e industrializadora de amendoim do estado de São Paulo poderão contribuir para elucidar que, passados mais de 50 anos da descoberta das aflatoxinas em amendoim brasileiro, o problema ainda persiste.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta das amostras

A coleta das amostras foi realizada em propriedades agrícolas do estado de São Paulo, na região da Alta Paulista, compreendendo as cidades de Tupã, Bastos, Herculândia, Pompéia, Rancharia, Marília e Queiroz. O período das coletas foi determinado de acordo com a época de colheita da safra, durante o período de fevereiro a maio de 2011 e 2012.

As análises de micotoxinas foram realizadas no Laboratório de Micotoxinas localizado na cidade de Tupã-SP e no Laboratório de Cromatografia localizado na cidade de Marília-SP. Foram analisadas 489 amostras de amendoim cru em casca, no período de colheita da safra de 2010-2011 e 477 amostras de amendoim cru em casca no período de colheita da safra de 2011-2012, todos da marca *Runner*, totalizando 966 amostras para detecção de aflatoxinas totais, de acordo com a Resolução nº 7 de 2011 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária¹³.

Parte experimental

Para as análises de aflatoxinas totais foram utilizados: colunas de imunoafinidade AflaTest-P, VICAM; padrão de calibração VICAM; cubetas de vidro, VICAM; filtro de microfibra com 11 cm de diâmetro, VICAM; funis de haste curta com 7 e 11 cm de diâmetro PYREX; erlenmeyer de 250 mL, LABOR; papel de filtro qualitativo pregueado com 24 cm de diâmetro, VICAM; papel de filtro plissado, LABOR; seringas de vidro de 10

mL, PYREX; suporte de acrílico para seringas, VICAM; metanol grau HPLC; cloreto de sódio p.a. e metanol p.a., SYNTH; solução reveladora AflaTest® P, VICAM e água destilada.

Métodos

Amostragem e preparo das amostras

Assim que os lotes de amendoim foram colhidos no campo, foram direcionados para secadores de amendoim e, em períodos constantes durante as treze horas de secagem, amostras foram coletadas dos secadores e analisadas quanto ao parâmetro umidade. Após o término da secagem dos grãos, 25 kg de amendoim foram retirados dos secadores e amostras representativas de 7 kg foram descascadas, trituradas e homogeneizadas. Para a análise de aflatoxinas, utilizou-se a metodologia com coluna de imunoafinidade (CIA) e leitura em fluorímetro, uma alíquota de 25 g de amendoim triturado foi utilizada.

Extração de Aflotoxinas

A extração procedeu-se conforme recomendação do manual da CIA comercial (Aflatest-P). Adicionou-se às amostras de amendoim 5g de NaCl e 100 mL de solução de metanol:água (80:20, v/v) e agitou-se esta mistura por 1 minuto (175 rpm). O extrato foi filtrado em papel plissado (filtro qualitativo nº 1) e coletado em erlenmeyer.

Purificação e quantificação

Ao extrato bruto (10 mL) foi adicionado 40 mL de água destilada (diluição 1:4), filtrado em filtro de microfibra e 10 mL do extrato diluído foram submetidos à limpeza pela CIA Aflatest-P a um fluxo contínuo de 1-2 gotas por segundo. Em seguida, a coluna foi lavada com 10 mL de água destilada sob o mesmo fluxo (1-2 gotas/seg). A coluna (CIA Aflatest-P) compõe-se de um suporte de fase sólida, que contém anticorpos específicos para a aflatoxinas totais. Assim, a aflatoxina presente no extrato irá ligar-se aos anticorpos da coluna. Em seguida a coluna com a aflatoxina retida é eluída com 1,0 mL de metanol grau HPLC (1-2 gotas/seg) para um tubo de vidro. Uma alíquota de 100 µL de amostra foi adicionada de 100 µL de revelador (solução aquosa de bromo 0,003 %, v/v) e então o conteúdo de aflatoxinas totais foi quantificado por fluorimetria a 360 nm de excitação e 420 nm de emissão, após 60 segundos¹⁴.

A coluna de imunoafinidade Aflatest, acoplada à fluorimetria tem sido adotada como método oficial de primeira escolha (*Official First Action Method*) pela AOAC para determinação de aflatoxina total (≥ 10 ng/g) em milho, amendoim cru e pasta de amendoim¹⁵.

Validação dos resultados pelo método CLAE

Todas as amostras analisadas pelo método de CIA foram analisadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), que se constitui em um dos métodos oficialmente aceitos e validados para determinação de micotoxinas em alimentos, assim como a Cromatografia em Camada Delgada (CCD)¹⁶. A validação intralaboratorial da metodologia CIA, tem demonstrado precisão de parâmetros comparável ao fornecido pelo método de CLAE.

Para a análise de aflatoxinas por CLAE, uma alíquota de 50 g de amendoim triturado foi utilizada. Extraíu-se a toxina utilizando-se metanol p.a e solução de cloreto de potássio a 4 %. A purificação do extrato foi realizada empregando-se solução de sulfato de amônio a 30 % e Celite, seguida por duas partições com clorofórmio, e quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência¹⁷.

Descontaminação do material utilizado para análise de aflatoxina

Todo o resíduo de aflatoxinas resultante da pós-análise (amendoim triturado e amostra filtrada) foi descontaminado com hidróxido de sódio a 20 % e neutralizado com ácido cítrico a 50 %, antes de ser descartado.

Dados de validação das metodologias utilizadas

A análise de aflatoxinas totais para o método de CIA obteve limite de detecção de 0,10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, limite de quantificação de 0,55 $\mu\text{g}/\text{kg}$, e recuperação de 86,5 %, com níveis de concentração de AFs (B1, B2, G1 e G2) de 6,25 $\mu\text{g}/\text{kg}$. O coeficiente de variação foi de 5 % e a curva de calibração apresentou coeficiente de linearidade de 0,9997.

Para o método CLAE, o limite de detecção para aflatoxinas totais foi de 0,10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, limite de quantificação de 0,03 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e faixa de recuperação de 97,05 %, com níveis de concentração de AFs de 4,90 $\mu\text{g}/\text{kg}$. O coeficiente de variação encontrado foi de 5 % e a linearidade de 0,9998.

Dados climáticos

As informações climáticas referentes à temperatura média, precipitação pluviométrica e umidade relativa do período estudado foram fornecidas pelo Centro Integrado de Informações Agrometeorológicas¹⁸.

Análise estatística

Os dados amostrais foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey e Kramer através do programa GRAPHPAD INSTAT (Rutgers University, Camden, New Jersey). Os resultados foram considerados significativos para $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos por CIA e por CLAE foram comparados e não houve diferença de resultados em nenhuma amostra analisada, independente do método utilizado (Tukey, $p > 0,05$). As aflatoxinas apresentam-se fluorescentes sob luz ultravioleta de ondas longas, o que permite sua quantificação em concentrações reduzidas e fornece a fundamentação para quase todos os métodos de detecção e quantificação¹⁹. Assim, os dados são relativos às análises por CIA.

A coluna de imunoafinidade CIA, preparada com anticorpos anti-micotoxinas, destaca-se por proporcionar alta especificidade e recuperação, melhorando os limites de detecção¹⁹. Os valores de LQ obtidos não interferiram no resultado analítico, ambas as amostras apresentaram os mesmos valores de aflatoxinas totais. Assim, os dados são referentes às análises por CIA.

A técnica de cromatografia por afinidade pode ser considerada como inovação na área de metodologia analítica por utilizar componente biológico (anticorpos) como reagente principal da análise¹⁹. A aplicabilidade de análises utilizando colunas de afinidade vem sendo muito utilizada na análise de micotoxinas²⁰.

A Tabela 1 apresenta os níveis de aflatoxinas encontrados no período de 2011 a 2012, época da colheita da safra de 2010-2011 e 2011-2012, respectivamente. Neste período foram analisadas um total de 966 amostras de amendoim cru em casca da marca *Runner* e detectou-se aflatoxinas em 169 amostras.

Estes resultados demonstram que não houve diferença significativa entre as amostras analisadas, nos períodos de colheita em 2011 e 2012 (Tukey, $p > 0,05$), obtendo-se valores de 17,8 % e 17,2 % de amostras

positivas para aflatoxina, respectivamente.

Sabino et al²¹, pesquisaram aflatoxinas no estado de São Paulo. Em 137 amostras de amendoim e produtos de amendoim analisados, 45,3 % das amostras encontraram-se positivas para aflatoxinas e 27 % deste total apresentaram valores acima do limite máximo permitido pela legislação brasileira¹³.

Caldas et al²⁰, ao realizarem um estudo sobre a presença de aflatoxinas em amendoim, derivados de amendoim, milho em grão e castanhas comercializados no Distrito Federal, no período entre 1998 e 2001, relataram a ocorrência de aflatoxinas em todas as classes de alimentos estudadas. Neste período, dentre as 366 amostras, 19,6 % foram positivas para aflatoxinas. Entretanto houve uma maior incidência de contaminação em amostras de amendoim e produtos derivados de amendoim, compreendendo 34,7 % das amostras contaminadas, o amendoim obteve também as maiores concentrações detectadas, 1.706 µg/kg de aflatoxinas totais.

Na safra de 2010-2011, a faixa de contaminação foi de 21-52 µg/kg, sendo o maior valor obtido de 52 µg/kg e na safra de 2011-2012 a faixa de contaminação variou de 28-260 µg/kg, sendo o maior valor obtido de 260 µg/kg, valor este, cinco vezes maior quando comparado ao obtido em 2011. A maior concentração de aflatoxina do amendoim (260 µg/kg), na safra de 2012

pode ter sofrido influência pelo clima seco no mês de março deste ano, quando comparado aos altos índices pluviométricos do ano de 2011.

É possível fazer uma correlação entre o clima seco e a maior concentração de aflatoxina encontrada nos grãos, pois quando há situações de estresse para o micro-organismo, provocado pela queda na temperatura, umidade ou redução de nutrientes, os fungos realizam o metabolismo secundário para economizar energia, e assim a produção de toxina é priorizada como forma de defesa. Estas toxinas são liberadas quando as células microbianas não encontram mais condições de sobrevivência²².

Nos últimos anos, a detecção de toxinas em alimentos, especialmente aflatoxinas, vem apresentando frequências relativamente altas, entretanto, ainda não existem estimativas sobre o grau de exposição da população brasileira pela ingestão de alimentos contaminados. De acordo com análises realizadas por Caldas et al²⁰, no período de julho de 1998 a dezembro de 2001, os produtos derivados de amendoim comercializados no Distrito Federal, apresentaram os maiores índices e os mais altos níveis de contaminação por aflatoxinas. Já em 2004, Zlotowski et al²³, relataram um surto de aflatoxicose aguda em suínos ocorrido

Tabela 1. Ocorrência de aflatoxinas totais (B1, B2, G1 e G2) e a média da umidade dos grãos de amendoim em 2011 e 2012

Período Total de amostras	Amostras Positivas				Amostras ND			
	Nº total de amostras Positivas	> Valor Obtido (ug/kg)	Nº de amostras ≥ 20 ug/kg	Umidade (%)	Nº de amostras < 20 ug/kg	Umidade (%)	Nº de amostras ND	Umidade (%)
2010-2011 489	87 (17,8%)	52	11 (12,6%)	8,8	76 (87,4%)	9,6	402 (82,21%)	9,13
2011-2012 477	82 (17,2%)	260	16 (19,5%)	9,11	66 (80,5%)	9,6	395 (82,8%)	8,00

Fonte: Dados dos autores, 2013

*O limite de detecção para este método é de 0,10 µg/kg; Limite de quantificação é de 0,55 µg/kg; Recuperação de 86,5 %; Coeficiente de variação é de 5%; Coeficiente de Linearidade é de 0,9997. Os resultados encontrados abaixo deste valor foram interpretados como "Não Detectado" (ND)

*Limite máximo aceitável (LMT) pela legislação brasileira 20 µg/kg (Brasil, 2011)

no estado do Rio Grande do Sul, a partir de análises realizadas detectou-se que a alimentação fornecida aos animais continha altas concentrações de aflatoxinas.

Estima-se que aproximadamente 35 % dos casos de câncer humano estejam diretamente relacionados ao consumo de alimentos, em média 10 % destes casos estão relacionados com a ingestão de toxinas²⁴. Assim, entende-se que a presença de aflatoxinas em alimentos é considerada um fator de risco, relacionados à indução de neoplasia hepática, principalmente em países tropicais²⁵.

De acordo com o *International Agency for Research on Cancer* (IARC)²⁶, a neoplasia hepática tem sido correlacionada à ingestão de alimentos contendo níveis altos de aflatoxinas por períodos frequentes. Segundo dados apresentados por Wogan²⁷, o efeito da toxicidade crônica das aflatoxinas pode ocorrer em diferentes espécies, incluindo peixes, aves, roedores, carnívoros e primatas. Embora o fígado seja o alvo primário, o desenvolvimento de tumores em outros órgãos, como pâncreas e intestino, tem sido observado em animais alimentados com rações contendo aflatoxinas.

Dentre as 489 amostras de amendoim analisadas, na safra de 2010-2011, quantidades superiores ao limite estabelecido pela legislação (20 µg/kg) foram detectadas em 11 (12,6 %) amostras e, na safra de 2011-2012, estes valores foram maiores, obteve-se 16 (19,5 %) amostras acima do valor aceitável pela legislação¹³. A média da umidade obtida entre a safra de 2011 e 2012 foi de 8,8 % e 9,11 %, respectivamente, não apresentando diferença significativa (Tukey, $p > 0,05$), como mostra a Tabela 1.

Resultados semelhantes foram obtidos por Shundo e Silva²⁸, ao investigarem a presença de aflatoxinas em produtos de amendoim e seus derivados na cidade de Marília-SP. Um total de 57 amostras foram coletadas de março a outubro de 1999, os resultados apresentados indicaram que 71,9 % das amostras estavam contaminadas e 47,9 % excederam as concentrações estabelecidas pela legislação brasileira¹³. Mallmann et al²⁹, ao estudarem o nível de contaminação por aflatoxinas em produtos à base de amendoim no estado do Rio Grande do Sul, revelaram que das 664 amostras avaliadas, no período de março de 2000 a abril de 2002, foram positivas para aflatoxinas 208 amostras, e deste total, 98 apresentaram níveis de contaminação superiores a 20 µg/kg.

O número de amostras que apresentaram níveis detectáveis de aflatoxinas em concentrações inferiores a 20 µg/kg, foi maior na safra de 2011 (87,4%) quando comparada à safra de 2012 (80,5 %). Estes resultados

demonstram que houve detecção de toxina nos grãos, mesmo que em quantidades pequenas como 2 µg/kg, evidenciando que em condições favoráveis, as espécies de *Aspergillus* podem produzir aflatoxinas em produtos agropecuários.

A presença de aflatoxinas em concentrações inferiores a 20 µg/kg não caracteriza toxicidade, mas a frequente e prolongada ingestão de alimentos com baixas concentrações de aflatoxinas, pode induzir à produção de células cancerígenas³⁰. Não houve diferença entre os valores de umidade da amostra, conforme indica a Tabela 1.

De acordo com Kawashima³¹, o alimento mais citado como contaminado por aflatoxinas e com maiores concentrações é o amendoim e seus produtos. Os níveis de aflatoxinas detectadas estão diretamente relacionados com as condições climáticas. A umidade do solo favorece o desenvolvimento do fungo; assim como os períodos de seca podem favorecer o estresse metabólico do *Aspergillus* ssp e a produção de toxina pelo seu metabolismo secundário, os danos aos grãos provocados por insetos facilitam a entrada dos fungos à planta³², sendo assim é provável que o crescimento fúngico e a contaminação por aflatoxinas sejam consequência da interação entre fungos, hospedeiro e ambiente⁸.

Shundo et al³³ ao analisarem 87 amostras de amendoim e produtos de amendoim na região de Marília-SP no período de 1999 a 2001, detectaram aflatoxinas em 64,4 % das amostras e 39,1 % excederam os limites da legislação em vigor de 20 µg/kg¹³.

Na safra de 2010-2011, não foram detectadas amostras positivas para aflatoxinas em 82,2 % das amostras analisadas e na safra de 2011-2012 não houve detecção de contaminação em 82,8 % das amostras, de acordo com dados apresentados na tabela 1 (Tukey, $p > 0,05$). Os resultados encontrados no presente estudo assemelham-se aos encontrados por Gloria et al³⁴ ao analisarem produtos derivados de amendoim comercializados na cidade de Piracicaba-SP, não constatando contaminação em 75 % das 297 amostras analisadas.

O fungo filamentososo da espécie *Aspergillus* está distribuído em toda cadeia produtiva do amendoim. Seu habitat natural é o solo, local onde os grãos de amendoim são plantados, sendo assim, a presença de fungos produtores de aflatoxinas nos grãos é difícil de ser controlada³⁵. Então é necessária a detecção de amostras positivas para aflatoxinas antes que o amendoim seja destinado à alimentação humana e animal para que haja

diminuição dos riscos à saúde da população.

De acordo com a patogenicidade das toxinas em humanos e animais, pesquisadores vêm tentando estudar novos métodos para diminuir os níveis de aflatoxinas nos grãos. Baseado no princípio de adsorção da toxina pela parede celular de leveduras e outros fungos filamentosos, Paster et al³⁶, utilizaram micro-organismos não patogênicos e não produtores de toxinas, para testar a capacidade de adsorção destes organismos. Então, conduziram um estudo com diferentes espécies de micro-organismos, competindo com fungos produtores de toxinas em silos herméticos. Verificaram que as leveduras conseguiram competir com a microbiota existente quando inoculadas três dias antes dos fungos toxigênicos, houve também redução na produção de aflatoxinas e inibição do crescimento de *Aspergillus flavus*.

Estão demonstrados na Tabela 2, o número total de amostras positivas para aflatoxina de acordo com os meses de colheita na safra 2010-2011 e 2011-2012.

No ano de 2011, os índices pluviométricos nos meses de março a abril que correspondem ao maior período de colheita da safra, indicou chuva intensa principalmente no mês de março com um decréscimo do índice no mês de abril (Tabela 3). Já no ano de 2012, ocorreu o inverso, no mês de março quase não choveu e no mês de abril os índices pluviométricos foram

elevadíssimos. De acordo com a Tabela 2, percebe-se que os maiores índices de contaminação por aflatoxina estão indicados no mês de abril de 2011 (66 amostras positivas para aflatoxina) e no mês de março de 2012 (46 amostras positivas para aflatoxina). Assim é possível verificar que houve maior contaminação (Tabela 2) nos períodos com menor índice pluviométrico, conforme o indicado na Tabela 3.

Estes resultados estão diretamente relacionados com o fato de que os altos níveis pluviométricos e temperatura favorável aumentam a probabilidade do desenvolvimento do fungo *Aspergillus* aumentando a possibilidade de contaminação dos grãos no solo. Entretanto é no período de baixa umidade, ocasionada pelos menores índices pluviométricos em que há liberação da toxina pelo fungo e consequentemente a contaminação dos grãos³⁷.

Prado et al⁴, observaram que 40-80 % das colheitas podem ser contaminadas com aflatoxinas quando as chuvas são intensas na época de colheita. Em 2000, Orsi et al³⁸ consideraram a umidade como fator determinante na produção de fumonisina em grãos de milho por fungos do gênero *Fusarium* spp., resultados estes, que diferem dos apresentados no presente estudo, por não encontrar maior contaminação por toxinas em períodos chuvosos.

Tabela 2. Número total de amostras positivas, segundo o mês de análise em 2011 e 2012 quanto aos parâmetros de contaminação por aflatoxinas totais dos grãos de amendoim

Mês	2010-2011		2011-2012	
	Nº total de amostras	Nº de amostras	Nº total de amostras	Nº de amostras
	Positivas	> 20 µg/kg	Positivas	> 20µg/kg
Fev.	01	-	01	-
Mar.	20	03	46	09
Abr.	66	08	31	05
Mai	-	-	02	02

Fonte: Dados dos autores, 2013

*O limite de detecção para este método é de 0,10 µg/kg; Limite de quantificação é de 0,55 µg/kg; Recuperação de 86,5%; Coeficiente de variação é de 5%; Coeficiente de Linearidade é de 0,9997. Os resultados encontrados abaixo deste valor foram interpretados como "Não Detectado" (ND)

*Limite máximo aceitável (LMT) pela legislação brasileira 20 µg/kg (Brasil, 2011)

Fonseca et al³⁹, relataram o resultado da análise de aflatoxinas em 1.115 amostras de amendoim in natura proveniente de diversas regiões do estado de São Paulo, demonstrando que há uma alteração na qualidade do amendoim, devido às variações climáticas entre os anos, considerando os períodos de seca na época da colheita dos grãos.

O fator umidade está diretamente relacionado com o índice pluviométrico e temperatura na época da safra, assim como as práticas pós-colheita dos grãos de

a produção de toxinas como forma de defesa. Desse modo, há necessidade que o controle de aflatoxinas em produtos agropecuários ocorra tanto em épocas com altos índices pluviométricos quanto em épocas com baixos índices pluviométricos, e durante toda a cadeia produtiva do amendoim, com o intuito de diminuir os níveis de contaminação encontrados nos grãos de amendoim principalmente no estado de São Paulo, reduzindo a exposição da população a estas toxinas.

Em relação à comparação dos resultados

Tabela 3. Parâmetros de temperatura média e índice pluviométrico de 2011 e 2012, na região Alta Paulista-SP

Período Colheita	Temperatura (°C)				Índice pluviométrico (mm)			
	Fev.	Mar.	Abr.	Mai	Fev.	Mar.	Abr.	Mai
2011	28	29	27	27	153,1	208,6	125,0	20,8
2012	29	28	26	26	184,6	64,2	143,7	36,7

Fonte: Centro Integrado de Informações Agrometeorológicas¹⁸

amendoim, incluindo local, tempo, secagem dos grãos e condições de armazenamento. Sendo assim, a secagem dos grãos antes que eles caiam nesta faixa de umidade é imprescindível para que se diminuam os níveis de contaminação.

No Brasil, apesar da legislação em vigor, a ocorrência de aflatoxinas tem sido observada com frequência, e em altos níveis, principalmente no estado de São Paulo, em alimentos utilizados para consumo humano e animal, tais como, milho, amendoim e derivados⁴⁰.

CONCLUSÃO

A contaminação de amendoim e derivados por toxinas apresenta grande relevância em saúde pública, pois as aflatoxinas podem ser responsáveis pela indução de patologias, como a neoplasia, mutagênese, e imunossupressão em humanos e animais.

No Brasil as condições climáticas na época da colheita favorecem tanto o desenvolvimento de fungos toxigênicos quanto a produção de aflatoxinas por estes fungos. Assim, é possível fazer uma correlação entre o clima seco e a maior concentração de aflatoxinas encontrada nos grãos de amendoim, neste estudo ($p < 0,001$). O clima seco favorece o metabolismo secundário de fungos do gênero *Aspergillus*, priorizando

obtidos por CIA e por CLAE, não houve diferença de resultados em nenhuma amostra analisada, independente do método utilizado. A metodologia CIA, vem sendo amplamente difundida em análises de micotoxinas como aflatoxinas, ocratoxinas, fumonisina em amostras de amendoim, milho, café, arroz, aveia e entre outras.

REFERÊNCIAS

1. Lopes STA, Franciscato C. Avaliação dos minerais séricos e da função hepática de frangos de corte experimentalmente intoxicados com aflatoxina e submetidos a diferentes concentrações de montmorilonita sódica na dieta [dissertação de mestrado] - Santa Maria (RS): Universidade Federal de Santa Maria; 2006.
2. Almeida AVAF, Botura MB, Abreu RD, Bittencourt TCC, Batatinha MJM. Ocorrência de Aflatoxinas em milho destinado à alimentação de aves no Estado da Bahia. *Arq Inst Biol*.2009;76(3):353-8.
3. Romero ACE, Gloria EM. Mensuração de biomarcador de exposição às eflatoxinas em fluidos biológicos [dissertação de mestrado]. Piracicaba (SP): Universidade de São Paulo; 2007.
4. Prado G, Oliveira MS, Gazzinelli-Madeira JEC, Godoy JI, Corrêa B, Junqueira RG et al. Resistência de quatro genótipos de amendoim à produção de aflatoxina B₁ após inoculação com *Aspergillus flavus*. *Ciênc Tecnol Aliment*.1999;19(1):84-7.

5. Prado G, Carvalho EP, Oliveira MS, Gazzinelli JECM, Moraes VD, Corrêa RF et al. Influência da irradiação gama (60°C) na destruição da aflatoxina B₁ em amendoim (*Arachis hypogaea* L.). *Rev Inst Adolfo Lutz*.2005;64(2):186-92.
6. Oliveira CAF, Gonçalves NB, Rosim E, Fernandes AM. Determination of aflatoxins in peanut products in the northeast region of São Paulo, Brazil. *Int J Mol Sci*.2009;10:174-83.
7. Shundo L, Navas AS, Ruvieri V, Alaburda J, Lamardo LCA, Sabino M. Aflatoxinas em amendoim: melhoria da qualidade e programas de controle. *Rev Inst Adolfo Lutz*.2010;69(4):567-70.
8. Ferreira H, Pittner E, Sanches HF, Monteiro MC. Aflatoxinas: Um risco a saúde humana e animal. *Ambiência*. 2006;2(1):113-27.
9. Silva RA. Avaliação do quadro de estresse metabólico em ratos Wistar expostos à aflatoxina B₁. *Rev Inst Adolfo Lutz*.2007;6(3):311.
10. Martins JLS, Martins IS. Aflatoxina M₁ no leite tipo “B” comercializado no Município de São Paulo, SP (Brasil). *Rev Saúde Pública*.1986;20:303-8.
11. Rosmaninho JF, Oliveira CAF, Bittencourt ABE. Efeitos das micotoxicoses crônicas na produção avícola. *Arq Inst Biol*.2001;68(2):107-14.
12. Batina PN, Lopes STA, Santurio JM, Souza C, Martins DB. Efeitos da adição de montmorilonita sódica na dieta sobre o perfil bioquímico de frangos de corte intoxicados com aflatoxina. *Ciênc Rural*.2005;35(4):826-31.
13. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução – RDC n° 7 de 18 de fevereiro de 2011 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Aprova o Regulamento Técnico sobre limites máximos de aflatoxinas, amendoim e seus derivados, especiarias, castanha-do-Brasil e milho. *Diário Oficial [da] União, Brasília, DF*, 21 de agosto de 2006, em reunião realizada em 15 de fevereiro de 2011.
14. Akiyama H, Goda Y, Tanaka T, Toyoda M. Determination of aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ in spices using multifunctional column clean-up. *J Chromatogr A*.2001;932(1):153-7.
15. Bradburn N, Coker RD. A comparative study of solvent extraction efficiency and the performance of immunoaffinity and solid phase columns on the determination of aflatoxin B₁. *Food Chem*.1995;52(1):179-85.
16. Kolosova AY, Shim W, Yang Z, Eremin SA, Chung D. Direct competitive ELISA based on a monoclonal antibody for detection of aflatoxin B₁. Stabilization of ELISA kit components and application to grain samples. *Anal Bioanal Chem*.2006;384(1):286-94.
17. Calori-Domingues MA, Rechdan RC, Moretti A, Gloria EM, Zambel IV. Avaliação de procedimentos de preparo de amostra de amendoim in natura para análise de aflatoxinas. *Quim Nova*.2010;33(7):1490-5.
18. Centro Integrado de Informações Agrometeorológicas (CIIAGRO). [acesso em 28 de setembro de 2013] Disponível em: [http:// www. ciagro.sp.gov.br].
19. Jurado LA, Jarret HW. In flow activation of diol-silica with cyanogen bromide and triethylamine for preparing high-performance affinity chromatographic columns. *J Chromatogr A*.2003;984(1):9-17.
20. Caldas ED, Silva SC, Oliveira NO. Aflatoxinas e ocratoxinas A em alimentos e riscos para a saúde humana. *Rev Saúde Pública*.2002;36(3):319-23.
21. Sabino M, Milanez TV, Lamardo LCA. Ocorrência de aflatoxinas em amendoim e produtos contendo amendoim consumidos no Estado de São Paulo/Brasil no período 1995-1997. *Rev Microbiol*.1999;1:85-8.
22. Calvo AM, Wilson RA, Bok JW, Keller NP. Relationship between secondary metabolism and fungal development. *Microbiol Mol Biol Rev*.2002;66(3):447-59.
23. Zlotowski P, Corrêa AMR, Rozza DB, Driemeier D, Mallmann CA, Migliavacca FA. Surto de aflatoxicose em suínos no estado do Rio Grande do Sul. *Pesq Vet Bras*.2004;24(4):207-10.
24. World Health Organization - WHO. Safety evaluation of certain food additives and contaminants. Geneva: WHO, 2006.
25. Lopes PRS, Neto JR, Mallmann CA, Lazzari R, Pedron FA, Veiverberg CA. Crescimento e alterações no fígado e na carcaça de alevinos de jundiá alimentados com dietas com aflatoxinas. *Pesq Agropec Bras*.2005;40(10):1029-34.
26. International Agency for 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, International Agency for Research on Cancer. 1993;56:254-395.
27. Wogan GN. Aflatoxin carcinogenesis: interspecies potency differences and relevance for human risk assessment. *Prog Clin Biol Res*.1992;374(1):123-37.
28. Shundo L, Silva RA. Occurrence of aflatoxins in peanut and peanut products in the region of Marília (SP) Brazil. *In: Official Program and Abstract Book of the 10th International IUPAC Symposium on Mycotoxin and Phycotoxin*; 2000; São Paulo. p.133.
29. Mallmann CA, Kowalski CH, Almeida CA, Mürmann L, Silveira VG. Prevalência de aflatoxinas em amendoim e seus derivados destinados ao consumo humano no Estado do Rio Grande do Sul. *In: Anais 2º Simpósio em Ciência de Alimentos*, 2003.
30. Schneider EM, Mostardeiro CP. Aflatoxinas em amendoim e toxicidade no organismo humano. *Rev Contexto Saúde*.2007;7(13):47-52.
31. Kawashima LM. Micotoxinas em alimentos e bebidas nacionais produzidos e comercializados em diferentes regiões do Brasil [dissertação de mestrado]. Campinas (SP): Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP; 2004.
32. Moss MO. Economic Importance of Mycotoxins-Recent Incidence. *Int Biodeterior Biodegr*.1991;27(1):195-204.
33. Shundo L, Silva RA, Sabino M. Ocorrência de Aflatoxinas em amendoim e produtos de amendoim comercializados na região de Marília-SP, Brasil no período de 1999-2001. *Rev Inst Adolfo Lutz*.2003;62(3):177-81.
34. Gloria EM, Romero AC, Carvalho APP, Calori-Domingues MA, Gonçalves PVM. Perfil da contaminação com aflatoxinas entre embalagens de produtos de amendoim. *Ciênc Tecnol Aliment*.2006;26(2):660-5.
35. Queiroz MSR, Narain N, Freire RMM, Farias SR, Santos RC. Determinação de aflatoxinas em sementes de amendoim armazenadas em condições ambiente e em câmara fria. *Rev Bras OL Fibras*. 2006;10(1/2):1009-15.
36. Paster N, Droby S, Chalutz E, Menasherov M, Nitzan R, Wilson CL. Evaluation of the potential of the yeast *Pichia guilliermondii* as a biocontrol agent against *Aspergillus flavus* and fungi of stored soya beans. *Mycol Res*.1993;97(1):1201-6.

37. Eizendeher LB, Freitas RJS, Caçado RA. Incidência de aflatoxinas B1, B2, G1 e G2 em doces de amendoim e amendoim in natura comercializados no Estado do Paraná. *Hig Alim*.2005;19(129):101-4.
38. Orsi RB, Correa B, Possi CR, Schammas EA, Nogueira JR, Dias SMC, et al. Mycoflora and occurrence of fumonisins in freshly harvested and stored hybrid maize. *J Stor Prod Res*.2000;36(1):75-87.
39. Fonseca H, Calori-Domingues MA, Gloria EM, Zambello IV, Segatti-Piedade F. Ocorrência de amendoim contaminado no Estado de São Paulo nos anos de 1990 a 1996. *In: Encontro Nacional de Micotoxinas*; Setembro de 1998; Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina.
40. Silva RA, Chalfoun SM, Silva MAM, Pereira MC. Inquérito sobre o consumo de alimentos possíveis de contaminação por micotoxinas na ingesta alimentar de escolares da cidade de Lavras, MG. *Ciênc Agrotec*.2007;31(2):439-47.

Physicochemical and sensory characteristics of *diet* and regular biscuits prepared with yacon (*Smallanthus sonchifolius*)

Características físico-químicas e sensoriais de biscoitos diet e comuns preparados com yacon (*Smallanthus sonchifolius*)

RIALA6/1604

Raianny da SILVA¹, Larissa Scarparo ROCHA¹, Erika Madeira Moreira da SILVA^{2*}

* Corresponding address: ²Departamento de Educação Integrada em Saúde, Centro de Ciências da Saúde Universidade Federal do Espírito Santo - UFES, Avenida Marechal Campos, 1468, Maruípe, Vitória, Espírito Santo, Brasil. CEP: 29040-090. Tel: 27 99853-6476. E-mail: erika.alimentos@gmail.com

¹Universidade Federal do Espírito Santo – UFES, Centro de Ciências Agrárias Alegre, Espírito Santo, Brasil.

Recebido: 14.02.2014 - Aceito para publicação: 24.05.2014

ABSTRACT

Diet and regular biscuits were prepared using fresh yacon (*in natura*), besides those including 20 % and 40 % of yacon flour. The physical, chemical and sensory characteristics of these biscuits were evaluated. The addition of sugar in the biscuits made from yacon flour (20 % and 40 %) increased the diameter values. The addition of sweetener (replacing the sugar) in biscuits made from fresh yacon increased the specific volume value. Regarding to the physical characteristics, no significant differences were evidenced among the formulated biscuits and their respective controls. In relation to the sensory analysis, biscuits made from fresh yacon presented acceptable means, as well as the biscuits made from 20 % yacon flour (with sugar or sweetener). No significant differences were found between the sugar-added biscuits and the sweetener-added cookies, except for those made from 40 % yacon flour and containing sugar, which did not show good acceptability, and neither for purchase intention. Biscuits prepared with yacon flour showed significantly high fiber contents, being considered as fiber-rich and low-calorie products. This investigation evidenced that biscuits made from fresh yacon are an excellent option for easy homemade preparations.

Keywords. bakery products, dietary fiber, prebiotics.

RESUMO

Biscoitos convencionais e do tipo *diet* foram elaborados utilizando-se yacon fresco (*in natura*), além da adição de 20 % e 40 % de sua farinha. Os biscoitos foram avaliados quanto às características físicas, químicas e sensoriais. A adição de açúcar nos biscoitos elaborados com farinha de yacon (20 % e 40 %) provocou aumento nos valores de diâmetro. A substituição de açúcar por adoçante, nos biscoitos elaborados com yacon fresco, favoreceu o aumento do volume específico. Não foram evidenciadas diferenças significativas nas características físicas entre os biscoitos formulados e os respectivos controles. Em relação à análise sensorial, os biscoitos elaborados com yacon fresco apresentaram médias aceitáveis, bem como os biscoitos preparados com 20 % de farinha de yacon (*diet* e convencional). Não houve diferenças significativas entre os biscoitos elaborados com açúcar ou com adoçante, exceto para aqueles preparados com 40 % de farinha de yacon (com açúcar), que não demonstraram boa aceitabilidade, tampouco quanto à intenção de compra. Os biscoitos preparados com farinha de yacon apresentaram maior conteúdo de fibra. Portanto, estes são produtos ricos em fibras e de baixa caloria. É importante ressaltar que os biscoitos elaborados com yacon fresco são excelente opção para serem reproduzidos em preparações caseiras.

Palavras-chave. panificados, fibra alimentar, prebióticos.

INTRODUCTION

Demand for health-oriented bakery products with low sugar and high fiber contents is increasing. Incorporating dietary fiber and replacing sugar in biscuit dough tends to require some care¹. Biscuits are consumed daily by the majority of the population², especially by the teenagers³ and, for years, the food industry has focused on increasing the nutritional value of these products. Enhancing the dietary fiber and replacing sugar of baked products is challenging, and to this day such products are not widely accepted by the consumers. As new sources of fiber become available, and consumers are moving towards healthier diets, research on the use of fiber as functional ingredient in baking is becoming more extensive². Obviously, this food cannot be faced as a unique solution to promote health as it only works in support of it.

Among the compounds with functional features, it can be pointed out that soluble fibers like those contained in yacon roots, are important compounds for health care. Among these fructooligosaccharides (FOS)⁴ and inulin can be found which can be classified as prebiotics, once they are either hydrolyzed or absorbed in the upper digestive tract; they can be fermented by bacteria in the colon and positively change the colonic microbiota^{5,6}.

Yacon roots are a promising source of inulin type fructans (35 g/100 g dry matter) with a total amount of dietary fiber of about 45 g/100 g dry matter⁷. Scientific evidences show yacon as an inulin and especially fructooligosaccharides source (FOS)^{8,9,10}, reducing the risk cancer, and having a hypocholesterolemic effect; improving the gastrointestinal transit, the immune response¹¹, minerals absorption, and being related to vitamin synthesis^{4,12}. In order to obtain yacon flour, more specific processing techniques are required, such as drying and the use of antioxidants to avoid the raw material browning. By using yacon flour in food, with the reduction of water (about 80-90 % of the total mass), there was a significant increase of the other compounds such as total fiber.

From a technical point of view, not only the inulin but also the FOS are used as total/partial sugar substitutes or as additional ingredients in low-calory or enriched ones products, with satisfying features¹³. However, in order to get the inulin or FOS, it would be necessary

to process the source raw materials in order to extract them, which may financially overtax the final product. Additionally, yacon roots present about 38 % of FOS and 26 % of inulin in the fresh pulp¹⁴ and its use can be easily reproduced in homemade preparation techniques.

Studies based on the development of new products containing yacon are still scarce. Yacon-added bakery products such as loaf¹⁵ and cakes¹⁶ presented good acceptability, not differing (sensory) from products produced without this tuber. The same was evidenced when this raw material was added to processed orange juices¹⁷.

In this way, this turns out to be a substitute food and therefore, due to the growing population concern about health and physiological effects of the soluble fiber, and new product developments like biscuits containing functional compounds, this is a promising food source carrying health benefits. The aim of this study was to evaluate the physical, chemical and sensory characteristics of diet and regular biscuits using fresh yacon (fresh roots) and its flour.

MATERIAL AND METHODS

Material

Fresh yacon (*Smallanthus sonchifolia* Poepp. Endl) was acquired at the CEASA (Central de Abastecimento) in Cariacica (Espírito Santo, Brazil). Tubers were washed and sanitized in a sodium hypochlorite solution at 200 ppm for 15 minutes. They were peeled with a potato peeler and processed according to their use. The other ingredients, such as margarine, corn starch, milk, sugar/sweetener (sodium cyclamate and saccharine proper to oven) and rice starch were acquired in the local market (Alegre, Espírito Santo, Brazil).

Yacon flour process

In order to obtain the yacon flour, some preliminary tests were carried out according to Figure 1. The tests were conducted in order to avoid the enzymatic browning that is expected during the drying process of fruits and vegetables. In this way, different treatments were applied, considering different ways of yacon processing^{18,19}.

For the first treatment, yacon was cooked with the peel (for 2 minutes), which was removed by friction and then submerged in distilled water (± 5 °C) to

complete the blanching process. Afterwards, it was cut into slices (chips) by using stainless steel knives. For the second treatment thermic shock was applied (blanching) in order to avoid enzymatic activity. After, the yacon was cut into slices. For the third treatment, yacon was only peeled and sliced.

In all the treatments half of the tubers were placed in a 1 % citric acid solution and the rest in a 0.5 % citric acid and 0.5 % ascorbic acid solution for 20 seconds. Later on, they were drained and put in a tray dryer with air circulation at 60 °C during 24 hours and grinded in a blender in order to obtain the flour. Next, they were packed in vacuum sealed plastic bags, properly labeled and kept in a dry and airy place. The flour yield was calculated by the following formula: % R = (flour weight x 100)/pulp weight.

Preliminary tests (biscuits formulation)

For the formulations containing fresh yacon, the maximum yacon quantity was used, totaling 800 g for a whole recipe which resulted in 200 biscuits ± 3g each. For biscuits made with yacon flour, a 20 % and 40 % substitution in relation with corn and rice starch respectively was proposed. Higher proportions of yacon would significantly affect the sensory qualities due to the higher higroscopicity of this tuber. By the preliminary tests, the mixture of corn and rice starches resulted in more aerated and soft biscuits. Corn starch, given its characteristics, is capable of start the retrogradation process faster when compared with rice starch, yielding biscuits with a harder texture. All the experiments were done using sugar and sweetener (sodium cyclamate and saccharine proper to oven). The tests were carried out using the formulations showed in Table 1.

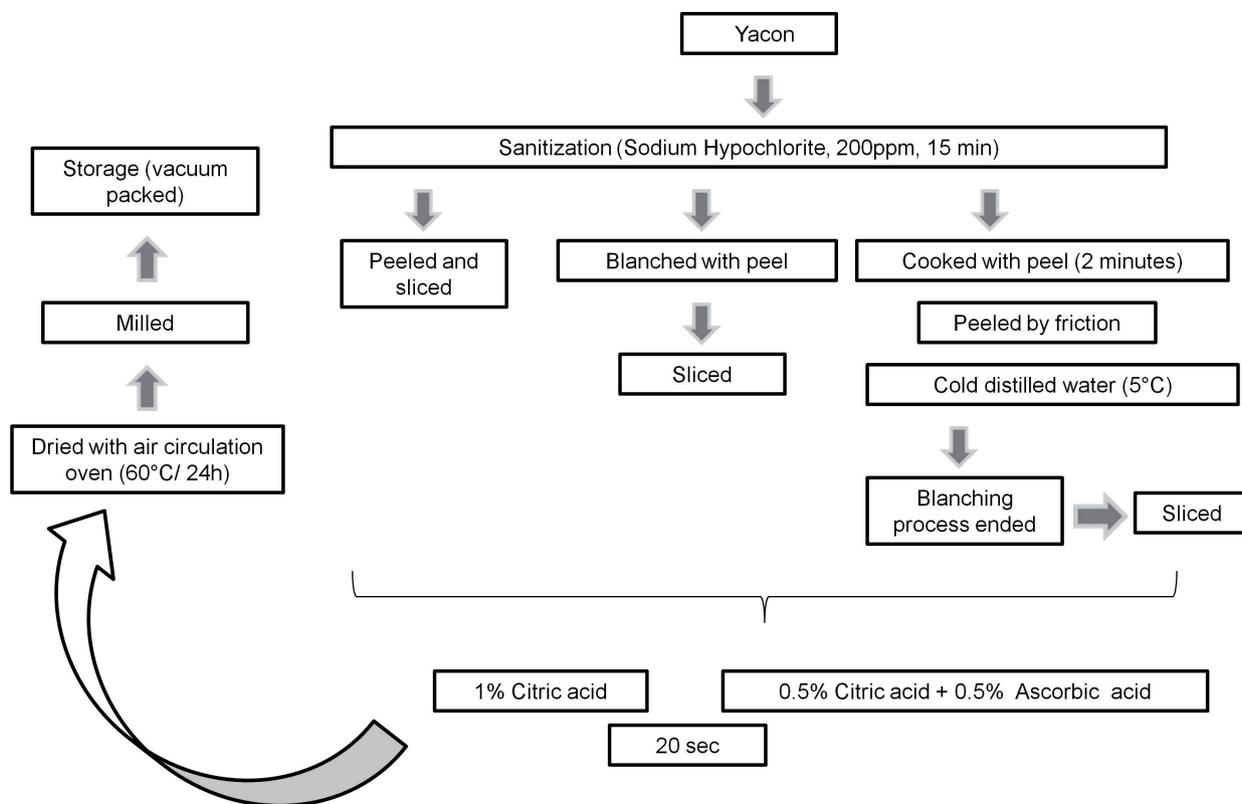


Figure 1. Yacon flour processing

Table 1. Ingredients used in the formulation of yacon biscuits and their controls

Ingredients (g)	**CBsg	CBsw	YBsw	YBsg	BF _{20sg}	BF _{20sw}	BF _{40sg}	BF _{40sw}
Fresh Yacon/ Yacon Flour	-	-	800	800	112	112	224	224
Margarine	200	200	200	200	200	200	200	200
Sweetener (powder)*	-	38.43	38.43	-	-	38.43	-	38.43
Refined Sugar	291.2	-	-	291.2	291.2	-	291.2	-
Corn starch	280	280	280	280	224	224	168	168
Rice starch	280	280	280	280	224	224	168	168
Whole milk	160	160	160	160	160	160	160	160
Whole dry milk	160	160	160	160	160	160	160	160

*66 g of sweetener substitutes 500 g of sugar (sodium cyclamate and saccharine proper to oven). ** Tests: CBsg (control biscuit with sugar), CBsw (control biscuit with sweetener), YBsg (fresh yacon biscuit with sugar), YBsw (fresh yacon biscuit with sweetener), BF_{20sg} (biscuit with 20 % yacon flour and sugar), BF_{20sw} (biscuit with 20 % yacon flour with sweetener), BF_{40sg} (biscuit with 40 % yacon flour with sugar) and BF_{40sw} (biscuit with 40 % yacon flour with sweetener)

Biscuits formulation

In order to make biscuits from fresh yacon the tubers were cleaned, peeled and cooked, to avoid enzymatic browning. Later, they were cooled down, grinded and manually squeezed in order to take water out. Thus, all the ingredients (Table 1) were mixed up, homogenized, moulded and baked (210 °C/ 15 min).

After obtaining yacon flour, the biscuit formulations also followed as shown on Table 1. So, all the ingredients were homogenized, moulded and baked (210 °C/ 15 min).

Physical characteristics evaluation

The biscuits were analyzed regarding their weight, diameter and thickness before and after cooking. They were weighed in a RadWag® scale, model WPT-6C/1 (0.1 g). Their diameter and thickness were measured with 150 mm x 0.05 mm Vernier Caliper paquimeter. The expansion factor was obtained by the ratio of diameter and thickness values²⁰. The apparent volume (mL) was determined by the seed displacement method, and the specific volume was calculated by the ratio between the apparent volume and the weight of the biscuits, expressed in mL.g⁻¹²⁰. The tests were conducted in ten biscuits, randomly chosen.

Sensory analysis

The biscuits were evaluated by an acceptability test through a hedonic nine point scale (9= I liked very much and 1 = I disliked very much) according to the following attributes: appearance, flavor, color, texture and global acceptance²¹. Furthermore, the purchasing intention was also evaluated through a nine point scale (9= I would definitely buy it and 1= I would definitely not buy it). At first (first sensory test) the judges evaluated the biscuits made with fresh yacon. Afterwards (second sensory test) they evaluated biscuits made with yacon flour. The control samples (with sugar and sweetener) were used in both sensory tests. Sixty non-trained judges took part in these tests, all of them 18 years or older that liked biscuits and signed a Consent Form informing that they did not present any intolerance and/or allergy to the basic ingredients, poor health conditions or any other situation that may difficult the information gathering. The current study was submitted and approved by the Research Ethics Committee of the Centro Universitário Norte do Espírito Santo – CEUNES (Espírito Santo, Brazil).

Proximate composition

Biscuit preparations selected by the sensory analysis were evaluated by their proximate composition, in triplicate, according to the AOAC methods²². Fiber content was calculated through the Brazilian Food

Composition Table²³ as well as by Vasconcelos et al¹⁴. Available carbohydrates were calculated by difference: 100 - (moisture + proteins + lipids + ash + fiber). The energy value was determined in Kcal.

Data analysis

The results were grouped using Excel 2007 and submitted to variance analysis (ANOVA) followed by the average comparison test (Tukey), at 5 % probability, using Statistica 10.0 software. The other results were expressed in arithmetic averages and shown in tables.

RESULTS AND DISCUSSION

Yacon flour processing

Among the performed tests with the yacon, those with 1 % citric acid, without thermic shock (blanching) were those which provided chips almost free of browning, keeping visual features and thus, a clearer flour. After obtaining yacon flour, it was verified that the yield of the flour was 10.5 %, very close to values found by other researches^{9,19}.

Physical characteristics of yacon biscuits

In order to compare the physical characteristics of biscuits made with sugar and sweetener, all the formulations were compared in the same analysis (including their controls). It was observed (Table 2) that each biscuit lost between 0.38 and 0.63 g of its mass, which means a 13 to 21 % weight loss. These values were lower to those found by Feddern et al²⁴ (around 1g of weight loss), that developed cookies made with wheat bran and rice, and also lower, when compared with Assis et al²⁵ study (1.62 - 2.27 g weight loss), producing biscuits with oatmeal and parboiled rice flours. It could be observed, by Guimarães et al²⁶ that moisture and weight increased when fiber contents, from watermelon rind, increased. This fact can be explained due to the capacity of soluble fibers to keep water in their structure during the cooking process. The FOS present available hydroxyl groups that interacts with the water by hydrogen links, making the evaporation process difficult. Assis et al²⁵ also found that biscuits made only with parboiled rice flour lost more weight when compared with biscuits made with oatmeal flour (more fiber content). The weight loss of all biscuits made with yacon and their respective controls did not presented significative difference, showing homogeneity during the processing and of the final products.

Biscuits made with yacon flour (20 % and 40

%), with sugar added, presented higher diameter (2.95 cm and 2.50 cm, respectively) when compared with the same treatments formulated with sweetener (1.35 cm and 1.20 cm, respectively). This fact can be due to the solids increase, providing a higher "performance" in bakery products. Biscuits with 20 % yacon flour (with sugar) presented higher diameter value (2.95 cm) when compared with other biscuits made with sugar: control - CB_{sg} (1.75 cm) and with fresh yacon - YB_{sg} (1.65 cm). This same increase, in the final diameter values, was verified by Larosa et al²⁷ when fibers were added to biscuits, producing biscuits with 4.03 cm. According to the authors, this value is higher when compared with its respective control and a commercial biscuit. Furthermore, Feddern et al²⁴ observed that the addition of 30 % of rice bran reduced the diameter of the biscuits.

Regarding thickness, biscuits made with sugar (fresh yacon, 20 % and 40 % yacon flour) did not differ from biscuits made with sweetener, except for the control (CB_{sw}) who presented lower thickness (0.25 cm). Differences between biscuits made with fresh yacon and with yacon flour were not evidenced.

Biscuit expansions varied between 2.09 and 2.47. These values are similar to those found by Feddern et al²⁴ using 15 % to 45 % of wheat bran (2.04 to 2.29) and 10 % to 30 % of rice bran (2.59 to 3.09) to prepared biscuits. According to Table 2 it was not evidenced differences between biscuits made with sugar ou sweetener, as well as biscuits made with fresh yacon and 20 % and 40 % yacon flour. Expansion factor values have been used to predict biscuit quality, thus, those with extremely high or low expansion factor are not suitable for the industry, as they turn to be small products or too heavy²⁸.

Regarding the apparent volume, it was not observed significant differences between all the formulations, however the specific volume of biscuits made with fresh yacon (with sweetener - YB_{sw}) was significantly higher (2.64 mL.g⁻¹), differing from their control (2.00 mL.g⁻¹). Those values are higher when compared to the study of Feddern et al²⁴ (1.55 to 1.65 mL.g⁻¹), Assis et al²⁵ (0.92 to 1.76 mL.g⁻¹) and Clerici et al²⁹ (1.13 and 1.37 mL.g⁻¹). Also, biscuits YB_{sw} presented higher specific volume value when compare to the same samples with sugar (1.62 mL.g⁻¹), suggesting that, the addition of fresh yacon and sweetener affected the specific volume of the biscuits increasing them. On other hand, Silva et al³⁰ observed that the increase of fibers provokes specific volume reduction.

Table 2. Physical characteristics of yacon biscuits and their controls

Physical Parameters Evaluated	* Tests (n=10)							
	CB _{sw}	CB _{sg}	YB _{sw}	YB _{sg}	BF _{20sw}	BF _{20sg}	BF _{40sw}	BF _{40sg}
Weight loss (g)	0.63±0.13 ^a	0.55±0.08 ^a	0.63±0.32 ^a	0.61±0.39 ^a	0.63±0.10 ^a	0.43±0.08 ^a	0.50±0.08 ^a	0.38±0.07 ^a
Diameter (cm)	0.60±0.45 ^{cd}	1.75±0.63 ^{bc}	1.12±0.95 ^c	1.65±0.97 ^{bcd}	1.35±0.78 ^{cd}	2.95±0.80 ^a	1.20±0.58 ^{cd}	2.50±0.84 ^{ab}
Thickness (cm)	0.25±0.42 ^b	1.3±0.67 ^a	1.00±0.57 ^{ab}	1.60±0.93 ^a	1.00±0.40 ^{ab}	1.10±0.73 ^a	1.05±0.36 ^{ab}	1.15±0.47 ^a
Expansion factor	2.41±0.63 ^{ab}	2.47±0.82 ^a	2.41±0.97 ^{ab}	2.23±0.61 ^{ab}	2.09±1.27 ^b	2.33±1.26 ^{ab}	2.09±0.58 ^b	2.36±1.56 ^{ab}
Apparent volume (mL)	4.75±0.79 ^a	5.75±2.37 ^a	5.00±0.57 ^a	5.75±1.05 ^a	4.50±1.05 ^a	6.00±2.10 ^a	6.00±2.10 ^a	4.75±0.79 ^a
Specific volume (mL.g ⁻¹)	2.00±0.34 ^b	2.11±0.60 ^{ab}	2.64±0.37 ^a	1.62±0.37 ^b	1.87±1.30 ^b	2.13±0.60 ^{ab}	2.10±0.46 ^{ab}	1.62±0.28 ^b

* CBsw (control biscuit with sweetener), CBsg (control biscuit with sugar), YBsw (fresh yacon biscuit with sweetener), YBsg (fresh yacon biscuit with sugar), BF_{20sw} (biscuit with 20 % yacon flour with sweetener), BF_{20sg} (biscuit with 20 % yacon flour and sugar), BF_{40sw} (biscuit with 40 % yacon flour with sweetener) and BF_{40sg} (biscuit with 40 % yacon flour with sugar). **The same letters on the same line show no significant differences between the results considering $p > 0.05$ (Tukey test)

Sensory analysis of biscuits made with fresh yacon, 20 % and 40 % yacon flour

The results of the sensory analysis of biscuits made with fresh yacon, 20 %, 40 % of yacon flour can be observed in Table 3. This analysis was carried out in two days non consecutive, using their respective control samples - CBsg and CBsw (without yacon, with sugar/sweetener). The biscuits made with fresh yacon and sugar (YBsg) had a higher average for the flavor, differing from its control (CBsg), but it was statistically similar when compared with biscuits formulated with sweetener. Regarding the texture, biscuits formulated with sweetener showed better evaluation. For the rest of the evaluated items (color, appearance, global acceptance and purchasing intention) no significant differences among the tests was observed. When referring to purchasing intention, the average was around 5.0 (five) showing doubt regarding it. Maybe because it is a new and an unknown product. Besides, the consumption of yacon is still not part of the population food habits.

It was noticed that only biscuits made with 40 % yacon flour and sugar (BF_{40sg}) presented lower means for all sensory attributes as well as the purchasing intention.

Regarding flavor, appearance and color, all the other samples (CBsw, CBsg, BF_{20sw}, BF_{20sg} and BF_{40sw}) presented similar means, which is interesting because some of them were prepared with sweetener, replacing sugar in the formulation. According to texture, samples made with sweetener (control and 20 % of yacon flour) presented the highest means. Additionally, biscuits made with 40 % yacon flour (with sweetener) differed from their control (CBsw) for the global acceptance. The other samples did not showed significant differences between them. The same was observed for the purchasing intention that presented higher means (around 6.0), specially for samples with 20 % of yacon flour and their control, when compared with samples made with fresh yacon.

According to Pereira et al³¹, biscuits prepared with 40 %, 60 %, 80 % and 100 % of yacon flour, replacing sugar content, have had better grades than those prepared with 20 % and 30 % of this flour. As stated by Feddern et al²⁴, in order to have a product considered as accepted, it is necessary that the acceptance rate be at least 70 % which means an average grade of 6.3 in the nine point scale. In this way, biscuits prepared with yacon can be considered as acceptable with a favorable average.

Table 3. Sensory analysis of biscuits made with fresh yacon, 20%, 40% of yacon flour and their respective controls

Evaluated Items*	Biscuits made with fresh yacon				Biscuits made with yacon flour					
	Averages (n = 60)**				Averages (n = 60)**					
	CB _{sw}	CB _{sg}	YB _{sw}	YB _{sg}	CB _{sw}	CB _{sg}	BF _{20sw}	BF _{20sg}	BF _{40sw}	BF _{40sg}
Flavor	7.16 ^{ab}	6.71 ^b	6.80 ^{ab}	7.43 ^a	7.26 ^a	7.18 ^a	7.30 ^a	7.18 ^a	6.55 ^{ab}	6.21 ^b
Texture	6.46 ^a	5.15 ^b	5.83 ^{ab}	5.35 ^b	7.53 ^a	6.43 ^{bc}	7.28 ^{ab}	6.40 ^{bc}	6.20 ^c	4.51 ^d
Appearance	7.36 ^a	7.38 ^a	7.58 ^a	7.41 ^a	7.61 ^a	7.78 ^a	7.31 ^{ab}	7.35 ^{ab}	7.11 ^{ab}	6.68 ^b
Color	7.48 ^a	7.33 ^a	7.53 ^a	7.58 ^a	7.65 ^a	7.71 ^a	7.31 ^{ab}	7.35 ^a	7.01 ^{ab}	6.58 ^b
Global acceptance	6.20 ^a	5.75 ^a	5.46 ^a	6.65 ^a	7.48 ^a	6.95 ^{ab}	7.31 ^{ab}	6.80 ^{ab}	6.45 ^b	5.35 ^c
Purchasing intention	5.48 ^a	5.40 ^a	4.75 ^a	5.23 ^a	6.91 ^a	6.21 ^{ab}	6.80 ^{ab}	6.11 ^{ab}	5.48 ^b	4.03 ^c

*Same letters on the same line have no significant differences between the results, $p > 0.05$ (Tukey test). ** Averages of the following tests: CB_{sw} (control biscuit with sweetener), CB_{sg} (control biscuit with sugar), YB_{sw} (in natura yacon biscuit with sweetener), YB_{sg} (in natura yacon biscuit with sugar), BF_{20sw} (biscuit with 20 % yacon flour with sweetener), BF_{20sg} (biscuit with 20 % yacon flour and sugar), BF_{40sw} (biscuit with 40 % yacon flour with sweetener) and BF_{40sg} (biscuit with 40 % yacon flour with sugar)

Proximate composition

According to the best results of the sensory analysis, chemical tests were performed on fresh yacon (sweetener and sugar), as well as biscuits prepared with 20 % yacon flour (sweetener and sugar) and their controls (Table 4).

The Brazilian law for biscuits establishes a limit of 14 % of moisture in the final formulation³². According to this, biscuits made with fresh yacon and yacon flour presented about 6 % of moisture, meeting the current standard. The moisture is a very important component of new products because it establishes a microbiological parameter on food quality control, as well as water activity. It can then be inferred that low moisture content (about 4-5 % or less) gives the product a higher physical, chemical and microbiological stability if its adequately formulated and stored. Regarding protein content, it was found that the samples with sweetener presented higher values than those with sugar, being even higher for those prepared with fresh yacon. According to fat content, there were not any significant differences among all the samples.

Biscuits made with 20 % yacon flour and sweetener presented higher mineral content, when compared with other biscuits. These results are in accordance with Rosa et al.¹⁶ study in which they could show that when replacing wheat flour with yacon, the ash content increased. The ash content observed in this study for biscuits made with yacon are in accordance with the

Brazilian law for biscuits, that limits to 3.0 % of ashes in the final formulation³².

As it was expected and observed by Teixeira et al³³ fiber content increased as long as yacon content increased. It was observed that biscuits prepared with yacon flour (sugar and sweetener) presented fiber contents above 50 %. According to Brazilian law for labeling (nutritional complementary information)³⁴, in order to consider a product as a fiber source it is necessary to have at least 3 % fiber in the final portion and at least 6 % of fibers in the final portion to be considered "high fiber content". As such it can be inferred that fresh yacon biscuits are considered a fiber source food as well as biscuits made with yacon flour can be considered rich in fiber.

Moreover, the high content of FOS and inulin provenient from yacon can suggest functionality according to Brazilian law for functional foods. This means that a new product is considered with functional capacity when it has at least 3 g of FOS in the final portion³⁵.

Considering the available information regarding FOS quantity in 100 g of yacon¹⁴ it can be estimated that a portion of 8 (eight) fresh yacon biscuits (24 g) and 6 (six) biscuits made with 20 % yacon flour (18 g) can meet the minimum suggested quantity of 3 g/day of FOS³⁵. These recommendations cover the daily recommended quantity for biscuits (30 g)³⁶.

Biscuits made with 20 % yacon flour, besides

Table 4. Proximate composition of biscuits prepared with yacon (*fresh*, flour and controls)

Evaluated items (in 100g)**	Samples* (n = 3)					
	CB _{sw}	CB _{sg}	YB _{sw}	YB _{sg}	BF _{20sw}	BF _{20sg}
Moisture (%)	5.93 ± 0.20 ^{ab**}	5.42 ± 0.45 ^b	6.04 ± 0.07 ^{ab}	6.14 ± 0.40 ^{ab}	6.16 ± 0.19 ^{ab}	6.41 ± 0.23 ^a
Proteins (%)	8.25 ± 0.98 ^{ab}	6.86 ± 0.14 ^b	9.06 ± 3.50 ^a	6.64 ± 1.18 ^b	8.22 ± 0.24 ^{ab}	6.40 ± 1.03 ^b
Fat (%)	18.72 ± 2.59 ^a	17.68 ± 1.15 ^a	18.16 ± 1.86 ^a	16.69 ± 1.07 ^a	19.87 ± 0.62 ^a	17.55 ± 0.17 ^a
Ashes (%)	1.82 ± 0.03 ^b	1.31 ± 0.03 ^d	1.86 ± 0.10 ^b	1.38 ± 0.05 ^d	2.25 ± 0.04 ^a	1.64 ± 0.05 ^c
Fiber (%)	1.23 ± 0.25 ^c	1.4 ± 0.20 ^c	3.7 ± 0.20 ^b	3.6 ± 0.36 ^b	51.4 ± 0.26 ^a	51.60 ± 0.36 ^a
Available carbohydrates (%)	63.21 ± 2.02 ^{ab}	67.31 ± 1.13 ^a	62.00 ± 2.71 ^b	65.53 ± 1.96 ^{ab}	12.08 ± 0.56 ^c	16.38 ± 0.96 ^c
Energy value (kcal)	457.63 ± 14.75 ^a	455.92 ± 6.54 ^a	444.25 ± 8.45 ^a	438.94 ± 5.63 ^a	260.12 ± 3.82 ^b	249.17 ± 1.55 ^b

* CBsw (control biscuit with sweetener), CBsg (control biscuit with sugar), YBsw (fresh yacon biscuit with sweetener), YBsg (fresh yacon biscuit with sugar), BF_{20sw} (biscuit with 20 % yacon flour with sweetener), BF_{20sg} (biscuit with 20 % yacon flour and sugar).**Same letters on the same line show that there are not any significant differences between the results, considering p > 0.05 (Teste Tukey)

presenting a higher content of fibers, showed a low content of available carbohydrates as well as energy value. This evidence can be explained because as the fiber concentration increases, the energy rate is reduced. The same was observed by Moscatto et al³⁷ in chocolate cakes using inulin and yacon flour. These authors checked that the cake made with 40 % of yacon flour and 6 % of inulin presented a lower energy value compared to the standard cake prepared exclusively with wheat flour. Considering energy content, just the biscuits prepared with yacon flour presented important differences compared to the other tests, being classified as a product with energy reduction.

CONCLUSION

According to this study it was possible to verify the feasibility of preparing biscuits containing fresh

yacon, 20 % and 40 % yacon flour (diet and regular biscuits). According to the physical characterization, it was observed that, the addition of sugar in biscuits made with yacon flour (20 % and 40 %) increased diameter values. Moreover, the addition of sweetener in biscuits made with fresh yacon increased the specific volume value. According to the other parameters it was not evidenced significant differences between the formulated biscuits and their respective controls.

Regarding the acceptability analysis, biscuits made with fresh yacon presented good acceptability means in relation to the evaluated sensory attributes, as well as, biscuits made with 20 % yacon flour (with sugar or sweetener). No significant differences between biscuits made with sugar or sweetener were observed, except for those made with 40 % of yacon flour, especially with sugar that, did not present good acceptability, even for purchasing intention. Biscuits prepared with yacon

flour showed significantly higher values of fiber, being considered products rich in this component as well as low in calories. It is important to point out that biscuits made with fresh yacon are an excellent option for easy homemade preparations.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank to Federal University of Espírito Santo (“Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação”) and to the “Program of Scientific Initiation” for the opportunity.

REFERENCES

1. Villemejane C, Roussel P, Berland S, Aymard P, Michon C. Technological and sensory tools to characterize the consistency and performance of fiber-enriched biscuit doughs. *J Cereal Sci.*2013;57(3):551-9.
2. Ktenioudaki A, Gallagher E. Recent advances in the development of high-fiber baked products. *Trends Food Sci Technol.*2012;28(1):4-14.
3. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. Pesquisa de Orçamento Familiar (POF) 2008-2009. [acesso em 17 de maio de 2014]. Disponível em: [http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicao-de-vida/pof/2008_2009_analise_consumo/comentario.pdf].
4. Passos LML, Park PY. Frutooligosacarídeos: implicações na saúde humana e utilização em alimentos. *Ciênc Rural.*2003;33(2):385-90.
5. Gibson G, Roberfroid M. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutri.*1995;125(6):1401-12.
6. Ferreira CLL, Teshima E, Costa NMB. Effect of probiotic and synbiotic on colon and cecum microbiota of rats. *Int J Prob Preb.*2008;3(2):71-6.
7. Castro A, Céspedes G, Carballo S, Bergenstahl B, Tornberg E. Dietary fiber, fructooligosaccharides, and physicochemical properties of homogenized aqueous suspensions of yacon (*Smallanthus sonchifolius*). *Food Res Int.*2013;50(1):392-400.
8. Moscatto JA, Borsato D, Bona E, Oliveira AS, Haully MCO. The optimization of the formulation for a chocolate cake containing inulin and yacon meal. *Int J Food Sci Technol.*2006;41(2):181-8.
9. Maldonado S, Santapaola JE, Torrez JS, Gray A. Cinética de la transferencia de masa durante la deshidratación osmótica de yacón (*Smallanthus sonchifolius*). *Ciênc Tecnol Aliment.*2008;28(1):251-6.
10. Santana I, Cardoso MH. Raiz tuberosa de yacon (*Smallanthus sonchifolius*): potencialidade de cultivo, aspectos tecnológicos e nutricionais. *Ciênc Rural.*2008;38(3):898-905.
11. Vaz-Tostes MG, Viana ML, Grancieri M, Luz TCS, Paula H, Pedrosa RG et al. Yacon effects in immune response and nutritional status of iron and zinc in preschool children. *Nutrition.*2013;30(6):666-72.
12. Bruggencate SJM, Bovee-Oudenhoven IMJ, Lettink-Wissink MLG, Katan MB, Meer R V. Dietary fructooligosaccharides affect intestinal barrier function in healthy men. *J Nutr.*2006;136(1):70-4.
13. Franck A. Technological functionality of inulin and oligofructose. *Brit J Nutr.*2002;87(2):287-291.
14. Vasconcelos CM, Silva CO, Teixeira LJQ, Chaves JBP, Martino HSD. Determinação da fração da fibra alimentar solúvel em raiz e farinha de yacon (*Smallanthus sonchifolius*) pelo método enzimático-gravimétrico e cromatografia líquida de alta eficiência. *Rev Inst Adolfo Lutz.*2010;69(2):188-93.
15. Rolim PM, Salgado SM, Padilha VM, Livera AVS, Guerra NB, Andrade SAC. Principal component analysis of sliced bread formulated with yacon meal (*Smallanthus sonchifolius* (Poepp.) H. Rob.). *Rev Ceres.*2010;57(1):12-7.
16. Rosa CS, Oliveira VR, Viera VB, Gressler C, Viegas S. Elaboração de bolo com farinha de yacon. *Ciênc Rural.*2009;39(6):1869-72.
17. Teixeira AP, Paiva CF, Resende AJ, Zandonadi RP. The effect of yacon addition to the industrialized orange juice on the glycemic curve of university students. *Braz J Food Nutr.*2009;20(2):313-9.
18. Rebelo AM, Casali EZ, Bertoldi FC. Controle de escurecimento enzimático em chips de yacon. *Evidência.*2008;8(1-2):7-16.
19. Padilha VM, Rolim PM, Salgado SM, Livera AVS, Oliveira MG. Avaliação do tempo de secagem e da atividade de óxido-redutases de yacon (*Smallanthus sonchifolius*) sob tratamento químico. *Ciênc Rural.*2008;39(7):2178-84.
20. American Association of Cereal Chemists - AACC. Approved methods of the American Association of Cereal Chemists. 9ª ed. Saint Paul. 1995.
21. Minim VPR. Análise sensorial: estudos com consumidores. 3ª ed. Viçosa (MG): Ed. UFV; 2013.
22. Association of Official Agricultural Chemists - AOAC. Official Methods of Analysis of the Association of Official Agriculture Chemists. Washington. 2005.
23. Philipi ST. Tabela de composição de alimentos: suporte para decisão nutricional. 3ª ed. Barueri (SP): Manole; 2012.
24. Feddern V, Durante VVO, Miranda MZ, Mellado MLMS. Avaliação física e sensorial de biscoitos tipo biscuit adicionados de farelo de trigo e arroz. *Braz J Food Technol.*2011;14(4):265-72.
25. Assis LM, Zavareze ER, Radünz AL, Dias ARG, Gutkoski LC, Elias MC. Propriedades nutricionais, tecnológicas e sensoriais de biscoitos com substituição de farinha de trigo por farinha de aveia ou farinha de arroz parboilizado. *Braz J Food Nutr.*2009;20(1):15-24.
26. Guimarães RR, Freitas MCJ, Silva VLM. Bolos simples elaborados com farinha de entrecasca de melancia. *Ciênc Tecnol Aliment.*2010;30(2):354-63.
27. Larosa G, Rossi EA, Barbosa JC, Carvalho MRB. Aspectos sensoriais, nutricionais e tecnológicos de biscoito doce contendo farinha de “okara”. *Braz J Food Nutr.*2006;17(2):151-7.
28. Gaines CS. Collaborative studies on the baking quality of biscuit flour by wire-cut type formulations (AACC methods 10-53 and 10-54). *CFW Plex.*1993;38:26-30.
29. Clerici MTPS, Oliveira ME, Nabeshima EH. Qualidade física, química e sensorial de biscoitos tipo cookies elaborados com a substituição parcial da farinha de trigo por farinha desengordurada de gergelim. *Braz J Food Technol.*2013;16(2):139-46.

30. Silva MTP, Silva CB, Paleo IW, Chang YK. Use of fructooligosaccharides in elaboration of sugar free bread. *Temas Agrarios*.2010;15(1):44-57.
31. Pereira MA, Moreira CTS, Paiva AP. Biscoito tipo sequilhos elaborado com farinha de yacon. *In: I Seminário de Iniciação Científica*, 2011. Anais do II Simpósio de Pesquisa e Inovação, 14-17. [acesso em 02 dez. 2013]. Disponível em: [http://www.barbacena.ifsudestemg.edu.br/sites/default/files/ii_spi_-_i_sic_anais_ifsemg_campus_barbacena_corrigido_0_0.pdf].
32. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - CNNPA nº 12 de 24 de julho de 1978. Dispõe sobre normas técnicas especiais relativas a alimentos (e bebidas). [acesso em 08 dez. 2013]. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_78_biscoitos.htm].
33. Teixeira AP, Paiva CF, Resende AJ, Zandonadi RP. O efeito da adição de yacon no suco de laranja industrializado sobre a curva glicêmica de estudantes universitários. *Braz J Food Nutr*.2009;20(2):313-9.
34. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria n ° 27 de 13 de janeiro de 1998. Dispõe sobre regulamento Técnico referente à Informação Nutricional Complementar. [acesso em 08 dez. 2013]. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/27_98.htm].
35. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Dispõe sobre alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos, 2008. [acesso em 08 dez. 2013]. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm].
36. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 359 de 23 de dezembro de 2003. Tabela de Valores de Referência para Porções de Alimentos e Bebidas Embalados para Fins de Rotulagem Nutricional. [acesso em 08 dez. 2013]. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/39_01rdc.htm].
37. Moscatto JA, Prudêncio-Ferreira SH, Haully MCO. Farinha de yacon e inulina como ingredientes na formulação de bolo de chocolate. *Ciênc Tecnol Aliment*.2004;24(4):634-40.

Análise do potencial antioxidante do consumo oral da farinha produzida com micélio de *Agaricus brasiliensis* em hamsters hipercolesterolêmicos

The antioxidant potential of oral intake of flour produced from *Agaricus brasiliensis* mycelium in hamsters with hypercholesterolemia

RIALA6/1605

Ana Cláudia THOMAZ¹, Herta Stutz DALLA SANTA², Elisa PEREZ³, Daiana NOVELLO⁴, Melissa dos Santos RAYMUNDO², Fernanda BOVO⁵, Kelly Cristina de Brito OLIVEIRA⁶, Flávia Donadio PITA⁷, Rosilene REBECA⁸

*Endereço para correspondência: ¹Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná – UFPR. Rua General Carneiro, 181 - Alto da Glória, Curitiba, PR, 80060-900, Brasil. Tel: (41) 9516-7064. E-mail: anaclathomaz@gmail.com

²Setor de Ciências Exatas e Tecnologia, Curso de Engenharia de Alimentos, UNICENTRO. Guarapuava, PR, Brasil.

³Setor de Ciências da Saúde, Curso de Farmácia, UNICENTRO. Guarapuava, PR, Brasil.

⁴Setor de Ciências da Saúde, Curso de Nutrição, UNICENTRO. Guarapuava, PR, Brasil.

⁵Setor de Ciências da Saúde, Curso de Farmácia, Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná – UFPR, Curitiba, PR, Brasil.

⁶Setor de Ciência Biológicas, UNICENTRO. Guarapuava, PR, Brasil.

⁷Setor de Ciências Biológicas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP. São Vicente, SP, Brasil.

⁸Setor de Ciências Biológicas, Curso de Biologia, UNICENTRO. Guarapuava, PR, Brasil.

Recebido: 16.07.2013 - Aceito para publicação: 18.06.2014

RESUMO

O sistema de defesa antioxidante inibe ou reduz os danos causados às células pelas espécies reativas de oxigênio. Alguns compostos antioxidantes presentes na dieta auxiliam na defesa antioxidante do plasma. O potencial antioxidante do consumo oral de farinha produzida com micélio de *Agaricus brasiliensis* fermentado sobre grãos de trigo foi analisado nos plasmas de hamsters *Golden Syrian* machos hipercolesterolêmicos, que foram divididos em quatro grupos: P (dieta padrão), H (dieta hipercolesterolêmica padrão), C (dieta padrão + 10 % de farinha de trigo contendo micélio de *A. brasiliensis*), e HC (dieta hipercolesterolêmica padrão + 10 % de farinha de trigo contendo micélio de *A. brasiliensis*). Os animais foram alimentados durante 40 dias e depois sacrificados para coletar materiais biológicos. A análise da capacidade antioxidante mostrou que a dieta do grupo C induziu maior aumento significativo da concentração de antioxidantes no plasma (0,39 mg.mL⁻¹, expresso em ácido ascórbico). O grupo HC apresentou maior capacidade antioxidante do que grupo H (p < 0,05), pois inibiu 20,2 % do branqueamento da crocina. O grupo H inibiu 10,4 %, porém o grupo HC demonstrou capacidade antioxidante semelhante ao do grupo P (16,64 %). O consumo da farinha de trigo contendo micélio de *A. brasiliensis* estimulou a proteção antioxidante no plasma dos animais.

Palavras-chave. *Agaricus brasiliensis*, capacidade antioxidante, hipercolesterolemia, espectrofotômetro, trigo.

ABSTRACT

The main function of antioxidant defense system is to inhibit or reduce the cells damage caused by reactive oxygen species. Some antioxidants occurring in the diet enhance the antioxidant defense of plasma. The antioxidant potential of oral intake of a flour produced with *A. brasiliensis* mycelium fermented on wheat grains was evaluated in plasma samples from male hypercholesterolemic *Syrian Golden* hamsters, were divided into four groups: P (standard diet), H (standard hypercholesterolemic diet), C (standard diet + 10 % of wheat flour containing mycelium of *A. brasiliensis*), and HC (standard diet hypercholesterolemic + 10 % wheat flour containing mycelium of *A. brasiliensis*). The animals were fed for 40 days and then sacrificed for collecting plasma. The antioxidant capacity analysis showed that the dietary intake of group C induced the most significant increase of antioxidants concentrations in plasmas (0.39 mg.mL⁻¹, expressed in ascorbic acid). The HC group showed higher antioxidant capacity than the H group (p < 0.05), as it inhibited 20.2 % of crocin bleaching, while the H group inhibited 10.4 % only; however the HC group showed a similar antioxidant capacity of P group (16.64 %). It is suggested that the consumption of wheat flour containing mycelium of *A. brasiliensis* induced the antioxidant protection in animals plasma.

Keywords. *Agaricus brasiliensis*, antioxidant capacity, hypercholesterolemia, spectrophotometer, wheat.

INTRODUÇÃO

A produção de radicais livres, de espécies reativas de oxigênio (ERO), de nitrogênio (ERN), entre outras espécies reativas, é parte integrante do metabolismo humano e animal, observada em diversas condições fisiológicas¹.

A origem das espécies reativas pode ser por fontes endógenas, como processos biológicos que normalmente ocorrem no organismo, tais como: redução de flavinas e tióis; resultado da atividade de oxidases, cicloxigenases, lipoxigenases, desidrogenases e peroxidases; presença de metais de transição no interior da célula e de sistemas de transporte de elétrons; detoxificação hepática por meio do citocromo P-450; fagocitose e síntese de prostaglandinas. As fontes exógenas geradoras de radicais livres incluem tabaco, drogas, medicamentos, poluição do ar, solventes orgânicos, agrotóxicos e radiações². Além disso, o excesso de gordura no organismo, também pode levar ao aumento da geração de radicais livres³⁻⁵.

Quando a produção de radicais livres é exacerbada ou quando o sistema antioxidante é insuficiente ocorre o estresse oxidativo onde há um desequilíbrio no sistema pró e antioxidante podendo levar a oxidação da camada lipídica da membrana celular e alterações na sua estrutura e permeabilidade. Os danos oxidativos podem estar relacionados com processos patológicos como câncer, pancreatite, diabetes, hipertensão, doenças cardíacas, catarata, envelhecimento precoce entre outros^{6,7,1}.

Os agentes antioxidantes são compostos que protegem os sistemas biológicos contra os efeitos deletérios dos processos ou das reações que levam à oxidação de macromoléculas ou estruturas celulares⁷.

O sistema de defesa antioxidante do organismo tem como principal função inibir ou reduzir os danos causados às células pelas espécies reativas de oxigênio. Existe uma grande variedade de substâncias antioxidantes adquiridas por meio da dieta que após serem absorvidas pelo organismo participam do sistema antioxidante do plasma^{8,1}.

Cogumelos comestíveis vêm sendo cada vez mais utilizados devido as suas propriedades funcionais. *Agaricus brasiliensis* (*A. blazei* Murill, *A. subrufescens*), também conhecido como cogumelo do sol, é um cogumelo originário da cidade de Piedade, São Paulo, Brasil, descoberto em 1960. O interesse crescente em cogumelos, em especial o *A. brasiliensis* deve-se à presença de diferentes biomoléculas, especialmente

polissacarídeos, que tem importante função de estimular o sistema imunológico, além de uma variedade de metabólitos secundários tais como compostos fenólicos, ácido ascórbico e tocoferóis possivelmente envolvidos na atividade antioxidante do cogumelo⁹⁻¹³.

Em estudo realizado por Ker et al¹¹, o extrato obtido com polissacarídeos presentes no micélio do cogumelo mostrou uma significativa capacidade de remover radicais livres obtidos pela diluição do reagente DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), e segundo Soares¹², nos estudos realizados com o basidiocarpo, foi constatado que o cogumelo é uma importante fonte de antioxidantes naturais.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial antioxidante da ingestão da farinha produzida com micélio de *A. brasiliensis* fermentado sobre grãos de trigo em hamsters hipercolesterolêmicos.

MATERIAL E MÉTODOS

Produção da farinha e cultivo do micélio de *A. brasiliensis* sobre grãos de trigo

O cultivo do micélio do cogumelo *A. brasiliensis* sobre grãos de trigo, para obtenção da farinha contendo micélio, foi realizado de acordo com Dalla Santa¹⁴. Os grãos de trigo foram previamente umedecidos por 12 horas em água destilada, distribuídos em bandeja com altura de 1,5 cm³, autoclavados (121 °C/45 min) e inoculados com suspensão a 5,0 % (v/v) de micélio do cogumelo *A. brasiliensis* em meio padrão contendo glicose (20,00 g/L), extrato de levedura (3,95 g/L), MgSO₄.7H₂O (0,30 g/L), e K₂HPO₄.3H₂O (0,50 g/L) e pH 6,0 (± 0,2) utilizando-se seringas autoclavadas (121 °C/45 min). O trigo inoculado ficou em estufa (Nova Ética, Brasil) a 30,0 °C durante 20 dias. No 21º dia, o trigo foi seco em estufa (Nova Ética, Brasil) sob 60 °C por 24 h e moído obtendo-se a farinha de trigo contendo micélio que foi misturada à ração.

Capacidade antioxidante *in vitro* da farinha de trigo contendo *A. brasiliensis* pelo método ABTS (2,2-azinobis-3etil-benzotiazolina-6-ácido sulfônico)

Após o cultivo do micélio sobre os grãos de trigo e o processo de moagem, a farinha obtida foi peneirada em peneira com abertura de 300,0 mm (Bertel, Brasil). A farinha de trigo *in natura* foi obtida de acordo com os mesmos procedimentos descritos, porém sem a inoculação da suspensão de micélio.

Para a extração das substâncias antioxidantes

da farinha de trigo fermentada com micélio de *A. brasiliensis* (FTF) e *in natura* (FT) utilizou-se o seguinte procedimento: 40,0 mL de solvente (água ou água:metanol 50:50 v/v) foram adicionados a 5,0 g de amostra (125 mg.mL^{-1}) e mantidos sob agitação por tempo adequado (60 minutos e 150 minutos) em chapas de agitação magnética (Quimis, Brasil), conforme segue: FT 1 e FTF 1 (água/60 min); FT 2 e FTF 2 (água/150 min); FT 3 e FTF 3 (água:metanol/60 min) FT 4 e FTF 4 (água:metanol/150 min). Após período de agitação, os extratos foram filtrados em papel filtro de 110 mm de diâmetro (Whatman nº 1) e utilizados na avaliação da capacidade antioxidante, *in vitro*, pelo método ABTS, que baseia-se na descoloração do radical ABTS (2,2-azinobis-3etil-benzotiazolina-6-ácido sulfônico) com persulfato de potássio, conforme a metodologia de Kuskoski et al¹⁵. A porcentagem de inibição do radical foi calculada em função da concentração de Trolox (6-hidroxi-2, 5, 7, 8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico), vitamina E sintética. Os resultados foram expressos em TEAC (capacidade antioxidante equivalente ao Trolox) e em porcentagem de inibição do radical ABTS.

Tratamentos dos animais

O ensaio biológico foi desenvolvido no laboratório de Fisiologia Humana do Departamento de Farmácia da Universidade Estadual do Centro-Oeste (UNICENTRO), PR, 2010.

Foram utilizados 40 hamsters machos (*Mesocricetus auratus*) da raça *Golden Syrian*, com 120 dias de idade, pesando em média 134 g, provenientes do Biotério do Departamento de Patologia, vinculado a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual de São Paulo. Os animais foram transportados até o local do experimento em quatro caixas com dez animais em cada uma, em veículo climatizado. Esta espécie foi escolhida por ser muito usada em estudos de efeito de drogas e dieta sobre o metabolismo de lipídios e aterosclerose¹⁶.

Após o transporte, os animais foram alojados em caixas coletivas de polipropileno (10 por caixa) com tamanho de 43x43x20 cm, no Laboratório de Experimentação Animal do Departamento de Farmácia da UNICENTRO, com temperatura média de 25 °C, sendo expostos por 12 horas à claridade e 12 horas ao ambiente escuro, permanecendo em período de adaptação ao ambiente durante quatorze dias e recebendo

dieta comercial na forma particulada (granulometria maior 2,0 mm) da BioBase (BIO-TEC[®]). O experimento durou 54 dias (14 dias de adaptação e 40 dias utilizando as dietas experimentais).

Delineamento experimental e dietas experimentais

Durante a fase de adaptação utilizou-se a ração comercial BioBase (BIO-TEC[®]) com granulometria menor que 2,0 mm, para os quatro grupos. Após o período de adaptação, dividiram-se os grupos de animais em: **Grupo H** (n = 10 animais) que recebeu uma formulação para indução da hipercolesterolemia que foi baseada em Frota et al¹⁷; **Grupo HC** (n = 10 animais) que recebeu uma formulação para indução da hipercolesterolemia, porém contendo na ração hipercolesterolêmica adição de micélio do cogumelo *A. brasiliensis* produzido por cultivo sólido em grãos de trigo na forma particulada (granulometria maior que 2 mm); **Grupo C** (n = 10 animais) que foi alimentado com uma dieta contendo na ração padrão, utilizada na fase de adaptação, adição de micélio do cogumelo *A. brasiliensis* produzido por cultivo sólido em grãos de trigo na forma particulada (granulometria maior 2 mm) e; **Grupo P**, controle ou padrão (n = 10 animais), neste grupo os animais foram alimentados com a mesma ração comercial utilizada na fase de adaptação.

As dietas experimentais foram administradas durante 40 dias e podem ser verificadas na Tabela 1.

As rações foram preparadas semanalmente. Os ingredientes foram pesados em uma balança (Bel, Brasil) e misturados com o auxílio de uma espátula, após foram armazenadas a 4 °C no laboratório de Pesquisa de Cultivo de Cogumelo do Departamento de Engenharia de Alimentos da UNICENTRO, até o momento de sua utilização.

Os animais receberam ração e água *ad libitum*. Durante o experimento, os mesmos foram pesados semanalmente para avaliar o peso individual e do grupo. As dietas foram pesadas e trocadas diariamente, para verificar a quantidade diária ingerida pelo grupo, desprezando-se qualquer remanescente da dieta.

Coleta de material biológico

Para a coleta de material biológico (sangue), no 41º dia de experimento, os hamsters foram sacrificados de acordo com Damy et al¹⁸. Foram anestesiados com injeção intraperitoneal de cloridrato de xilazina (Rompum[®]) – 10 mg/kg de peso (pré-anestésico geral) e cloridrato

Tabela 1. Ingredientes e composição química das dietas

Dietas/ Ingredientes	P	H	C	HC
Ração comercial BIO-TEC® (%)*	100	84,6	90	75
Cloreto de colina (%)	-	0,3	-	0,3
Gordura de coco (%)	-	13,5	-	13,5
Óleo de soja (%)	-	1,6	-	1,6
Micélio de <i>A. brasiliensis</i> (%)***	-	-	10,0	10,0
Composição química**				
Matéria mineral máxima (%)	10,0	10,0	10,0	10,0
Proteína mínima (%)	22,0	22,0	22,0	22,0
Extrato etéreo mínimo (%)	4,0	4,0	4,0	4,0
Colesterol (%)	-	0,1	-	0,1
Cálcio máximo (%)	1,4	1,4	1,4	1,4
Matéria fibrosa máxima (%)	8,0	8,0	8,0	8,0

*A ração comercial BIO-TEC® é composta por: milho moído, farelo de soja, farelo de trigo, premix aminoácido mineral vitamínico, calcário calcítico, fosfato bicálcico e cloreto de sódio (sal comum); **Informada pela empresa BioBase fabricante da ração BIO-TEC® ratos e camundongos; Grupo P: dieta comercial padrão; Grupo H: dieta experimental hipercolesterolêmica; Grupo C: dieta experimental com micélio de *A. brasiliensis*; Grupo HC: dieta experimental hipercolesterolêmica com micélio de *A. brasiliensis*; ***Micélio de *A. brasiliensis* produzido por cultivo sólido em grãos de trigo na forma particulada (farinha contendo micélio)

de ketamina (Ketalar®) – 100mg/kg de peso (anestésico geral). Antes da coleta de sangue, as seringas foram lavadas com heparina (Liquemine®). Após a anestesia, o sangue foi coletado individualmente por punção cardíaca em tubos heparinizados e submetidos à centrifugação (3.500 rpm por 15 min). O sobrenadante (plasma) foi então armazenado em microtubos tipo Eppendorf e estocados a -80 °C para as análises do colesterol total e capacidade antioxidante. Ressalva-se que um dos animais do grupo H foi a óbito imediatamente antes que seu sangue pudesse ser retirado.

Análise da concentração de colesterol total

O colesterol total foi medido através do kit Colestat (Wiener®), baseado no método enzimático-colorimétrico (CHOP/PAP) com colesterol esterase, colesterol oxidase e 4-aminoantipirina. A leitura dos resultados foi realizada em espectrofotômetro (BioPlus 2000, Brasil), em 505 nm do Laboratório de Química Farmacêutica (LabQFar) do Departamento de Farmácia da UNICENTRO.

Análise da capacidade antioxidante

A crocina utilizada na avaliação da capacidade antioxidante do plasma foi isolada do açafrão segundo metodologia de Hadizadeh et al¹⁹. Sua concentração foi

ajustada para 25 µM, com adição do mesmo tampão, usando o coeficiente $\epsilon_{443} = 89,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ através da fórmula $C = A/\epsilon$, onde C = concentração em mol/L; dil = diluição da amostra; e A = absorvância da amostra, de acordo com Lussignoli et al²⁰.

As análises da capacidade antioxidante foram realizadas no plasma dos 4 diferentes grupos de hamsters. A metodologia utilizada foi adaptada de Lussignoli et al²⁰, conforme descrito a seguir: em microtubos do tipo eppendorf de 2,0 mL foram adicionados 100 µL da solução de crocina e 10 µL de plasma, sendo que o volume foi completado para 150 µL com a solução tampão, os microtubos foram aquecidos em banho-maria a 37 °C por 10 min. Em seguida, foi adicionado 100 µL de 2,2'-azobis-(2-amidinopopane) dihydrochloride (ABAP) (5,0 mg.mL⁻¹) recém preparado em tampão fosfato 10 mM pH 7.4. Foram feitos brancos para o plasma de cada animal, preparado da mesma maneira, porém com a substituição do ABAP por 100 µL de tampão fosfato pH 7,4. A reação ocorreu durante 90 minutos em banho-maria a 37 °C. Após 90 minutos, os microtubos foram abertos e em cada um deles foi adicionado 1 mL de tampão fosfato 10 mM pH 7,4 sendo agitados manualmente, para a realização da leitura em espectrofotômetro Ultravioleta (marca 600 Plus – Femto, Brasil) a 450 nm.

A porcentagem de inibição do branqueamento da crocina foi calculada de acordo com Lussignoli et al²⁰. Os resultados da capacidade antioxidante do plasma foram expressos em miligrama de ácido ascórbico por mililitro de plasma utilizando uma curva analítica de ácido ascórbico.

Para a curva analítica, usou-se como padrão externo o ácido L-ascórbico (AA). Primeiramente uma solução-estoque de AA 5 mg.mL⁻¹ foi preparada, logo após diferentes volumes dessa solução foram colocados em balões de 5 mL e o volume final completado com solução tampão fosfato. Em microtubos tipo Eppendörf foram adicionados 40 µL de cada solução de ácido ascórbico, 100 µL de crocina a 25 µM, 100 µL de ABAP a 5 mg.mL⁻¹ e 10 µL de tampão fosfato 10 mM e pH 7,4. Os microtubos foram deixados durante 90 min em banho-maria a 37 °C. As soluções resultantes foram diluídas em 1 mL de tampão fosfato 10,0 mM e pH 7,4. Com essas amostras foram feitas as leituras das absorvâncias em espectrofotômetro Ultravioleta (marca 600 Plus – Femto, Brasil) a 450,0 nm, para a obtenção da equação da reta, intervalo e coeficiente de correlação linear²¹. As análises foram realizadas no Laboratório de Química Farmacêutica (LabQFar) do Departamento de Farmácia da UNICENTRO.

Questões éticas

Todos os procedimentos realizados com os animais foram executados de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas no “*Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)*”, de acordo com protocolo aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Paraná, PR (Ofício nº 23075.0376612/2010-60).

Análises estatísticas

Os resultados obtidos foram analisados utilizando-se Análise de Variância (ANOVA), Teste de Tukey e t de *Student* com nível de 5 % de significância, utilizando-se o *software Statgraphics Plus*, versão 5.1.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Capacidade antioxidante, *in vitro*, da farinha contendo micélio de *A. brasiliensis*

As capacidades antioxidantes dos extratos da farinha de trigo e da farinha de trigo contendo micélio estão demonstradas na Tabela 2.

Tabela 2. Capacidades antioxidantes dos extratos de farinha de trigo contendo micélio e farinha de trigo *in natura*, expressas como TEAC - Trolox equivalent antioxidant capacity (mmol trolox.kg de amostra⁻¹) e porcentagem de inibição do radical ABTS (2,2-azinobis-3etil-benzotiazolína-6-ácido sulfônico)

Avaliação/ Amostra	TEAC (mmol trolox.kg ⁻¹)		Inibição do radical ABTS (%)	
	FT	FTF	FT	FTF
	(Média±DP)	(Média±DP)	(Média±DP)	(Média±DP)
1	0,44±0,00 ^{abB}	0,62±0,02 ^{cA}	18,1±0,20 ^{abB}	25,1±0,72 ^{cA}
2	0,38±0,05 ^{bbB}	0,73±0,01 ^{ba}	15,5±2,01 ^{bb}	29,7±0,47 ^{ba}
3	0,48±0,02 ^{abB}	1,44±0,04 ^{aA}	19,6±0,66 ^{abB}	58,7±1,80 ^{aA}
4	0,51±0,00 ^{abB}	1,46±0,05 ^{aA}	20,6±0,15 ^{abB}	59,6±2,16 ^{aA}

Letras maiúsculas diferentes na linha mostram diferença significativa pelo teste t de *student* ($p < 0,05$); letras minúsculas diferentes na coluna indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$); FT 1: farinha de trigo *in natura* em água/60 min; FT 2: farinha de trigo *in natura* em água/150 min; FT 3: farinha de trigo *in natura* em água:metanol/60 min; FT 4: farinha de trigo *in natura* em água:metanol/150 min; FTF 1: farinha de trigo contendo micélio em água/60 min; FTF 2: farinha de trigo contendo micélio em água/150 min; FTF 3: farinha de trigo contendo micélio em água:metanol/60 min; FTF 4: farinha de trigo contendo micélio em água:metanol/150 min; DP: desvio-padrão

A capacidade antioxidante apresentada pelos extratos obtidos a partir da farinha do trigo *in natura* (FT 1, FT 2, FT 3 e FT 4) variou entre 15,5 % e 20,6 % de inibição do radical ABTS na concentração testada (125 mg.mL⁻¹).

A farinha *in natura*, independentemente do solvente e do tempo de extração, apresentou capacidade antioxidante significativamente menor que a farinha contendo micélio, o que é esperado já que o extrato de trigo integral não apresenta grande capacidade antioxidante comparado com outros cereais e frutas²².

Os extratos da farinha contendo micélio (FTF 1, FTF 2, FTF 3 e FTF 4) apresentaram valores de inibição do radical ABTS entre 25,1 % e 59,6 %. Entretanto, as menores porcentagens, assim como TEAC, estiveram correlacionadas aos extratos aquosos FTF 1 e FTF 2, enquanto as maiores capacidades antioxidantes são dadas aos extratos aquometanólicos (FTF 3 e FTF 4). O tempo de 150 minutos afetou significativamente ($p < 0,05$) o desempenho dos extratos aquosos da farinha fermentada, sendo a maior capacidade antioxidante em TEAC observada no extrato FTF 2. Os tempos de extração de 60 minutos e 150 minutos foram eficientes para a extração de todos os compostos antioxidantes solúveis em água:metanol (50:50 v/v) não demonstrando diferença estatística quanto à inibição do radical ABTS e TEAC entre as amostras FTF3 e FTF 4. Não foram localizados, na literatura científica, estudos que avaliaram a capacidade antioxidante da farinha de trigo contendo micélio. Entretanto, Ker et al¹¹, utilizando água a 100 °C para extrair os polissacarídeos do micélio, concluíram que o extrato pode funcionar como um bom antioxidante, enquanto Soares¹² não encontrou diferença significativa entre a capacidade antioxidante de diferentes extratos de cogumelo *A. brasiliensis*.

Considerando a capacidade antioxidante

encontrada *in vitro* neste estudo, foi realizada avaliação para verificar se tal capacidade antioxidante se mantinha, *in vivo*, a partir do consumo oral.

Análise da concentração de colesterol total

Os resultados das análises das concentrações dos colesteróis totais nos plasmas dos animais estão apresentados na Tabela 3.

Observa-se que os grupos de animais que receberam a dieta hipercolesterolêmica com micélio (HC) e sem micélio de *A. brasiliensis* (H) apresentaram significativamente concentrações de colesteróis totais maiores ($p < 0,05$) que os grupos P e C. A dieta contendo micélio não reduziu o nível de colesterol total dos animais.

Os dados obtidos não comprovam cientificamente o uso popular de *A. brasiliensis* como hipocolesterolêmico²⁴ e discordam de Miranda et al²⁵, que verificaram redução significativa nos níveis de colesterol total e colesterol não-HDL em ratos hipercolesterolêmicos que receberam dieta contendo 1 % de *A. brasiliensis*. Porém, é válido ressaltar que este estudo utilizou o micélio de *A. brasiliensis* fermentado sobre grãos de trigo e não o corpo de frutificação ou extrato puro como nos estudos de Miranda et al²⁵ e nos relatos populares.

Análise da capacidade antioxidante proveniente da ingestão da farinha contendo *A. brasiliensis* em plasma de hamsters hipercolesterolêmicos

O método da crocina baseado na inibição do seu branqueamento pelos radicais peróxido doado pela hidrólise térmica do ABAP perante a adição de antioxidantes foi utilizado no presente trabalho por ser um método simples e rápido para a mensuração do

Tabela 3. Concentração de colesterol total dos hamsters alimentados com diferentes dietas

Dietas experimentais/ Avaliação	P (Média ± DP)	H (Média ± DP)	C (Média ± DP)	HC (Média ± DP)
Colesterol total (mg.dL ⁻¹)	107,60 ± 9,11 ^b	165,0 ± 22,63 ^a	93,22 ± 12,53 ^b	155,90 ± 13,92 ^a

Fonte: Oliveira²³; Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa pelo teste de Turkey ($p \leq 0,05$); Grupos: P: dieta padrão, H: dieta experimental hipercolesterolêmica, C: dieta experimental com *A. brasiliensis*, HC: dieta experimental hipercolesterolêmica com *A. brasiliensis*; DP: desvio-padrão

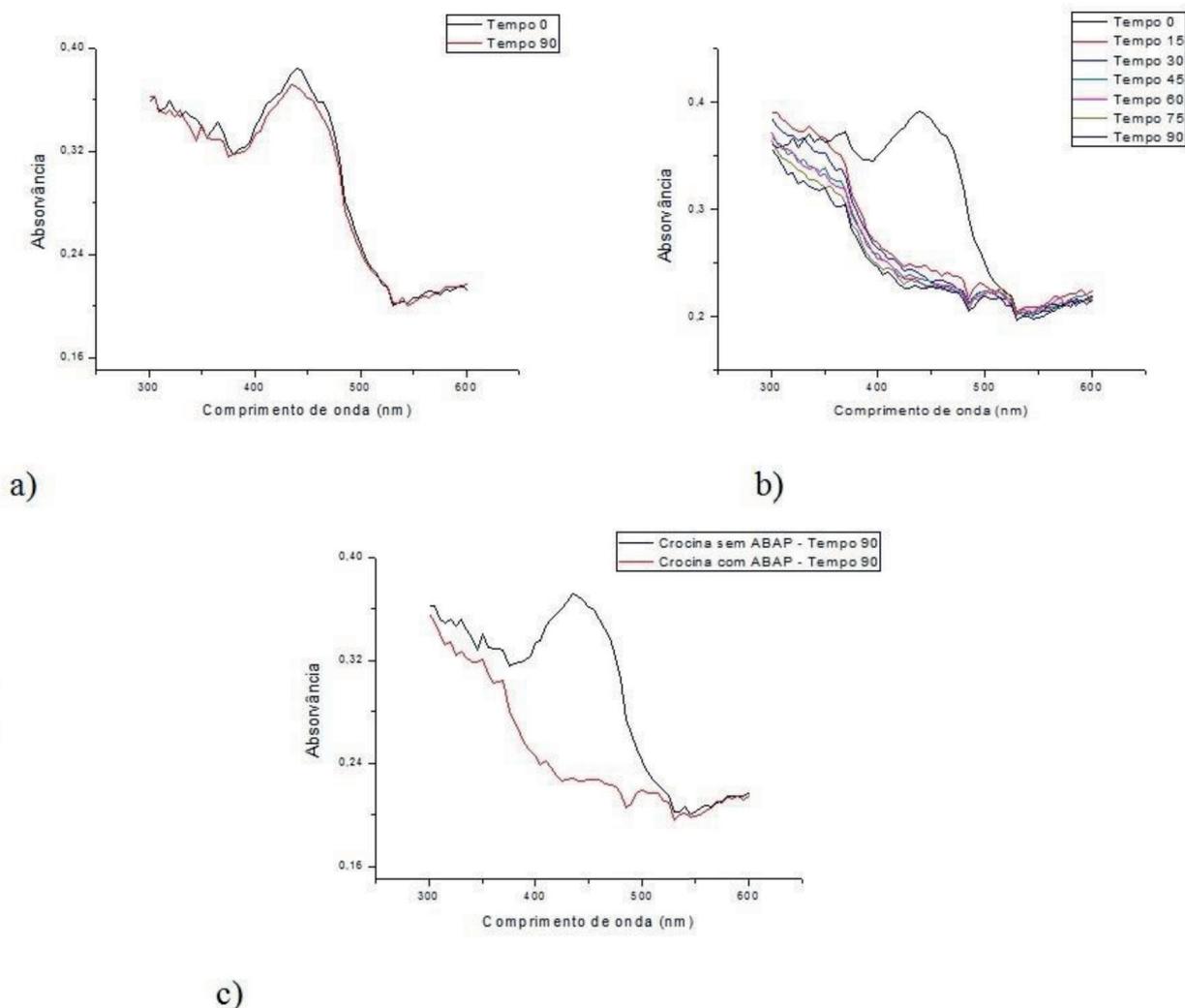


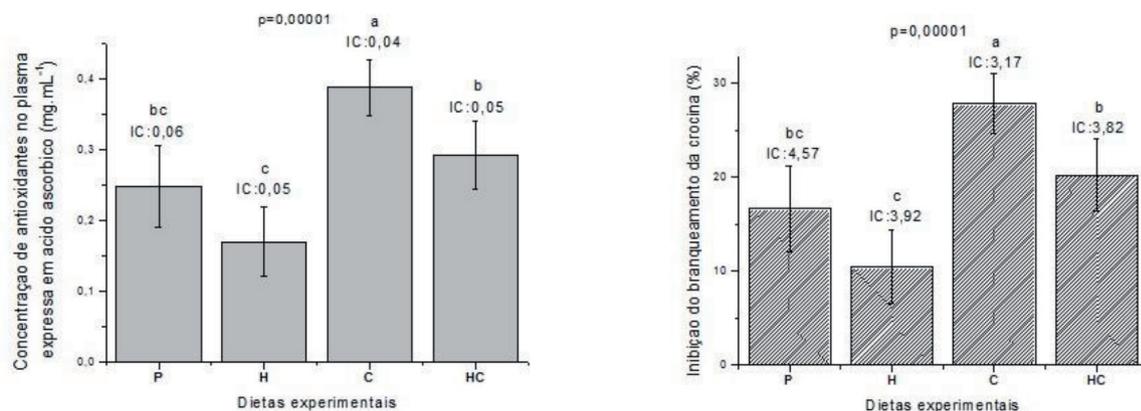
Figura 1. Absorção espectral do extrato de crocina (25 µM) na presença de tampão fosfato 10 mM, pH 7,4 e na ausência de ABAP (2,2'-azobis-(2-amidinopopane) dihydrochloride) após 90 minutos de incubação a 37 °C (a), na presença de tampão fosfato 10 mM, pH 7,4 e na presença de ABAP (2,2'-azobis-(2-amidinopopane) dihydrochloride) (5 mg.mL⁻¹) em intervalos de tempo de incubação a 37° C diferentes (b) e na ausência e na presença de ABAP (2,2'-azobis-(2-amidinopopane) dihydrochloride) (5 mg.mL⁻¹) após 90 min de incubação a 37 °C (c)

poder antioxidante em fluidos extracelulares utilizando pequenas quantidades de amostras^{19,20}. Entretanto, as análises foram feitas em espectrofotômetro ultravioleta, pois os testes realizados com ELISA mostraram que o equipamento utilizado não teve sensibilidade para analisar as diferenças nas absorvâncias das amostras. A Figura 1 apresenta as curvas que descrevem o comportamento dos espectros de absorção de luz entre 300 nm e 600 nm, do extrato de crocina utilizado nos testes com os plasmas dos hamsters submetidos aos diferentes tratamentos dietéticos.

A Figura 1 (a) mostra que o extrato de crocina no tampão fosfato 10 mM, pH 7,4, sofre pouca oxidação

durante os 90 min de incubação a 37 °C. A Figura 1 (b e c) mostra que a crocina sofre oxidação pelos radicais livres gerados pelo ABAP, e que essa oxidação é visível após 90 min de incubação a 37 °C.

Os resultados da capacidade antioxidante do plasma dos hamsters podem ser visualizados por meio da concentração de antioxidantes no plasma expressa ácido ascórbico (mg.mL⁻¹) e da porcentagem de inibição do branqueamento da crocina como mostra a Figura 2. Os resultados da concentração foram expressos em ácido ascórbico por ele ser o mais conhecido entre os antioxidantes hidrossolúveis presentes no plasma sanguíneo.



a)

b)

*Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$); P: dieta padrão; H: dieta hipercolesterolêmica; C: dieta padrão+micélio; HC: dieta hipercolesterolêmica+micélio; valores da concentração (mg.mL^{-1}) \pm intervalo de confiança (IC): P: $0,25 \pm 0,06$, H: $0,17 \pm 0,05$, C: $0,39 \pm 0,04$, HC: $0,29 \pm 0,05$; Valores da inibição do branqueamento da crocina (%) \pm intervalo de confiança: P: $16,64 \pm 4,57$, H: $10,43 \pm 3,92$, C: $27,81 \pm 3,17$, HC: $20,20 \pm 3,82$.

Figura 2. Concentração de antioxidantes no plasma dos hamsters expressa em ácido ascórbico (mg.mL^{-1}) (a) e da porcentagem de inibição do branqueamento da crocina pelos radicais gerados pelo ABAP (2,2'-azobis-(2-amidinopropane) dihydrochloride) (b)

A partir da Figura 2 (a), verifica-se que o grupo que recebeu a dieta padrão com micélio (C) apresentou maior concentração de antioxidantes ($p < 0,05$), sendo a menor concentração verificada no grupo H.

O grupo P apresentou valor de concentração de antioxidantes no plasma de $0,25 \pm 0,06 \text{ mg.mL}^{-1}$, enquanto que o grupo H, que recebeu a dieta hipercolesterolêmica, apresentou um valor inferior, mas não estatisticamente significativo, de $0,17 \pm 0,05 \text{ mg.mL}^{-1}$.

Os animais do tratamento HC apresentaram maior concentração de antioxidantes ($0,29 \pm 0,05 \text{ mg.mL}^{-1}$) que o grupo H ($0,17 \pm 0,05 \text{ mg.mL}^{-1}$), porém igual ao grupo padrão ($0,25 \pm 0,06 \text{ mg.mL}^{-1}$). Os resultados mostram que houve um efeito favorável do micélio do cogumelo *A. brasiliensis*, fazendo com que a resposta antioxidante no plasma do grupo HC aumentasse, apesar da condição de hipercolesterolemia estabelecida, se equiparando com o grupo sem alteração nos níveis de colesterol.

Com relação ao branqueamento da crocina, o grupo C apresentou a maior porcentagem de inibição (27,81 %) possivelmente pela maior disponibilidade de substâncias antioxidantes presentes na ração. O grupo HC inibiu 20,20 % do branqueamento enquanto o grupo que recebeu apenas dieta hipercolesterolêmica inibiu 10,43 % do branqueamento ($p < 0,05$), demonstrando que mesmo na situação de hipercolesterolemia, a dieta

contendo o micélio foi efetiva para proteger a oxidação da crocina.

Vasconcelos et al¹ descreve sobre o funcionamento do sistema antioxidante no organismo e resalta a importância da introdução de antioxidantes exógenos, por exemplo, da forma como foi realizada através da ração ofertada aos animais. Não foram encontrados na literatura outros trabalhos analisando a capacidade antioxidante no material biológico de animais hipercolesterolêmicos alimentados com farinha contendo *A. brasiliensis* fermentado sobre grãos de trigo. Contudo, Sá-Nakanishi et al²⁶, trabalhando com ratos idosos alimentados com extrato aquoso de *A. brasiliensis* administrado por via intragástrica, observaram que havia uma maior capacidade antioxidante total e menor estresse oxidativo, em homogenizado de tecido cerebral.

Além disso, Al-Dbas et al²⁷ observaram que o extrato de *A. brasiliensis* apresentou ação hepatoprotetora, elevando os níveis de antioxidantes e reduzindo a peroxidação lipídica em ratos com hepatotoxicidade induzida por tetracloreto de carbono. Niwa et al²⁸, mostraram que os tratamentos com extrato de *A. brasiliensis* puderam suprimir o aumento do estresse oxidativo em ratos diabéticos.

Os resultados obtidos nesse trabalho enfatizam que há um efeito sistêmico do micélio do cogumelo,

fazendo com que a resposta antioxidante do plasma aumente, tanto nos animais saudáveis como nos hipercolesterolêmicos. Indivíduos com elevados níveis de colesterol merecem atenção especial quanto à disponibilidade de substâncias antioxidantes, no caso, fornecidas pela ingestão da farinha de trigo contendo micélio na dieta do grupo HC, já que nos últimos anos vem sendo proposto que o acúmulo de LDL-c no sangue faz com que essas lipoproteínas se associem com os materiais da matriz extracelular e sofram peroxidação lipídica induzindo a resposta inflamatória e liberação de macrófagos, levando ao acúmulo de colesterol nos macrófagos e formação de células espumosas ricas em lipídeos precursoras das estrias de gordura no endotélio e das placas ateroscleróticas^{29,30}.

É importante lembrar que radicais livres estão envolvidos no desenvolvimento de doenças como aterosclerose, Alzheimer, câncer, diabetes entre outras^{6,7,31}. Assim, compostos que aumentem a antioxidação sistêmica através da administração oral, tais como o apresentado no presente trabalho, mostram-se de grande interesse na prevenção de tais doenças.

Alguns estudos sugerem que a oxidação da LDL pode provocar a aterosclerose e outras doenças cardiovasculares, entretanto o número de mortes é maior naqueles indivíduos com baixos níveis plasmáticos de vitamina C, sugerindo que a mesma pode prevenir o risco dessas doenças por evitar a oxidação da LDL^{31,32}. Sendo assim, é possível inferir que os hamsters do grupo HC tiveram menor oxidação plasmática (maior proteção para doenças cardiovasculares), uma vez que a concentração de antioxidantes no plasma (expresso em ácido ascórbico) é significativamente maior que naqueles hipercolesterolêmicos que não receberam o micélio de cogumelo (H).

Os dados aqui apresentados mostram que a farinha testada apresenta potencial antioxidante tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Tais dados mostram-se ainda mais relevantes, quando ressalva-se o fato dos testes terem sido efetuados em animais hipercolesterolêmicos. Assim, trabalhos que comprovem cientificamente as indicações do uso do cogumelo *A. brasiliensis* e proponham um provável mecanismo de ação, tais como o apresentado neste artigo, apresentam-se de grande valia para a nutrição e medicina humana. É válido lembrar ainda, que a farinha aqui estudada é de fácil produção e baixo custo quando comparada ao produto comercial. Porém, diante da dificuldade em encontrar na literatura trabalhos que

explorem a utilização dessa farinha como suplemento alimentar ou como terapia coadjuvante no tratamento das doenças produzidas pelo estresse oxidativo, mais estudos a esse respeito, especialmente em humanos, devem ser realizados.

REFERÊNCIAS

1. Vasconcelos SML, Goulart MOF, Moura JBF, Manfredini V, Benfato MS, Kubota LT. Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, antioxidantes e marcadores do dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Quim Nova*.2007;30(4):1323-38.
2. Carreiro DM. Terapia nutricional no estresse oxidativo. In: Silva SMCS, Mura JDAP, editores. Tratado de alimentação, nutrição e dietoterapia. São Paulo: Roca; 2007. p. 611-22.
3. Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. Beyond cholesterol: modification of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med*.1989;320:915-24.
4. Napoli C. Oxidation of LDL, atherogenesis, and apoptosis. *Ann N Y Acad Sci*.2003;1010:698-709.
5. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest*.2004;114:1752-61.
6. Thomas JA. Estresse oxidativo e defesa antioxidante. In: Shils ME, Olson JA, Shike M, Ross AC, editores. Tratado de Nutrição Moderna na Saúde e na Doença – 9ª ed. Barueri: Manole, 2003. p. 801-11.
7. Jordão Junior AA, Vannucchi H. Radicais livres e antioxidantes. A importância da dieta. In: Vannucchi H, editor. Nutrição Clínica. Nutrição e Metabolismo. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. p. 417-30.
8. Koury JC, Donangelo CM. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. *Rev Nutr*.2003;16(4):433-41.
9. Huang SJ, Huang LC, Chen CC, Mau JL. Antioxidant properties of *Agaricus blazei*. In: Broderick A, Nair T, editors. Proceedings of the third international conference on mushroom biology and mushroom products. Sydney, Austrália, 1999. p. 266- 74.
10. Izawa S, Inoue Y. Screening system for antioxidants using thioredoxin-deficient yeast: discovery of thermostable antioxidant activity from *Agaricus blazei* Murill. *Appl Microbiol Biotechnol*.2004;64(4):537-42.
11. Ker YB, Chen KC, Chyau CC, Guo JH, Hsieh CL, Wang HE, et al. Antioxidant capability of polysaccharides fractionated from submerge-cultured *Agaricus blazei* Mycelia. *J Agr Food Chem*.2005;53(18):7052-58.
12. Soares AA. Atividade antioxidante e compostos fenólicos do cogumelo *Agaricus blazei* Murrill. [mestrado] Maringá: Universidade Estadual de Maringá; 2007.
13. Dalla Santa HS, Rubel R, Vitola FMD, Leifa F, Tararthuch AN, Cavalcante JHLF, et al. Kidney function indices in mice after long intake of *Agaricus brasiliensis* mycelia (= *Agaricus blazei*, *Agaricus subrufescens*) produced by solid state cultivation. *Online J Biol Sci*.2009;9(1):21-8.

14. Dalla Santa HS. Efeitos no metabolismo e ação imunomoduladora em camundongos do micélio de *Agaricus brasiliensis* produzido por cultivo no estado sólido [doutorado]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2006.
15. Kuskoski EM, Ausero AG, García-Parilla MC, Troncoso AM, Fett R. Actividad antioxidante de pigmentos antocianicos. *Ciênc Tecnol Aliment*.2004;24(4):691-3.
16. Bravo E, Cantafora A, Orfu G. Why prefer the golden Syrian hamster to the Wistar rat in experimental studies on plasm lipoprotein metabolism? *Comp Biochem Physiol*.1994;107:347-55.
17. Frota KM, Mendonça S, Saldiva PH, Cruz RJ, Arêas JA. Cholesterol-lowering properties of whole cowpea seed and its protein isolate in hamsters. *J Food Sci*.2008;73(9):235-40.
18. Damy SB. Aspectos fundamentais da experimentação animal – Aplicações em cirurgia experimental. *Rev Assoc Med Bras*.2010;56(1):103-11.
19. Hadizadeh F, Mohajeri SA, Seifi M. Extraction and purification of crocin from saffron stigmas employing a simple and efficient crystallization method. *Pakistan J Biol Sci*.2010;13(14):691-8.
20. Lussignoli S, Fraccaroli M, Andrioli G, Brocco G, Bellavite P. A microplate-based colorimetric assay of the total peroxyl radical trapping capability of human plasma. *Anal Biochem*.1999;269(1):38-44.
21. Brasil, Resolução RE nº 899, 29 de maio de 2003. Guia para a validação de métodos analíticos e bioanalíticos. D.O.U. – Diário Oficial [da] União; Poder Executivo, de 02 de junho de 2003.
22. Oliveira MS, Dors GC, Souza-Soares LA, Badiale-Furlong E. Atividade antioxidante e antifúngica de extratos vegetais. *Alim Nutr*.2007;18(3):267-75.
23. Oliveira KCB. Avaliação do efeito da ingestão do micélio de *Agaricus brasiliensis* produzido por cultivo no estado sólido sobre o perfil lipídico sanguíneo de hamsters. Guarapuava: Universidade Estadual do Centro-Oeste; 2010.
24. Firenzuoli F, Gori L, Lombardo G. The medicinal [trabalho de conclusão de curso] mushroom *Agaricus blazei* Murril: review of literature and pharmaco-toxicological problems. *Evid Based Complement Alternat Med*.2009;5(1):3-15.
25. Miranda AM, Ribeiro GM, Cunha AC, Silva LS, Santos RC, Pedrosa ML, et al. Hypolipidemic effect of the edible mushroom *Agaricus blazei* in rats subjected to a hypercholesterolemic diet. *J Physiol Biochem*.2014;70(1):215-24.
26. Sá-Nakanishi AB, Soares AA, Oliveira AL, Comar JF, Peralta RM, Bracht A. Effects of treatment old rats with na aqueos *Agaricus blazei* extract on oxidative and functional parameters of the brain tissue and brain mitochondria. *Oxid Med Cell Longev*.2014;ID article 563179. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/563179>.
27. Al-Dbas AM, Al-Daihan SK, Bhat RS. *Agaricus blazei* Murril as an efficient hepatoprotective and antioxidante agent against CCl4-induced liver injury in rats. *Saudi J Biol Sci*.2012;19(3):303-9.
28. Niwa A, Tajiri T, Higashino H. *Ipomoea batatas* and *Agaricus blazei* ameliorate diabetic disorders with therapeutic antioxidant potencial in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Clin Biochem Nutr*.2011;48(3):194-202.
29. Silva DC, Cerchiaro G, Honório KM. Relações patofisiológicas entre estresse oxidativo e arteriosclerose. *Quim Nova*.2011;34(2):300-05.
30. Holvoet P, Vanhaecke J, Janssens S, Werf FV, Collen D. Oxidized LDL and malondialdehyde-modified LDL in patients with acute coronary syndromes and stable coronary artery disease. *Circulation*.1998;98:1487-94.
31. Bagchi K, Puri S. Free radicals and antioxidants in health and disease. *East Mediterr Health*.1998;4(2):350-60.
32. Nyssönen K, Porkkala E, Salonen R, Korpela H, Salonen JT. Increase in oxidation resistance of atherogenic serum lipoproteins following antioxidant supplementation: A randomized double-blind placebo-controlled clinical Trial. *Eur J Clin Nutr*.1994;48(9):633-42.

Avaliação da qualidade da carne-de-sol produzida artesanalmente

Quality evaluation of artisanal sun-dried meat (*carne-de-sol*)

RIALA6/1606

Teresa Emanuelle Pinheiro GURGEL, Maria Gilnara Lima BANDEIRA, Maria Rociene ABRANTES*, Êlika Suzianny de SOUSA, Kalianne da Silva SILVESTRE, Sidnei Miyoshi SAKAMOTO, Jean Berg Alves da SILVA

*Endereço para correspondência: Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal/LIPOA, Departamento de Ciências Animais, Universidade Federal Rural do Semi-Árido/UFERSA, Endereço: Km 47 da BR 110, Bairro Costa e Silva, Mossoró, RN, CEP: 59600-000. E-mail: rocienevet3@hotmail.com

Recebido: 02.09.2013 - Aceito para publicação: 10.06.2014

RESUMO

Neste estudo foram avaliados os parâmetros de qualidade da carne-de-sol produzida artesanalmente e comercializada no Rio Grande do Norte. Foram coletadas 80 amostras de carne-de-sol, sendo 44 de feiras livres ou mercados públicos e 36 de supermercados ou frigoríficos em cinco cidades do Rio Grande do Norte. As amostras foram submetidas às análises físico-químicas (pH, atividade de água, cinzas e umidade) e microbiológicas (*Salmonella* spp., coliformes termotolerantes e bactérias halofílicas e *Staphylococcus aureus*); e as cepas de *S. aureus* foram submetidas ao teste de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA). Um total de 96,25 % das amostras apresentaram contagem microbiana maior do que o permitido pela legislação brasileira para contagem de *S. aureus* ($\mu=4,81\text{LogUFC/g}$, em 78,75 % das amostras), *Salmonella* spp. (presença em 25 % das amostras) e coliformes termotolerantes ($\mu = 2,36 \text{ LogNMP/g}$, em 63,75 % das amostras). Quanto ao TSA das cepas de *S. aureus*, 22,5 % apresentaram resistência à gentamicina e para penicilina G, tetraciclina e cloranfenicol foram, respectivamente, 100 %, 67,5 % e 46,26 %. Nas análises físico-químicas, o pH ($\mu = 5,702$) e a Aa ($\mu = 0,868$) não constituíram barreiras eficazes contra o crescimento microbiano, o que constata que a carne de sol produzida e comercializada na região estudada apresenta-se imprópria para o consumo de acordo com a legislação brasileira.

Palavras-chave. condições sanitárias, *S. aureus*, *Salmonella* spp., bactérias halofílicas, antibiograma.

ABSTRACT

This research aimed at evaluating the quality parameters of the artisanal sun-dried meat (*carne-de-sol*) produced and commercialized in the state of Rio Grande do Norte. Eighty sun-dried meat samples were collected, being 44 from open-markets and public markets, and 36 from supermarkets or specialized stores in five cities of Rio Grande do Norte. The samples were analyzed on physicochemical (pH, water activity, moisture and ash) and microbiological (*Salmonella* spp., thermotolerant coliforms, halophilic bacteria and *Staphylococcus aureus*) analyses; and *S. aureus* strains were assayed on antibiotics sensitivity test (AST). A total of 96.25 % of samples showed *S. aureus* ($\mu = 4,81\text{LogUFC/g}$, in 78.75 % of samples), *Salmonella* spp. (in 25 % of samples), and fecal coliform ($\mu = 2,36\text{LogMPN/g}$, in 63.75 % of samples) countings higher than those allowed by Brazilian legislation. As for the AST, 22.5 % of *S. aureus* strains were resistant to gentamicin; and for penicillin G, tetracycline and chloramphenicol, the strains were 100 %, 67.5 % and 46.26 % resistant, respectively. In physicochemical analyzes, pH ($\mu = 5,702$) and Wa ($\mu = 0.868$) did not constitute the effective barriers against microbial growth. Therefore, the sun-dried meat produced and commercialized in the study area was unsuitable for human consumption according to the Brazilian legislation.

Keywords. sanitary conditions, *Salmonella*, *S. aureus*, halophilic bacteria, antibiogram.

INTRODUÇÃO

A carne-de-sol é um produto tradicional da região Nordeste. Para sua produção, a carne de origem bovina ou mais raramente caprina, é adicionada de sal e semi-dessecada. O processo consiste em procedimento artesanal, baseado na salga e exposição da carne ao ar livre ou ambiente ventilado¹, resultando em um produto semi-desidratado com características peculiares. É elaborado geralmente em pequenos estabelecimentos ou em comércios varejistas, atendendo ao consumidor que aprecia este produto².

A produção de carne-de-sol surgiu como uma alternativa na preservação do excedente de produção da carne bovina. Devido as dificuldades encontradas para a sua conservação, a população de baixo nível econômico optava pelo processo de salga e desidratação, uma vez que as condições climáticas e a disponibilidade de sal marinho no Nordeste brasileiro são bastante favoráveis a essa prática³. Esta carne é um produto regional, sendo considerado como um produto não inspecionado, implicando em condições inadequadas em relação aos aspectos higiênico-sanitários⁴.

A microbiota da carne depende das condições nas quais os animais foram criados, abatidos e processados⁵. As condições para desenvolvimento dos micro-organismos podem ser bastante complexas, sendo o crescimento influenciado por pH, umidade, atividade de água, temperatura de estocagem e outros fatores intrínsecos e extrínsecos ao alimento⁶.

Dentre os micro-organismos indicadores de qualidade dos alimentos, a quantificação do *Staphylococcus aureus* tem como objetivo a elucidação de surtos de intoxicação alimentar e o controle higiênico-sanitário dos processos de produção de alimentos^{7,8}. Além disso, a resistência do *Staphylococcus aureus* aos antimicrobianos permanece como problema que requer atenção, sendo a elevada ocorrência de resistência múltipla aos antibióticos um risco potencial para a saúde pública^{7,9}.

A carne-de-sol não possui uma regulamentação técnica específica que lhe confira definições de critérios e padrões físico-químicos e microbiológicos. A elaboração desse produto segue então, conceitos ou normas típicas regionais¹⁰. Isso torna relevante a avaliação da qualidade da carne-de-sol, sobretudo, pela preocupação sobre as condições destas carnes que podem não atender aos

padrões mínimos de qualidade sanitária, tornando-a agente de disseminação de patógenos e colocando em risco a saúde do consumidor. Dessa forma, o trabalho objetivou avaliar parâmetros de qualidade (físico-químicos e microbiológicos) da carne-de-sol produzida artesanalmente e comercializada no Rio Grande do Norte.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

As amostras foram coletadas aleatoriamente em cinco cidades do estado do Rio Grande do Norte - Mossoró, Apodi, Areia Branca, Baraúnas e Grossos. Foram adquiridas 80 amostras de carne-de-sol, sendo 44 de comércio informal (feiras livres ou mercados públicos) e 36 de comércios formais (supermercados e frigoríficos).

Foi selecionada para o experimento a carne-de-sol produzida a partir do coxão duro, por sua maior disponibilidade. A coleta foi realizada pela manhã, sendo pesadas e embaladas pelos funcionários utilizando material do próprio estabelecimento e levadas, sob refrigeração, para o laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal (LIPOA) da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA). As amostras pesavam aproximadamente 300 g e o início das análises ocorreu em menos de duas horas após as coletas.

Análises microbiológicas

No preparo das amostras, foram pesadas asepticamente duas alíquotas de 25 g de cada amostra, sendo uma homogeneizada em 225 mL de água peptonada a 1% tamponada (para a pesquisa de *Salmonella*) e a outra em 225 mL de água peptonada a 0,1% (para a pesquisa de coliformes termotolerantes, *Staphylococcus aureus* e bactérias halofílicas), ambas por meio de agitação em *stomacher*.

A partir da diluição desta última (diluição 10⁻¹), foram obtidas as demais diluições, até a 10⁻³. Em seguida, foram submetidas às técnicas recomendadas para verificação de NMP de coliformes termotolerantes e contagem de *S. aureus* e bactérias halofílicas seguindo as recomendações da Instrução Normativa n° 62 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento¹¹. Os valores obtidos foram comparados às normas pré-estabelecidas pela Resolução RDC n° 12, de 12 de janeiro de 2001¹², a qual relaciona os padrões microbiológicos para alimentos. Como não há um item específico, os padrões utilizados foram

para o “charque, jerked beef e similares”. A resistência antimicrobiana das cepas de *S. aureus* foi avaliada para quatro diferentes antibióticos.

Análise de *Salmonella* spp.

A pesquisa de *Salmonella* spp., iniciou-se com a etapa de pré-enriquecimento adicionando 25 g da amostra em 225 mL de água peptonada a 1% tamponada (diluição 10^{-1}), sendo incubada em estufa por 16 horas a 36 °C. Para o enriquecimento seletivo, alíquotas de cada amostra de volumes: 0,1 mL, 1 mL, 1 mL foram inoculadas nos caldos seletivos: Rappaport Vassiliadis (RR), Selenito-cistina e Tetracionato (TT), respectivamente, e incubados a 41 °C por 24 h em banho-maria. Posteriormente foram repicados em placas de Agar SS e EMB Agar Base e incubados em estufa por 24 h a 36 °C. Colônias suspeitas foram submetidas a provas bioquímicas específicas para a confirmação de *Salmonella* spp.

Análise de coliformes

A quantificação de coliformes iniciou-se com a prova presuntiva a qual consiste na incubação das diluições em caldo Lauril Sulfato de Sódio a 36 °C \pm 1 °C por 48 h. Os tubos com produção de gás foram inoculados em caldo Verde Brilhante Bile Lactose a 2% a 36 °C \pm 1 °C por 48 h para confirmação de coliformes totais e em tubos com caldo *Escherichia coli* (EC) a 45 °C \pm 0,5 °C por 48 h para coliformes termotolerantes. Após a leitura foi verificado o número mais provável de coliformes totais e de termotolerantes.

Contagem de *Staphylococcus aureus*, bactérias halofílicas e Teste de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA)

Para a detecção de *S. aureus* e bactérias halofílicas, procedeu-se a inoculação de 1,0 mL de cada diluição em Agar Baird-Parker e “Plate Count Agar” (PCA) adicionado com 0,2% de NaCl, sendo incubados em estufa a 36 °C por 48 h para posterior contagem das unidades formadoras de colônias.

Colônias típicas de *S. aureus* de cada amostra foram selecionadas e confirmadas conforme o descrito na Instrução Normativa nº 62 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento¹¹ e submetidas ao TSA utilizando Cloranfenicol, Gentamicina, Penicilina G e Tetraciclina, conforme recomendação de Bauer et al¹³. As colônias foram transferidas para caldo BHI e após 24 horas à 36 °C foram inoculadas em placas contendo meio Ágar Mueller-Hinton, com auxílio de

swabs, com posterior inserção dos discos de antibióticos. Para tanto as placas foram incubadas invertidas a 36 °C em estufa por um período de 24 horas. Em seguida foi medido o diâmetro dos halos de inibição com auxílio de paquímetro.

Análises físico-químicas

As amostras foram avaliadas em relação ao aspecto de umidade e cinzas, segundo as especificações dos Métodos Analíticos Oficiais para Controle de Produtos de Origem Animal e seus Ingredientes¹⁴ e ainda pH e atividade de água.

A determinação da umidade foi realizada por meio da diferença de peso entre a amostra úmida (antes de ser colocada na estufa à 102 °C por 2 horas) e a amostra seca. Quanto às cinzas, as amostras foram incineradas em forno-mufla à 550 °C, e o resultado deu-se pela diferença entre a amostra úmida e a incinerada. O pH foi detectado por meio de aferição direta com o auxílio de um pHmetro marca PHTEK, modelo PHS-3B e a atividade de água foi determinada através do aparelho TESTO 650.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Considerando que as amostras de carne-de-sol analisadas estavam disponíveis no comércio apenas sob a forma à granel, foi dispensada a amostragem estatística, sendo procedida a colheita de amostra indicativa, aplicando-se o plano amostral do tipo duas classes, que classifica a unidade amostral analisada como aceitável ou inaceitável para determinado micro-organismo, quando comparada ao limite de tolerância M para a amostra indicativa^{2,12}. Os resultados das análises microbiológicas obtidas das amostras de carne-de-sol analisadas estão expressos em logaritmo e apresentados na Tabela 1.

A RDC nº 12/2011 da ANVISA¹², que dispõe sobre os padrões microbiológicos para alimentos, estabelece limite máximo de 5×10^3 UFC/g (log₁₀ igual a 3,699) e 10^3 NMP/g (log₁₀ igual a 3) para Estafilococos coagulase positivo e coliformes a 45°C, respectivamente, além de ausência de *Salmonella* spp. em 25g de amostra para “charque, jerked beef e similares”, não havendo um item específico para carne-de-sol na referida RDC. Visando apresentar-se em conformidade com a legislação vigente torna-se necessário na produção de carne-de-sol o emprego de uma tecnologia de processamento e do atendimento aos padrões oficiais de identidade e qualidade para a sua produção, comercialização e distribuição a fim de se obter o produto em condições sanitárias satisfatórias

e que não ofereça riscos ao consumidor.

A presença de *Salmonella* spp. em 25% das amostras é preocupante (Tabela 1). Leite Junior¹⁵ em uma avaliação microbiológica da carne de sol comercializada na cidade de Campina Grande/PB, armazenada com e sem refrigeração, observou que 40% das amostras comercializadas à temperatura ambiente e 30% das amostras armazenadas sob refrigeração estavam contaminadas com *Salmonella* spp. Trata-se de um micro-organismo amplamente difundido na natureza, sendo os animais e o ambiente seus principais reservatórios naturais¹⁶. A contaminação do alimento com esse patógeno pode ocorrer durante o manuseio devido à manipulação incorreta, controle inadequado de temperatura ou ainda contaminação cruzada¹⁷. De acordo com Evangelista¹⁸ alimentos deixados expostos ao ambiente durante muito tempo são mais vulneráveis a multiplicação de salmonelas.

Na pesquisa de coliformes termotolerantes, 51 amostras estavam fora dos padrões estabelecidos pela legislação, com média em torno de 2,36 LogNMP/g. A presença de coliformes termotolerantes pode ser utilizada como indicador de contaminação e das condições higiênico-sanitárias insatisfatórias dessa carne¹⁹. Farias²⁰, avaliando a qualidade da carne de sol de João Pessoa-PB, encontrou coliformes termotolerantes com valores de $3,0 \times 10$ a $4,3 \times 10^7$ NMP/g nas amostras. O autor observou que apenas uma amostra estaria de acordo com a legislação. Em alimentos manipulados, a presença de coliformes termotolerantes pode indicar a ocorrência de contaminação fecal após o processamento, evidenciando práticas de manufatura em desacordo com os padrões previstos na legislação de processamento de alimentos^{21,22}.

A carne-de-sol pode ter sido contaminada durante o processo de fabricação, devido ao elevado número de micro-organismos nas amostras coletadas.

A média encontrada para *S. aureus* foi de 4,81 LogUFC/g, com um total de 63 amostras fora do limite preconizado, sendo considerados valores altos para os padrões da RDC n°12/2001¹² (Tabela 1). Bactérias do gênero *Staphylococcus* presentes em alimentos indicam falhas na higiene dos manipuladores, visto que estas bactérias são encontradas na pele, mucosas, intestino e trato respiratório humano^{23,24} e como a carne de sol é exposta, ao público, sem nenhum tipo de embalagem, pode ser tocada por qualquer pessoa que desejar, e ser contaminada por esses micro-organismos²¹.

Quanto as bactérias halofílicas, foi encontrada a média de 4,87 LogUFC/g. Esta contagem pode estar associada ao ambiente salino encontrado nesse tipo de carne que favorece o desenvolvimento destas bactérias. Grant et al.²⁵ afirmaram que a fonte da contaminação por bactérias halofílicas em produtos curados é o sal obtido a partir de salinas naturais ou lagos de sal. Estas bactérias produzem “vermelhão” no produto, sendo estes os micro-organismos mais problemáticos para os alimentos salgados²⁶.

Alves²⁷ analisando a carne soleada do pantanal, equivalente à carne-de-sol, encontrou *S. aureus* com média de 4,43 LogUFC/g, sendo esse valor acima do tolerável (5×10^3 UFC/g) de acordo com os parâmetros adotados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária¹², sugerindo assim a inadequação do produto para a venda. Costa e Silva²⁸ detectaram elevadas contagens de *S. aureus* (média de 6,78 LogUFC/g) em carne de sol. Nesse trabalho, os autores observaram também contagens superiores a 5,0 LogUFC/g para este micro-organismo e afirmaram que este valor representa riscos quanto a possibilidade de formação de enterotoxinas capazes de desencadear intoxicações alimentares.

S. aureus apresenta características seletivas que o favorece em relação a outras bactérias, pois são

Tabela 1. Média logarítmica dos micro-organismos em amostras de carne-de-sol produzidas artesanalmente e comercializadas em municípios do RN (2011)

Micro-organismos	Média	Padrão ANVISA
<i>S. aureus</i> (UFC/g)	4,81 LogUFC/g	3,69 LogUFC/g
Coliformes termotolerantes (NMP/g)	2,36 LogNMP/g	3 LogUFC/g
<i>Salmonella</i> spp.(em 25 g)	Presente em 25 % das amostras	Ausente em 25g
Bactérias halofílicas(UFC/g)	4,87 LogUFC/g	-

Tabela 2. Valores mínimos, máximos e a média dos parâmetros físico-químicos para amostras de carne de sol produzidas artesanalmente e comercializadas em municípios do RN (2011)

Componente	Mínimo	Máximo	média ± p
Aa	0,827	0,955	0,868 ± 0,076
pH	4,55	6,80	5,702 ± 0,418
Umidade	46,956	73,092	57,587 ± 9,624

tolerantes a concentrações de até 20 % de cloretos, ambiente facilmente encontrado na carne-de-sol, podendo representar um perigo adicional devido à diminuição de micro-organismos competidores^{28, 29}.

Quanto ao perfil de sensibilidade aos antimicrobianos as amostras de *S. aureus* isoladas mostraram resistência *in vitro* em 100 % das aplicações de penicilina G, 67,5 % de tetraciclina, 46,25 % de cloranfenicol e 22,5 % de gentamicina, sendo este último o antibiótico com melhores valores de eficácia na inibição. Kuchenbecker³⁰, pesquisando a resistência de *S. aureus* em produtos de origem animal, observou a sensibilidade de 100 % de suas amostras à gentamicina e as maiores resistências foram verificadas frente a penicilina G, tetraciclina, norfloxacin e canamicina.

Com o desenvolvimento de drogas cada vez mais específicas e de largo espectro, a resistência ao *S. aureus* permanece como problema que requer atenção. A elevada ocorrência de resistência múltipla a antibióticos apresenta risco potencial para a saúde pública e pode dificultar o tratamento de doenças humanas e de animais, agravando quadros clínicos^{7,9}. Martins et al.⁷ afirmam que é extremamente relevante a necessidade de conscientização dos manipuladores sobre as práticas corretas de higienização das mãos, pois o número de cepas desse micro-organismo com resistência múltipla é bastante elevado.

Os resultados das análises de pH, atividade de água e umidade estão apresentados na Tabela 2, com média e desvio padrão ($\mu \pm p$) e em valores de mínimo e máximo encontrados.

Os valores de pH das amostras de carne de sol estavam dentro dos padrões de qualidade que varia de 5,8 a 6,0 apesar do cloreto de sódio presente ter a capacidade de elevar o valor do pH³¹. A atividade de água resultou numa média de 0,86 possibilitando o desenvolvimento

de micro-organismos, mesmo a carne tendo sido desidratada pelo sal e exposta à temperatura ambiente ou até mesmo sob refrigeração sem embalagem adequada. Essas características físico-químicas contribuem para uma vida-de-prateleira reduzida, que é de três a cinco dias, tempo considerado insuficiente para entrar em uma escala industrial. A umidade apresentou média de 57,5 %. Em relação a cinzas foram observados valores que variaram de 2,36 a 10,1 % e média de 7,73 %. Esta variação elevada no teor de cinzas nas amostras analisadas pode ser credenciada à falta de padronização durante a etapa de salga, o que pode influir diretamente na conservação e nos caracteres sensoriais do produto.

Não houve diferença para os resultados encontrados nos diferentes tipos de estabelecimentos. Porém, a diferença encontrada entre as amostras indica que, além da falta de padronização dos processos, ocorre também uma ausência do poder público na fiscalização e conscientização das Boas Práticas de Fabricação destes produtores e/ou distribuidores de alimentos.

CONCLUSÃO

A carne-de-sol avaliada representa um risco à saúde do consumidor, não estando apta ao consumo, tornando necessária a padronização de processos, além da aplicação das Boas Práticas de Fabricação e a maior atuação da fiscalização sanitária de cada município. Ressalta-se ainda, a falta de padronização do produto que resultou em variação nos valores dos parâmetros físico-químicos em cada cidade e até mesmo em cada ponto de venda, mostrando a necessidade de estabelecimento de uma legislação específica para este produto que apresenta características peculiares.

REFERÊNCIAS

1. Souza NL. Efeito da combinação de sal com lactato e diacetato de sódio nas características sensoriais, físico-químicas, cor e textura de um produto similar à carne de sol [dissertação de mestrado]. Campinas, São Paulo (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2005.
2. Mennucci TA. Avaliação das condições higiênico-sanitárias da carne-de-sol comercializada em “casas do norte” no município de Diadema – SP [dissertação de mestrado]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo; 2009.
3. Nóbrega DM, Shineider IS. Contribuição ao estudo da carne de sol visando melhorar sua conservação. *Hig Aliment*.1983;2(3):150-4.
4. Azevedo ARP, Morais TVM. A tecnologia da produção da carne-de-sol e suas implicações nos aspectos higiênicos-sanitários. *Rev Nac Carne*.2005;336:36-50.
5. Silva JA. Microbiologia da carcaça bovina: Uma revisão. *Rev Nac Carne*.1997;24(10):62-87.
6. International Commission on Microbiological Specifications for Foods -ICMSF of the International Union of Biological Societies *Microorganisms in Foods: Microbial Ecology of Food Commodities*. 1998; p.711.
7. Martins SCS, Martins CM, Albuquerque LMB, Fonteles TV, Rego SL, Junior GSF. Perfil de resistência de cepas de *staphylococcus coagulase positiva* isoladas de manipuladores de alimentos. *Bol CEPPA*.2009;27(1):43-52.
8. Franco BDGM, Landgraf M. *Microbiologia dos alimentos*. São Paulo: Editora Atheneu; 1996.
9. Rodriguez CA, Vesga O. *Staphylococcus aureus* resistente a vancomicina. *Biomédica*. 2005;25:575-887.
10. Sousa S, Oliveira MR, Silva GDNE, Santos JG, Moreira RT, Ishihara YM. Análise microbiológica da carne-de-sol comercializada no município de Soledânea-PB. I Jornada nacional da agroindústria; outubro de 2006.
11. Brasil. Ministério da Agricultura. Instrução Normativa nº 62 de 26 de Agosto de 2003. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. Diário Oficial [da] União. Brasília, DF, 18 set. 2003. Seção 1, p.14.
12. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. Diário Oficial [da] Republica Federativa do Brasil. Brasília, DF, 10 jan. 2001. Seção 1, nº7-E.
13. Bauer AW, Kirby VMM, Sherris JC, Turck M. Antibiotics susceptibility testing by a stantardized single disk method. *Am J Clin Pathol*.1965;45(4):493-6.
14. Brasil. Ministério da Agricultura. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. LANARA. Métodos analíticos oficiais para o controle de produtos de origem animal e seus ingredientes. II. Métodos físicos e químicos. Brasília, DF, 1981.
15. Leite Junior AFSL. Avaliação da qualidade microbiológica da carne-de-sol, comercializada à temperatura ambiente ou sob refrigeração, em Campina Grande, Paraíba. *Hig Aliment*.2000;14(68/69):87-92.
16. Moura APBL, Pinheiro Junior JW, Oliveira RBA, Duarte DAM, Ribeiro AR, Reis EMF. Pesquisa de Coliformes Termotolerantes, Totais e *Salmonella* spp. em Carnes Caprinas Comercializadas na Cidade do Recife, Pernambuco. *Arq Inst Biol*.2007;74(4):293-9.
17. Franco BDGM, Landgraf M. *Microbiologia dos alimentos*. São Paulo: Atheneu; 2008.
18. Evangelista J. *Tecnologia de alimentos*. 2ªed. São Paulo: Atheneu; 2001.
19. Oliveira S, Silva JA, Maciel JF, Aquino JS. Avaliação das condições higiênico-sanitárias de carne bovina comercializada em supermercados de João Pessoa. *Alim Nutr*.2008;19(1):61-6.
20. Farias SMOC. Qualidade da carne de sol comercializada na cidade de João Pessoa-PB [dissertação de mestrado]. João Pessoa (PB): Universidade Federal da Paraíba; 2010.
21. Costa EL, Silva AJ. Qualidade sanitária da carne de sol comercializada em açougues e supermercados de João Pessoa - PB. *Bol CEPPA*.1999;17(2):137-44.
22. Leitão MFF. *Microbiologia de Alimentos*. In: Roitman I, Travassos LR, Azevedo JL. *Tratado de microbiologia*. São Paulo: Manole; 1988.
23. Germano PML, Germano MIS. *Higiene e vigilância sanitária de alimentos*. 3ªed. São Paulo: Manole; 2008.
24. Jay JM. *Microbiologia de alimentos*. 6ªed. Porto Alegre: Artmed; 2005.
25. Grant WD, Kamekura M, Mcgenity TJ, Ventosa A. Class III Halobacteria Class. Nov. Order I. Halobacteriales, In: DR Boone, GM Garrity (Eds.). *The Archaea and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria*. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, v. 1. New York: Springer-Verlag; 2001. p. 294-334.
26. Vaz J, Lopes B, Sousa J. *Processamento de Bacalhau Salgado Seco*. Instituto Politécnico de Coimbra; 2007.
27. Alves LL, Delbem ACB, Abreu UGP, Lara JAF. Avaliação físico-química e microbiológica da carne soleada do Pantanal. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2010; 30(3):729-34.
28. Costa LE, Silva AJ. Avaliação microbiológica da carne-de-sol elaborada com baixos teores de cloreto de sódio. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2001;21(2):149-53.
29. Frazier WC, Westhoff DC. *Microbiologia de los Alimentos*. 4ªed. Zaragoza: Acribia; 2000.
30. Kuchenbecker BS. Capacidade enterotoxigênica e perfil de resistência de *Staphylococcus aureus* isolados de produtos de origem animal inspecionados no Brasil [tese de Doutorado]. Porto Alegre (RS): Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2009.
31. Ordóñez Pereda JA. *Tecnologia de alimentos: alimentos de origem animal*. Porto Alegre: ARTMED; 2005.

Pesquisa de *Cronobacter* spp. em fórmulas infantis desidratadas

Screening the dehydrated powdered infant formulae for *Cronobacter* spp.

RIALA6/1607

Marcelo Luiz Lima BRANDÃO^{1*}, Natália Scudeller UMEDA¹, Ivano de FILIPPIS²

*Endereço para correspondência: ¹Laboratório de Microbiologia de Produtos, Setor de Alimentos, Departamento de Microbiologia, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil, 4365. Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, CEP 21040-900. Tel: (21) 3865-5161. E-mail: marcelo.brandao@incqs.fiocruz.br

²Laboratório de Micro-organismos de Referência, Setor de Bactérias e Arqueas de Referência, Departamento de Microbiologia, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz

Recebido: 10.01.2014 - Aceito para publicação: 26.06.2014

RESUMO

Cronobacter spp. é uma bactéria oportunista associada a surtos de infecção em neonatos e crianças em virtude de consumo de fórmulas infantis desidratadas (FID). Neste contexto, o setor regulador tem criado normas específicas para o controle destes agentes patogênicos nas fórmulas infantis. Neste estudo foi pesquisada a ocorrência de *Cronobacter* spp. em 60 amostras de FID comercializadas no Rio de Janeiro, Brasil. Foram analisadas 30 amostras de fórmulas infantis para lactantes (0-6 meses) e 30 de fórmulas infantis de seguimento para lactantes (> 6 meses) seguindo-se a metodologia de cultivo descrita no *Bacteriological Analytical Manual Online-FDA* (2012). A identificação das colônias características foi realizada com uso de kits ID32E, API20E e do sistema Vitek 2.0; e pela reação da polimerase em cadeia (PCR) com alvo no gene *gluA*. Nenhuma amostra apresentou contaminação por *Cronobacter* spp. Concluiu-se que a ocorrência de *Cronobacter* spp. em FID parece ser baixa, o que indica que os produtores estão cumprindo o disposto nas normas brasileiras vigentes de forma a evitar a contaminação dos produtos por este micro-organismo.

Palavras-chave. *Cronobacter* spp., formula infantil desidratada, PCR.

ABSTRACT

Cronobacter spp. is an opportunistic bacterium that is associated with infection outbreaks in neonates and infants due to the consumption of powdered infant formulas (PIF). In this context, the official regulator sector has created the specific standards for the industries to control these pathogens in the PIF. The present study aimed at evaluating the occurrence of *Cronobacter* spp. in 60 samples of PIF commercialized in Rio de Janeiro, Brazil. Thirty samples of infant formulas (0-6 months) and 30 samples of follow-up infant formulas (> 6 months) were analyzed according to the conventional methodologies described in the *Bacteriological Analytical Manual Online-FDA* (2012). The identification of characteristic colonies was performed using kits ID32E, API20E and Vitek 2.0 system and polymerase chain reaction (PCR) targeting the *gluA* gene. No sample showed contamination by *Cronobacter* spp. The occurrence of *Cronobacter* spp. in PIF seems to be low, indicating that the producers are complying with the provisions of the Brazilian standards in force to avoid the product contamination by this microorganism.

Keywords. *Cronobacter* spp., powdered infant formulae, PCR.

INTRODUÇÃO

O leite humano é internacionalmente reconhecido como a melhor forma de nutrição para neonatos. Contudo, existem casos em que ele pode ser insuficiente ou não estar disponível. Nestes casos, uma das opções para dieta dos neonatos é o uso de fórmulas infantis desidratadas (FID)¹. *Cronobacter* spp. é considerado um patógeno emergente que representa perigo microbiológico em FID, por causar infecções, particularmente em neonatos de baixo peso ou imunodeficientes, internados em hospitais. As principais síndromes clínicas das infecções por *Cronobacter* spp. incluem meningite, enterocolite necrosante e bacteremia; associadas com alta taxa de mortalidade².

As infecções causadas por *Cronobacter* spp. são raras e geralmente não são notificadas². No Brasil, casos de infecções por *Cronobacter* spp. em crianças e neonatos já foram reportados³. Contudo, este número é provavelmente subestimado, uma vez que a identificação correta destes micro-organismos nos serviços de assistência à saúde é dificultada pela ausência de métodos adequados disponíveis nestes serviços⁴.

Em 2008, o *Codex Alimentarius* publicou uma revisão do Código de Prática de Higiene para fórmulas em pó para lactantes de primeira infância (CAC/RCP 66 – 2008)¹, que cria um critério para *Cronobacter* spp. no controle da qualidade de fórmulas infantis em pó para lactantes (FIL) e FIS com propósitos médicos especiais, sendo estipulado um plano de duas classes com: $n = 30$, $c = 0$, e $m = 0/10g$; onde 'n' é o número de amostras que devem estar em conformidade com o critério; 'c' é o número máximo de unidades defeituosas da amostra em um plano de duas classes; e 'm' é o limite microbiológico que, em um plano de duas classes, separa o produto com qualidade satisfatória do produto defeituoso. Já para fórmulas de seguimento para lactantes em pó (FIS), a Comissão decidiu que, em países com substancial população de bebês até doze meses com comprometimento imunológico, devem ser adotados para FIS os mesmos critérios para FIL. No Brasil, a Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) n.º 12/2001⁵, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que estabelece os padrões microbiológicos para alimentos, não contempla o padrão de pesquisa de *Cronobacter* spp. para FIL. Entretanto, tendo em vista a preocupação com o risco da contaminação de FID por *Cronobacter* spp., a ANVISA publicou em 2011 as RDC n.º 43⁶, 44⁷ e 45⁸, que estabelecem o regulamento técnico para FIL; para FIS; e

para FIL e FIS destinadas a necessidades dietoterápicas específicas, respectivamente. Nestas resoluções, foi adotado que os fabricantes devem cumprir o disposto no CAC/RCP 66 – 2008¹ e suas atualizações.

A maioria dos trabalhos que pesquisaram *Cronobacter* spp. em FID utilizaram a norma ISO/TS 22964⁹, atualmente ainda em vigor. Contudo, relatos de resultados errôneos demonstraram que esta metodologia não é confiável e precisa ser melhorada⁴. Recentemente, o *Food and Drug Administration* (FDA) publicou uma revisão da metodologia para detecção/isolamento de *Cronobacter* spp. em FID¹⁰. Essa nova metodologia apresentou sensibilidade e especificidade satisfatória para identificação de *Cronobacter* spp. nestes produtos e ainda não foram observados trabalhos na literatura que apontem falhas nesta técnica.

Tendo em vista a escassez de dados relativos à prevalência de *Cronobacter* spp. em FID comercializadas no Brasil, o objetivo deste estudo foi determinar a ocorrência deste patógeno em FIL e FIS.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

Um total de 60 amostras de FID foi analisado. As amostras foram compostas por 24 amostras de FIL (0-6 meses); seis de FIL destinadas a necessidades dietoterápicas específicas à base de proteína de soja (0-6 meses); 21 de FIS (6-12 meses); seis de FIS destinadas a necessidades dietoterápicas específicas à base de proteína de soja (6-12 meses) e três de FIS (10-12 meses). As FIL foram produzidas por cinco fabricantes e compostas por 21 marcas distintas. As FIS foram produzidas por quatro fabricantes e compostas por 10 marcas distintas. As amostras foram coletadas de forma aleatória, em diferentes estabelecimentos (supermercados e drogarias) nos municípios do Rio de Janeiro e Niterói do Estado do Rio de Janeiro no período de março a agosto de 2013. A escolha das marcas foi de acordo com a disponibilidade no comércio durante o período de análises.

Cepas bacterianas

As cepas de *Cronobacter sakazakii* ATCC 29544 (INCQS 00578) e de *Escherichia coli* ATCC 25922 (INCQS 00033) foram utilizadas como controle positivo e negativo, respectivamente, dos meios de cultivo utilizados nas análises microbiológicas. A cepa de *C. sakazakii* também foi utilizada como controle positivo dos

testes utilizados na caracterização fenotípica.

Análise microbiológica

A pesquisa de *Cronobacter* spp. foi realizada pelo método de cultivo descrito por Chen e colaboradores¹⁰. Cem gramas da amostra foram homogeneizadas com 900 mL de água peptonada tamponada (Merck, Inglaterra) com incubação a 35 ± 2 °C por 24 ± 2 h. Posteriormente, o pré-enriquecimento foi homogeneizado e duas alíquotas de 40 mL foram centrifugadas a 3.000 g/10 min (Eppendorf 5810R, A-4-81, Alemanha). O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspense em 200 µL de salina tamponada fosfatada. A partir de cada alíquota, foi realizada uma semeadura pela técnica de esgotamento e *spread plate* (100 µL da suspensão) em “Brilliance *Enterobacter sakazakii* agar” (DFI formulation; Oxoid, Inglaterra), “*Enterobacter sakazakii* chromogenic plating agar” (ESPM; R&F Products Inc., EUA) e “*Enterobacter sakazakii* isolation agar” (ESIA; AES Chemunex, França). As placas de DFI e ESPM foram incubadas a 35 ± 2 °C por 24 h. As placas de ESIA foram incubadas a 44 ± 2 °C por 24 h. As colônias características foram semeadas em ágar nutriente (BD, EUA) e caldo infusão cérebro-coração (BHI; Merck, Alemanha) incubados a 35 ± 2 °C por 24 h para realização dos ensaios posteriores.

Identificação de *Cronobacter* spp. por caracterização fenotípica

As culturas crescidas no ágar nutriente foram submetidas à confirmação bioquímica com uso dos kits miniaturizado ID 32E e API 20E (bioMérieux, França) e do sistema semi-automatizado Vitek 2.0 com uso de cartões GN TEST KIT VTK2 (bioMérieux, EUA), de acordo com as instruções do fabricante.

Identificação de *Cronobacter* spp. por reação da polimerase em cadeia

A partir das culturas crescidas em BHI, foi realizada a extração de DNA com uso do kit comercial *Dneasy Blood & Tissue* (Qiagen, EUA), de acordo com as instruções do fabricante, sendo eluído um volume final de 100 µL. Posteriormente as culturas foram submetidas a reação da polimerase em cadeia (PCR) com alvo no gene *gluA*, responsável pela atividade 1,6 α-glicosidase, para amplificação de um fragmento de 105 pares de base (pb) segundo o protocolo descrito por Iversen e colaboradores¹¹.

O DNA extraído da cepa de *C. sakazakii* ATCC

29544 (INCQS 00578) e água livre de DNA/RNA (BioBasic, Canadá) foram utilizados como controle positivo e negativo, respectivamente. Foram utilizadas salas segregadas para extração de DNA, preparo das reações, amplificação do DNA e eletroforese, de forma a evitar contaminação cruzada das amostras.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nenhuma amostra de FID analisada apresentou contaminação por *Cronobacter* spp. As amostras de FIS não apresentaram crescimento de colônias em nenhum dos meios cromogênicos utilizados e dentre as amostras de FIL, apenas uma amostra apresentou colônias características (atividade α-glicosidase positiva) nos três meios cromogênicos. Contudo, as colônias suspeitas selecionadas não foram confirmadas como *Cronobacter* spp. tanto com o uso de técnicas fenotípicas como pela PCR. Apesar do ESIA não ser recomendado pela metodologia do FDA¹⁰, o mesmo foi incluído neste estudo por ser o meio cromogênico recomendando na metodologia ISO/TS 22964⁹. O ESIA apresentou o mesmo resultado dos meios DFI e ESPM, propiciando apenas o crescimento da cepa não-*Cronobacter* na amostra de FIS. Na caracterização fenotípica, a cepa não-*Cronobacter* também apresentou atividade α-glicosidase positiva, tanto no ID 32E quanto no Vitek 2.0, que é exatamente o marcador utilizado nos meios cromogênicos.

O protocolo de PCR utilizado neste estudo foi considerado 100 % sensível e específico para identificação do gênero *Cronobacter* pelos autores que o descreveram¹¹. O protocolo já foi aplicado na identificação de *Cronobacter* spp. em outros estudos e também apresentou resultados satisfatórios⁴. Logo, considerando o resultado obtido na PCR como método de referência, as técnicas fenotípicas empregadas neste estudo foram consideradas eficazes na identificação correta da cepa não-*Cronobacter* na amostra de FIS. Contudo, problemas na sensibilidade e especificidade com o uso do API 20E^{4,11} e do ID 32E^{11,12} já foram observados. Logo, o Vitek 2.0 parece ser o método fenotípico mais confiável, sendo considerado uma ferramenta de acurácia para identificação de cepas de *Cronobacter* spp.¹⁰.

Os resultados obtidos na avaliação das amostras de FIL foram similares a estudos realizados em outros países após a publicação do documento do *Codex Alimentarius*¹, que pesquisaram *Cronobacter* spp. e não encontraram nenhuma amostra contaminada^{13,14}. No

Brasil, Santos e colaboradores¹² detectaram *Cronobacter* spp. em 20,0 % (3/15) e em 85,7 % (6/7) das amostras de FIL e FIS, respectivamente, que analisaram na cidade de Campinas/SP. Contudo, este percentual pode estar associado ao fato de que no período do estudo (2007) os fabricantes não necessitavam cumprir o disposto no CAC/RCP 66 – 2008¹. Em pesquisas realizadas também no Estado de São Paulo após a publicação do CAC/RCP 66 – 2008¹, nenhuma amostra de FID contaminada com *Cronobacter* spp. foi encontrada^{14,15}.

A FAO/WHO² recomenda a pesquisa de *Enterobacteriaceae* em FID. Estas enterobactérias não-*Cronobacter* foram classificadas como “categoria B - plausíveis de causarem infecções, mas sem o apoio de evidências epidemiológicas” pelas comissões de especialistas. Neste estudo, as cepas da família *Enterobacteriaceae* não-*Cronobacter* isoladas a partir de uma amostra de FIL que apresentaram maior percentual de identificação foram *Pantoea* spp. (93,0 %), *Serratia ficaria* (99,8 %) ou *Klebsiella pneumoniae* subsp. *Ozaenae* (48,8 %) de acordo com o Vitek 2.0, ID 32 E e API 20E, respectivamente. Outros autores já relataram a identificação destes micro-organismos em amostras de FID comercializadas no Brasil¹² e em outros países¹³. Bactérias do gênero *Klebsiella* e *Pantoea* já foram associadas com infecções neonatais, mas nunca tendo FID identificadas como o veículo de contaminação².

Em conclusão, a ocorrência de *Cronobacter* spp. em amostras de FID comercializadas parece ser baixa, indicando que os fabricantes estão cumprindo o disposto nas normas brasileiras vigentes de forma a evitar a contaminação dos produtos por este micro-organismo. Além disso, a ausência do patógeno nas formulações avaliadas também pode estar associada a uma fiscalização mais efetiva por parte do setor regulador.

AGRADECIMENTOS

Ao INCQS/Fiocruz pelo financiamento deste estudo e ao CNPq por concessão de bolsa PIBIC a Natália Umeda. Ao programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do INCQS/Fiocruz no qual Marcelo Brandão é aluno de doutorado.

REFERÊNCIAS

1. Codex Alimentarius Comission - CAC. Codex Alimentarius: code of hygienic practice for foods for powdered formulae for infants and young children. CAC/RCP 66. 2008. [acesso 2014 Jan 10]. Disponível em: [http://www.codexalimentarius.org/standards/list-of-standards/en/?no_cache=1].
2. Food and Agricultural Organization /World Health Organization – FAO/WHO. *Enterobacter sakazakii* and *Salmonella* in powdered infant formula. Meeting Report. Genova: WHO, 2006. 115p. Microbiological Risk Assessment Series N° 10. [acesso 2014 Jan 10]. Disponível em: [http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/mra10/en/].
3. Santos M, Pessoa da Silva CL, Sampaio J, Marangoni DV, Pinto M, Moreira BM. Detection and control of *Enterobacter sakazakii* sepsis outbreak in four hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *Infect Control Hosp Ep*.2000;21(2):140.
4. Warnken MB, Brandao MLL, Souza AE, Romão CMCP, Nogueira ACMA, Destro MT. Phenotypic profiles and detection of target genes by PCR in isolates from different sources and reference strains, identified as *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*). *Rev Inst Adolfo Lutz*.2012;71(1):21-31.
5. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n.º12, de 2 de janeiro de 2001. Aprova regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para alimentos e seus anexos I e II. Diário Oficial [da] União, Poder Executivo, Brasília, DF, n.7-E, 10 jan. 2001. Seção 1, p 45.
6. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n.º43 de 19 de setembro de 2011. Dispõe sobre o regulamento técnico para fórmulas infantis para lactantes. Diário Oficial [da] União, Poder Executivo, Brasília, DF, n. 182, ISSN 1677-7042, 21 set. 2011. Seção 1, p 90-2.
7. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n.º44 de 19 de setembro de 2011. Dispõe sobre o regulamento técnico para fórmulas infantis de seguimento para lactantes e crianças de primeira infância. Diário Oficial [da] União, Poder Executivo, Brasília, DF, n. 182, ISSN 1677-7042, 21 set. 2011. Seção 1, p 92-4.
8. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n.º45 de 19 de setembro de 2011. Dispõe sobre o regulamento técnico para fórmulas infantis lactantes destinadas a necessidades dietoterápicas específicas e fórmulas infantis de seguimento para lactantes e crianças de primeira infância destinadas a necessidades dietoterápicas específicas. Diário Oficial [da] União, Poder Executivo, Brasília, DF, n. 182, ISSN 1677-7042, 21 set. 2011. Seção 1, p 94-6.
9. International Organization for Standardization - ISO. ISO/TS 22964 (IDF/RM 210:2006). Milk and milk products – Detection of *Enterobacter sakazakii*. 2006. 13p.
10. Chen Y, Lampel K, Hammack T. *Cronobacter*. In: Bacteriological analytical manual. 8ª ed. Revision A, 1998. United States: Food and Drug Administration. Chapter 29, mar. 2012. [acesso 2014 Jan 10]. Disponível em: [http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm289378.htm].
11. Iversen C, Lehner A, Mullane N, Marugg J, Fanning S, Stephan R, et al. The identification of *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*). *J Clin Microbiol*.2007;45(11):3814-16.

12. Santos RFS, Silva N, Junqueira VCA, Kajsik M, Forsythe S, Pereira JL. Screening for *Cronobacter* Species in Powdered and Reconstituted Infant Formulas and from Equipment Used in Formula Preparation in Maternity Hospitals. *Ann Nutr Metab*.2013;63(1-2):62-8.
13. Abdullah Sani N, Hartantyo SH, Forsythe SJ. Microbiological assessment and evaluation of rehydration instructions on powdered infant formulas, follow-up formulas, and infant foods in Malaysia. *J Dairy Sci*.2013;96(1):1-8.
14. Chap J, Jackson P, Siqueira R, Gaspar N, Quintas C, Park J, et al. International survey of *Cronobacter sakazakii* and other *Cronobacter* spp. in follow up formulas and infant foods. *Int J Food Microbiol*.2009;136(2):185-8.
15. Freitas LG, Ristori CA, Jakabi M, Paula AMR, Rowlands REG. Ocorrência de *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) em alimentos infantis adquiridos em um hospital público. *Rev Inst Adolfo Lutz*.2011;70(4):548-53.

Desenvolvimento de *cookies* adicionados de farinha de yacon (*Smallanthus sonchifolius*): caracterização química e aceitabilidade sensorial entre portadores de Diabetes Mellitus

Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) flour added-cookies: chemical characterization and sensory acceptability among the patients with diabetes mellitus

RIALA6/1608

Mayla Gabriely Giacomel RODRIGUES¹, Elisvânia Freitas dos SANTOS², Fabiane La Flor Ziegler SANCHES², Daiana NOVELLO^{1*}, Maria Raquel MANHANI³, Mikael NEUMANN⁴

*Endereço para correspondência: ¹Departamento de Nutrição, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Estadual do Centro-Oeste (UNICENTRO). Caixa Postal 35, CEP: 85010-000, Guarapuava, PR, (42) 3629 8182. E-mail: nutridai@gmail.com.

²Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande, MS

³Departamento de Farmácia e Nutrição, Universidade São Judas Tadeu, São Paulo, SP

⁴Departamento de Medicina Veterinária, Setor de Ciências Agrárias e Ambientais, Universidade Estadual do Centro-Oeste (UNICENTRO), Guarapuava, PR

Recebido: 23.08.2013 - Aceito para publicação: 16.06.2014

RESUMO

O objetivo do trabalho foi verificar a aceitabilidade sensorial de biscoitos tipo cookies adicionados de farinha de yacon (FY) e determinar a composição química da formulação tradicional e daquela contendo o maior teor de FY com aceitação sensorial semelhante ao padrão. Utilizaram-se cinco formulações de biscoitos, sendo: padrão (0 %) e as demais com 5 %, 7,5 %, 10 % e 12,5 % de FY. Na análise sensorial participaram 55 provadores não treinados, portadores de diabetes mellitus de ambos os gêneros com idade entre 18 a 70 anos. Os resultados da análise sensorial mostraram que a amostra com adição de 7,5 % de FY foi o melhor teor de yacon acrescentado e com aceitação semelhante ao padrão, principalmente nos atributos aparência, aroma, sabor, aceitação global e intenção de compra. A análise química das amostras padrão e com 7,5 % de FY revelou maiores teores de fibra bruta, proteínas, cinzas e umidade na amostra com FY, entretanto apresentou menores concentrações de carboidratos e valor calórico total. A elaboração desses produtos permitiu comprovar que, um nível de adição de até 7,5 % de FY em biscoitos tipo cookies foi bem aceito pelos provadores, obtendo-se aceitação sensorial semelhante ao produto padrão.

Palavras-chave. índice glicêmico, alimentos funcionais, raízes tuberosas.

ABSTRACT

This study analyzed the sensory acceptability of yacon flour (YF) added-cookies, and determined the chemical composition of the traditional formulation and of those containing the highest contents of YF with the sensory acceptance similar to the standard product. Five formulations of biscuits have been prepared, being: standard (0 %) and four samples containing 5 %, 7.5 %, 10 % and 12.5 % of YF, respectively. For conducting the sensory analysis, 55 untrained tasters participated, who were diabetic patients of both genders, aged from 18 to 70 years. The results of sensory analysis showed that the addition of 7.5 % of YF was the best contents of yacon, and with the acceptance similar to the standard product, and mainly for the attributes appearance, aroma, taste, overall acceptance and purchase intention. The chemical analysis of standard samples and of 7.5 % YF-containing cookies showed higher levels of fiber, protein, ash and moisture in the sample with YF; however lower concentrations of carbohydrates and total calories were found. The development of products has demonstrated that the cookies containing YF up to 7.5 % were well accepted by the tasters and these samples evidenced the sensory acceptance similar to the standard product.

Keywords. glycemic index, functional foods, tuberous roots.

INTRODUÇÃO

O Diabetes Mellitus (DM) é um estado de hiperglicemia crônica por deficiência ou produção insuficiente de insulina pelo pâncreas, resultando na incapacidade deste hormônio em exercer suas funções no metabolismo da glicose. Dessa maneira, a terapia nutricional é vital para pacientes diabéticos e tem como principal objetivo manter os níveis de glicemia o mais próximo do normal, juntamente com o uso de medicamentos e a prática e exercícios físicos¹.

Portadores dessa patologia necessitam de alimentos ricos em fibras, com baixos teores de gordura saturada, sal e açúcares simples. A fibra solúvel favorece o controle de dislipidemias e da glicemia, por reduzir a absorção de colesterol e carboidratos no âmbito intestinal¹. Sabendo-se disso, o desenvolvimento de novos produtos adicionados de ingredientes funcionais, mostra-se cada vez mais desafiador para o setor alimentício, que visa atender às exigências do mercado consumidor atual, caracterizado pela procura de produtos saudáveis e atrativos. Neste sentido, a batata yacon (*Smallanthus sonchifolius*) ou “batata *diet*”, pode ser considerada uma opção saudável para o consumo de pacientes portadores de DM. Seu benefício nutricional pode ser obtido pela ingestão *in natura* ou como ingrediente em produtos normalmente consumidos, uma vez que é classificada como um alimento funcional².

Diferentemente das demais raízes tuberosas que armazenam carboidratos na forma de amido, a yacon possui como principais substâncias de reserva os frutooligosacarídeos (FOS), frutose, glicose e sacarose em menor proporção². Dentre os FOS presentes nessa raiz, encontra-se a inulina, um polímero de frutose, que atravessa o trato digestivo sem ser metabolizada. A inulina apresenta as propriedades das fibras alimentares solúveis, que promovem o crescimento e atividade de bactérias probióticas³. Estas fibras estão relacionadas ao aumento da viscosidade do bolo alimentar e, como consequência, ao retardo na digestão e absorção de carboidratos, que acarretam a diminuição da hiperglicemia pós-prandial precoce e do risco de hipoglicemia reacional e prolonga o período de saciedade⁴, características benéficas aos pacientes com DM.

Um alimento propício para a adição de novos ingredientes funcionais em sua formulação são os *cookies*, que apresentam fácil preparo, longa vida de prateleira e boa aceitação por parte da população, sendo, portanto, uma ótima possibilidade de produto para os

portadores de DM. Diante do exposto, o objetivo desse trabalho foi produzir *cookies* contendo farinha de yacon como ingrediente em substituição ao açúcar utilizado na formulação tradicional, os quais foram analisados quanto sua aceitação sensorial e composição química.

MATERIAL E MÉTODOS

Preparo da farinha de yacon

Foram adquiridos 10 kg de yacon (*Smallanthus sonchifolius*) em um supermercado local da cidade de Guarapuava, PR. As raízes tuberosas foram higienizadas em água corrente e descascadas. A polpa foi submersa em água a 70 °C por 10 minutos e, então submersa em água a temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, as polpas (8,5 kg) foram cortadas em fatias finas, acomodadas em telas (treliça/32 mesh) e dispostas em estufa ventilada com circulação de ar (Pardal⁵, Brasil) para secagem direta por 48 horas a 60 °C⁵. Após este período, foram trituradas em liquidificador (Philips/Walita⁶, Brasil), obtendo rendimento de 600 g de farinha, a qual foi acondicionada em potes hermeticamente fechados.

Formulações dos cookies

Foram elaboradas cinco formulações de *cookies*, sendo: F1: padrão (0 % de FY) e as demais adicionadas de 5,0 % (F2), 7,5 % (F3), 10,0 % (F4) e 12,5 % (F5) de FY. Estes níveis de adição foram definidos por meio de testes sensoriais preliminares realizados com o produto.

Além das porcentagens citadas de FY, os ingredientes utilizados nas formulações foram: farinha de trigo refinado (52,9 %), açúcar cristal (F1: 26,4 %, F2: 21,4 %, F3: 18,9 %, F4: 16,4 %, F5: 13,9 %), ovos (13,2 %), margarina vegetal (5,59 %), fermento em pó (1,32 %) e sal refinado (0,44 %).

Os produtos foram elaborados, individualmente, no Laboratório de Técnica Dietética do Departamento de Nutrição da UNICENTRO, Guarapuava, PR. Primeiramente, foram separados os ingredientes: farinha de trigo, açúcar cristal, ovos, margarina, sal, fermento em pó e FY (conforme cada nível de adição). Os ingredientes foram misturados pela ordem citada, até obter uma massa grossa e homogênea. Em seguida, a massa foi moldada em formato de *cookies* (com aproximadamente 40 mm de diâmetro), dispostos em formas de alumínio e assados em forno (Arno⁷, Brasil) pré-aquecido por 200 °C durante 20 minutos. Cada *cookie* apresentou peso aproximado de 30 g.

Análise sensorial

Participaram da pesquisa 55 pacientes portadores de Diabetes Mellitus, cadastrados no Programa HiperDia do Sistema Único de Saúde do Município de Guarapuava, PR. Os provadores foram de ambos os gêneros, não treinados, com idade entre 18 a 70 anos.

A avaliação sensorial foi realizada em uma sala própria, localizada junto ao local dos encontros mensais, em cabines individuais, sob luz natural.

Foram avaliados os atributos de aparência, aroma, sabor, textura e cor, por meio de uma escala hedônica estruturada de 9 pontos, variando de *desgostei muitíssimo* (nota 1) a *gostei muitíssimo* (nota 9). Foram aplicadas também, questões de aceitação global com auxílio de escala hedônica estruturada de 9 pontos (1: *desgostei muitíssimo* a 9: *gostei muitíssimo*) e de intenção de compra, por escala estruturada de 5 pontos 1: *certamente não compraria* a 5: *certamente compraria*)⁶.

Um teste de ordenação foi aplicado para comparar as diferenças das amostras para o atributo específico de sabor doce, já que os *cookies* foram reduzidos em açúcar. Nesse teste, os provadores classificaram as cinco amostras em ordem crescente de doçura, sendo da menos doce para a mais doce⁶.

Os julgadores receberam uma porção de cada amostra (aproximadamente 30 g, um biscoito), em pratos plásticos brancos codificados com números de três dígitos, de forma balanceada e casualizada, acompanhada de água para realização do branco. As formulações foram oferecidas de forma monádica sequencial.

Índice de aceitabilidade (IA)

O cálculo do índice de aceitabilidade das cinco formulações foi realizado conforme Dutcoski⁶, segundo a fórmula: $IA (%) = A \times 100/B$, onde $A = \text{nota média obtida para o produto}$; $B = \text{nota máxima dada ao produto}$.

Análises químicas

As análises químicas foram realizadas no Laboratório de Nutrição Animal do Departamento de Medicina Veterinária da UNICENTRO Guarapuava, PR. As seguintes determinações foram realizadas, em triplicata, na formulação padrão e naquela com maior nível de adição de FY e com aceitação sensorial semelhante a padrão:

Determinação da umidade: Foi realizada de acordo com Instituto Adolfo Lutz⁵, que consiste em

secagem a 105 °C até peso constante.

Determinação de cinzas: A porcentagem de cinzas foi determinada em mufla a 550 °C⁵. *Determinação de proteínas*: Foi realizada através da avaliação do nitrogênio total da amostra, pelo método Kjeldahl determinado ao nível semimicro⁵. Utilizou-se o fator de conversão de nitrogênio para proteína de 6,25.

Determinação de lipídios: As amostras foram avaliadas pelo método de extração a frio⁷. *Determinação de carboidratos*: A determinação de carboidratos dos produtos foi realizada por meio de cálculo teórico (por diferença), conforme a fórmula: $\% \text{ Carboidratos} = 100 - (\% \text{ umidade} + \% \text{ proteína} + \% \text{ lipídios} + \% \text{ cinzas} + \% \text{ fibra alimentar})$.

Determinação de fibra bruta: A fibra bruta foi avaliada conforme metodologia do Instituto Adolfo Lutz⁵.

Determinação do valor calórico total: O total de calorias (kcal) foi calculado utilizando os seguintes valores: para lipídios (8,37 kcal/g), proteína (3,87 kcal/g) e carboidratos (4,11 kcal/g)⁸.

Determinação do Valor Diário de Referência (VD)

O VD foi calculado em relação a 30 g da amostra⁹, com base nos valores médios preconizados para adultos e idosos, conforme gênero e idade para adultos (18 a 70 anos) e para idosos (> 60 anos)¹⁰, resultando em: 1.663 kcal/dia; 210,78 g/dia de carboidratos; 64,95 g/dia de proteínas e 61,66 g/dia de lipídios.

Análise estatística

Os dados foram avaliados por meio da análise de variância (ANOVA), utilizando-se o teste de Tukey e t de *student* para comparação de médias. Na análise sensorial foram empregados também, o Teste de Friedman e a Tabela de Christensen que indicaram a diferença mínima significativa (DMS) entre as amostras testadas e o número de julgamentos obtidos no teste de ordenação⁶. Todos os testes foram analisados em nível de 5 % de significância, com auxílio do *software Statgraphics plus*⁸, versão 5.1.

Questões éticas

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNICENTRO, parecer número nº 262/2011. Como critérios de exclusão foram considerados os seguintes fatores: indivíduos que não possuíam Diabetes Mellitus, aqueles que não aceitaram participar da pesquisa e que não assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Tabela 1. Médias dos testes sensorial afetivo, ordenação, intenção de compra e índice de aceitabilidade (IA), realizados para as formulações de *cookies* padrão (0 %) e adicionados de 5,0; 7,5; 10,0 e 12,5 % de farinha de yacon (FY)

Atributos	Média ± Erro padrão da média				
	F1	F2	F3	F4	F5
Aparência	7,30±0,12 ^a	6,90±0,18 ^{ab}	6,74±0,19 ^{abc}	6,01±0,08 ^{bc}	5,81±0,11 ^c
IA (%)	81,11	76,67	74,89	66,78	64,56
Aroma	7,34±0,15 ^a	7,29±0,16 ^a	6,52±0,13 ^{ab}	6,08±0,14 ^b	6,06±0,14 ^b
IA (%)	82,56	81,00	72,44	67,56	67,33
Sabor	7,94±0,12 ^a	7,61±0,14 ^a	6,92±0,17 ^a	5,76±0,18 ^b	5,87±0,17 ^b
IA (%)	88,22	84,56	76,89	64,00	65,22
Textura	7,65±0,20 ^a	6,87±0,10 ^{ab}	6,54±0,15 ^b	5,24±0,14 ^c	5,40±0,11 ^c
IA (%)	85,00	76,33	72,67	58,22	60,00
Cor	7,69±0,11 ^a	7,45±0,15 ^a	7,34±0,16 ^{ab}	6,41±0,10 ^b	6,36±0,12 ^b
IA (%)	85,44	82,78	70,44	71,11	70,67
Aceitação Global	7,80±0,15 ^a	7,36±0,19 ^a	6,72±0,21 ^{ab}	5,63±0,18 ^{bc}	5,54±0,19 ^c
IA (%)	86,67	81,78	74,67	62,56	61,56
Intenção de Compra	4,09±0,12 ^a	3,69±0,10 ^a	3,87±0,12 ^a	2,47±0,15 ^b	2,50±0,16 ^b
Somatório das notas*	235 ^a	211 ^a	171 ^b	117 ^c	91 ^c

Letras diferentes na linha indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$); F1: padrão; F2: 5,0 %; F3: 7,5 %; F4: 10,0 %; F5: 12,5 % de FY; *Resultados da diferença entre as amostras na linha com valor ≥ 32 são distintos significativamente ($p < 0,05$), segundo a Tabela de Christensen⁶ para 55 julgamentos e 5 amostras.

RESULTADOS

Análise Sensorial

A Tabela 1 apresenta as médias verificadas para o teste sensorial afetivo, de intenção de compra e índice de aceitabilidade dos biscoitos tipo *cookies* padrão e enriquecidos com FY.

A adição de FY aos *cookies* nas porcentagens de 10,0 e 12,5 % promoveu uma menor aceitação para os atributos aparência, sabor e aroma ($p < 0,05$). Avaliando-se o atributo textura, foi possível observar que as amostras F1 e F2 apresentaram as maiores notas seguidas por F3 ($p < 0,05$), enquanto F4 e F5 foram aquelas menos referidas para este atributo ($p < 0,05$). Ressalta-se que produtos com maiores porcentagens de FY foram referidos pelos provadores com uma consistência mais “rígida”.

As formulações F1 e F2 apresentaram as maiores notas para o atributo cor, quando comparadas a F4 e F5,

sendo que F3 não mostrou diferença significativa das demais ($p > 0,05$). Durante a elaboração dos *cookies*, verificou-se que as formulações com maiores teores de FY apresentaram coloração mais escura.

Os julgadores relataram maior aceitação global para as formulações F1 e F2, que decresceu com a adição de maiores níveis de FY ($p < 0,05$). As amostras F1, F2 e F3 apresentaram as melhores referências para intenção de compra ($p > 0,05$), que também reduziu a preferência conforme a porcentagem de adição de FY aumentou.

As formulações F1, F2 e F3 apresentaram índice de aceitabilidade acima de 70 %, que os classifica como produtos de boa aceitação sensorial¹¹. No teste de ordenação, as formulações F1 e F2 foram relatadas pelos provadores como sendo as mais doces, seguidas por F3 ($p < 0,05$). Os produtos F4 e F5 foram descritos com o menor teor de doçura, sendo estas as formulações que continham as mais baixas concentrações de açúcar.

Sendo os atributos aroma e sabor considerados como aqueles que mais influenciam as propriedades sensoriais de produtos alimentícios adicionados de ingredientes diferenciados, a amostra F3 (7,5 %) foi selecionada para fins de comparação, juntamente com a padrão (F1), por ser aquela com o maior teor de FY e com aceitação semelhante a padrão.

Análises químicas

A Tabela 2 apresenta a composição química e os valores diários recomendados (VD) dos *cookies* padrão e dos *cookies* adicionados de 7,5 % de FY, em comparação a um produto referência.

Foram observados maiores teores ($p < 0,05$) de umidade, cinzas, proteínas e fibra bruta para os biscoitos contendo FY (F3), sendo que, em geral, os valores foram superiores aos do produto referência¹². Entretanto, a composição de carboidratos e calorias dos *cookies* padrão foi maior que em F3 ($p < 0,05$). Não houve diferença significativa nos conteúdos de lipídios entre as formulações F1 e F3, sendo resultados também maiores que o biscoito referência¹².

DISCUSSÃO

Análise sensorial

Resultados semelhantes aos apresentados na Tabela

1 foram observados por Rolim et al³ que, ao avaliarem formulações de pães acrescidos de FY (0, 6,0 e 11,0 %), verificaram que a maior porcentagem de adição do ingrediente também levou à menor aceitação do produto.

A consistência mais “rígida” referida aos produtos com maiores porcentagens de FY pode ser explicada pelo conteúdo de inulina e FOS da yacon e, por apresentar grupos de OH⁻ disponíveis, capazes de interagir com moléculas de água por pontes de hidrogênio e, desta forma, dificultar sua evaporação durante o processo de cocção, tornando o produto menos crocante. Resultados similares foram verificados por Moscatto et al¹³, ao elaborarem bolos de chocolate adicionados de 20 e 40 % de FY em substituição à farinha de trigo.

A diferença de textura entre os produtos também pode ser explicada pelo fato das formulações F1 e F2 conterem maiores teores de sacarose, o qual é sabido estar diretamente relacionado à melhoria das características da massa dos biscoitos para conferir maior maciez ao produto¹⁴. Entretanto, o açúcar é um alimento de alto índice glicêmico, que pode elevar rapidamente a glicose sanguínea e prejudicar os pacientes com DM⁴. Desta forma, quanto menor for o consumo deste ingrediente por indivíduos diabéticos, maiores serão os benefícios à saúde.

A coloração mais escura dos *cookies* adicionados de maiores teores de FY se deve, principalmente, a cor

Tabela 2. Composição química e valores diários recomendados – VD* (porção média de 30 gramas) de *cookies* padrão (F1) e adicionados de 7,5 % de farinha de yacon (F3), comparadas com um produto referência**

Avaliação	F1		F3		Referência**
	Média±DP	VD (%)*	Média±DP	VD (%)*	
Umidade (%)	9,54±0,02 ^b	ND	15,00±0,08 ^a	ND	8,00
Cinzas (g.100g ⁻¹)	0,88±0,01 ^b	ND	1,14±0,00 ^a	ND	0,95
Proteínas (g.100g ⁻¹)	8,20±0,21 ^b	3,79	9,30±0,03 ^a	4,30	4,20
Lipídios (g.100g ⁻¹)	6,54±0,07 ^a	3,18	6,11±0,09 ^a	2,97	2,70
Carboidratos (g.100g ⁻¹)	74,85±0,26 ^a	10,65	68,45±0,18 ^b	9,74	84,00
Calorias (kcal.100g ⁻¹)	394,08±0,06 ^a	7,11	368,47±0,10 ^b	6,65	378,00
Fibra bruta (g.100g ⁻¹)	7,90±0,03 ^b	ND	10,57±0,10 ^a	ND	ND

Letras diferentes na linha indicam diferença significativa pelo teste de t de *student* ($p < 0,05$); *VD: nutrientes avaliados pela média da DRI¹⁰, com base numa dieta de 1.663 kcal/dia; **Valores comparados com “biscoito *cookies* tradicional”¹²; Valores calculados em base úmida; DP: desvio padrão da média; ND: não disponível.

marrom característica do processo de escurecimento enzimático da yacon. Também, uma das funções do açúcar é melhorar a cor e aparência dos produtos durante a cocção, sendo considerado um corante natural¹⁴. Nesse sentido, maiores porcentagens de adição de FY podem ter reduzido as notas para este atributo.

Avaliando-se o teste de ordenação para o sabor doce, ressalta-se que os biscoitos poderão ter seu sabor aprimorado tecnologicamente, pelo uso de edulcorantes naturais e/ou artificiais, melhorando assim este atributo sensorial sem prejudicar a saúde dos pacientes portadores de DM.

Análises químicas

Quanto ao teor de umidade dos produtos, constatou-se que apenas a formulação padrão estava de acordo com a recomendação da RDC 12/1978, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a qual define o máximo de 14 % de umidade em biscoitos e bolachas¹⁵.

O maior conteúdo de cinzas obtido em F3 pode estar relacionado ao fato da yacon possuir considerável teor de minerais (3,63 %)¹⁶, enquanto que o mais elevado de teor protéico verificado para F3 está diretamente relacionado à presença de proteínas na farinha de yacon (2,79 %)¹⁶. Ressalta-se, ainda, que as maiores quantidades desse macronutriente, verificadas em F1 e F3 quando comparado ao produto referência¹², provavelmente, se deveram aos diferentes ingredientes utilizados nas formulações.

A redução nos teores de carboidratos e calorias verificada para os produtos contendo FY ocorreu principalmente, devido ao fato da formulação F3 ter sido elaborada com teor reduzido de açúcar, o qual contém maior quantidade energética proveniente dos carboidratos. Além disso, a FY possui 42,52 % de carboidratos complexos na sua composição¹⁶, quando comparada à sacarose (5 a 15 %), considerada como carboidrato simples e que deve ser reduzida na dieta de indivíduos com glicemia alterada⁴. Dessa forma, os *cookies* com adição de FY podem ser considerados alimentos alternativos para pacientes portadores de DM, considerando o baixo índice glicêmico apresentado pela yacon. Entretanto, ressalta-se que é necessária moderação no consumo, uma vez que a sacarose, mesmo que em menor quantidade, ainda está presente na formulação. Destaca-se que a redução de aproximadamente 6 % de calorias pode colaborar no tratamento de pacientes de

DM, que necessitam de um menor consumo calórico em sua dieta⁴.

Enfatiza-se como o principal resultado desse trabalho o aumento significativo de fibra bruta (33,80 %) em relação a F1. Isso se deve, principalmente, ao alto teor de fibra solúvel e insolúvel (2,24 e 15,91 g.100g⁻¹, respectivamente) presente na FY¹⁶. Estes resultados tornam o produto uma excelente opção para portadores de DM, pois as fibras auxiliam no retardo da absorção de carboidratos, levando à diminuição da glicemia sanguínea⁴.

De acordo com a Legislação Brasileira¹⁷, um produto é considerado como fonte de fibra alimentar quando apresentar no mínimo 3 % e com alto teor no mínimo 6 % em fibras. Assim, sabendo-se que o método de determinação de fibra bruta utilizado no presente trabalho subestima o valor de fibra alimentar nos produtos, pode-se considerar ambas as formulações com alto teor em fibras.

CONCLUSÃO

O desenvolvimento dos produtos permitiu, neste estudo, comprovar que um nível de adição de até 7,5 % de farinha de yacon em biscoitos tipo *cookies* foi aceito pelos provadores, com aceitação sensorial semelhante ao produto padrão.

A adição de 7,5 % de farinha de yacon em biscoitos proporcionou, em geral, aumento no teor de nutrientes, com exceção dos carboidratos e calorias. Foi possível também, elevar o aporte de fibras, melhorando o perfil nutricional do produto.

Assim sendo, a farinha de yacon pode ser considerada como potencial ingrediente com propriedades funcionais a ser adicionados em biscoitos e similares, a serem oferecidos aos consumidores com boas expectativas de aceitação no mercado.

REFERÊNCIAS

1. Mclellan KCP, Barbalho SM, Cattalini M, Lerario AC. Diabetes mellitus do tipo 2, síndrome metabólica e modificação no estilo de vida. *Rev Nut.*2007;20(5):515-24.
2. Santana I, Cardoso MH. Raiz tuberosa de yacon (*Smallanthus sonchifolius*): potencialidade de cultivo, aspectos tecnológicos e nutricionais. *Ciênc Rural.*2008;38(3):898-905.
3. Rolim PM, Salgado SM, Padilha VM, Livera AVS, Guerra NB, Andrade SAC. Análise de componentes principais de pães de forma formulados com farinha de yacon (*Smallanthus sonchifolius* (Poepp.) H. Rob.). *Rev Ceres.*2010;57(1):12-7.

4. Martins MLR, Delmaschio KL, Cordeiro AA. Efeitos da utilização de *Smallanthus sonchifolius* (yacon) no tratamento de indivíduos com Diabetes Mellitus. *Rev Ceres*.2011;6(1):35-43.
5. Instituto Adolfo Lutz. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos químicos e físicos para análises de alimentos. 4ª ed. Brasília (DF): IAL; 2008.
6. Dutcosky SD. Análise Sensorial de Alimentos. 3ª ed. Curitiba (PR): Champagnat; 2011.
7. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*.1959;37(8):911-7.
8. Merrill AL, Watt BK. Energy values of foods: basis and derivation. *Agricultural Handbook*, n.74, Washington (DC): USDA; 1973.
9. Brasil. Ministério da Saúde (MS). Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Rotulagem nutricional obrigatória: manual de orientação às indústrias de Alimentos - 2º Versão. Brasília (DF): ANVISA/Universidade de Brasília; 2005.
10. Dietary Reference Intakes (DRI) for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein and amino acids. Washington (DC): National Academy Press; 2000.
11. Teixeira E, Meinert E, Barbeta PA. Análise Sensorial dos Alimentos. Florianópolis: UFSC; 1987.
12. United States Department of Agriculture (USDA). Nutrient Database for Standard Reference. 2001. [acesso 2012 jul 28]. Disponível em: [<http://www.unifesp.br/dis/servicos/nutri/nutri.hp?d=101>].
13. Moscatto JA, Borsato D, Bona E, Oliveira AS, Hauly COM. The optimization of the formulation for a chocolate cake containing inulin and yacon meal. *Int J Food Sci Technol*.2005;41(2):181-8.
14. Ornellas LH. Técnica Dietética - seleção e preparo de alimentos. 8ª ed. São Paulo (SP): Atheneu; 2007.
15. Brasil. Resolução n. 12, de julho de 1978. Aprova Normas Técnicas Especiais, do Estado de São Paulo, revistas pela CNNPA, relativas a alimentos (e bebidas), para efeito em todo território brasileiro. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 23 jul. 1978.
16. Vasconcelos CM, Silva CO, Teixeira LJQ, Chaves JBP, Martino HSD. Determinação da fração da fibra alimentar solúvel em raiz e farinha de yacon (*Smallanthus sonchifolius*) pelo método enzimático-gravimétrico e cromatografia líquida de alta eficiência. *Rev Inst Adolfo Lutz*.2010;69(2):188-93.
17. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ANVISA. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 54, de 12 de novembro de 2012. Aprova: "Regulamento Técnico sobre Informação Nutricional". [acesso 2014 jun 11]. Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/630a98804d7065b981f1e1c116238c3b/Resolucao+RDC+n.+54_2012.pdf?MOD=AJPERES].

Aceitabilidade sensorial de sopas elaboradas com diferentes sais substitutos de cloreto de sódio

Sensory acceptability of soup prepared with different salts sodium chloride substitutes

RIALA6/1609

Sandy Mary OTTO, Daiane SERBAI, Daiana NOVELLO*

*Endereço para correspondência: Departamento de Nutrição, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Estadual do Centro-Oeste (UNICENTRO), Caixa Postal 35, tel: (42) 3629 8182, Guarapuava, PR, Brasil, CEP 85010-000. E-mail: nutridai@gmail.com.

Recebido: 22.08.2013 - Aceito para publicação: 23.06.2014

RESUMO

Neste estudo foram elaboradas formulações para analisar a aceitabilidade sensorial de sopas contendo sais substitutos de cloreto de sódio (NaCl). Na Etapa 1, foram formuladas sete amostras adicionadas de NaCl (0 a 0,60 %), para determinar a melhor porcentagem de sal. Na Etapa 2, com base no resultado da Etapa 1, foram elaboradas mais sete amostras, adicionadas de sais de cloretos, em conjunto ou individualmente: sódio (NaCl), potássio (KCl), cálcio (CaCl₂) e magnésio (MgCl₂), nas concentrações de 0,25 a 0,50 %. Na Etapa 3, foram utilizadas as mesmas porcentagens de sais da Etapa 2, e acrescentando-se 0,30 % do “realçador de sabor” glutamato monossódico (GM). Na Etapa 1, as formulações com 0,40 e 0,50 % de NaCl obtiveram as maiores notas hedônicas, e a menor aceitação foi para aquela isenta de sal (0 %). Na Etapa 2, a adição dos cloretos 0,50 % (NaCl); 0,25 % (NaCl) + 0,25 % (KCl) e 0,25 % (NaCl) + 0,25 % (CaCl₂) apresentaram maior aceitação. Na Etapa 3 houve aumento geral das notas, e a redução da aceitação foi observada a partir da adição de 0,50 % (KCl) + 0,30 % (GM). Foi possível restringir o teor de NaCl em sopas, principalmente pela utilização conjunta dos NaCl, KCl ou CaCl₂, sendo ainda plausível a utilização de GM para melhorar a aceitação sensorial.

Palavras-chave. sopa, sais de cloreto, análise sensorial, redução de sódio.

ABSTRACT

This study prepared formulations, and the sensory acceptability of soups containing sodium chloride (NaCl) salt substitutes was evaluated. In Step 1, seven samples containing NaCl (0 to 0.60 %) were formulated for determining the optimal concentration of salt. In Step 2, based on the result from Step 1, additional seven samples were prepared, containing salts chlorides, combined or separately: sodium chloride (NaCl), potassium (KCl), calcium (CaCl₂) and magnesium chloride (MgCl₂) in percentages from 0.25 to 0.50 %. In Step 3, the same salt concentrations added samples for Step 2 were used, but including 0.30 % of flavor enhancer monosodium glutamate (MG). In Step 1, the formulations containing 0.40 and 0.50 % NaCl showed the highest hedonic scores and, to a lesser acceptance was that salt-free (0 %) sample. In Step 2, the following chlorides addition 0.50 % (NaCl); 0.25 % (NaCl) + 0.25 % (KCl) and 0.25 % (NaCl) + 0.25 % (CaCl₂) showed the highest acceptance. In Step 3, an overall increase in acceptance scores were observed; reduction in acceptance occurred from then on the addition of 0.50 % (KCl) + 0.30 % (MG). Thus, NaCl contents could be restricted in soups, particularly through the combined use of sodium and potassium or calcium chlorides, and it is feasible to use MG to improve the sensory acceptance.

Keywords. soup, chloride salts, sensory analysis, sodium reduction.

INTRODUÇÃO

Os minerais presentes nos alimentos como o sódio (Na), potássio (K) e magnésio (Mg), são nutrientes que não podem ser sintetizados pelo organismo e, por isso devem ser obtidos por meio da alimentação. Eles são fundamentais como constituintes estruturais dos tecidos, cofatores metabólicos, reguladores orgânicos que controlam os impulsos nervosos, atividade muscular e componentes ou ativadores/reguladores de enzimas¹.

Entre os íons que exercem papel importante na manutenção da pressão osmótica e do equilíbrio hídrico e ácido-básico do organismo estão o Na e o K. O cloreto de sódio (NaCl) é o sal mais abundante, ocorrendo naturalmente em alimentos, sendo a principal fonte de sódio na dieta humana^{1,2}. Entretanto, o maior efeito adverso da ingestão excessiva de NaCl é a elevação da pressão sanguínea, reconhecidamente um fator de risco para as doenças cardiovasculares e renais³. Além da diminuição da pressão arterial, alguns estudos demonstraram que, também, há benefícios da restrição salina na redução da mortalidade por acidente vascular encefálico, na regressão da hipertrofia ventricular esquerda e na menor excreção urinária de cálcio³.

Um possível caminho para a redução global de sódio nos alimentos é a parcial ou total substituição do NaCl por outros sais de cloretos, como o cloreto de potássio (KCl), cloreto de cálcio (CaCl₂) e o cloreto de magnésio (MgCl₂). Contudo, essas substituições podem provocar alguns problemas tecnológicos nos produtos, como a possível restrição do gosto salgado, a introdução do gosto amargo e de sabores metálicos e adstringentes. Outras irregularidades foram descritas na cor e textura do produto, causada pela ação de diferentes cátions na atividade enzimática durante o processo de cura e secagem de alimentos cárneos. Também, pela falta de quantidade adequada de sal para se obter um produto seguro em termos de estabilidade microbiológica^{4,5,6,7,8}. Apesar desses prováveis efeitos, especificamente a substituição de NaCl por KCl tem o benefício de reduzir o teor de Na do alimento, além da ação favorável do K no organismo, que atua de forma contrária ao Na, diminuindo a pressão arterial⁹. Destaca-se, porém, os possíveis efeitos colaterais do consumo de alguns sais tais como distúrbios gastrintestinais, desconfortos abdominais, flatulências, incluindo o custo da suplementação, principalmente do KCl, os quais dificultam seu uso e implementação por parte da indústria de alimentos, exigindo maiores

recursos econômicos quando comparado à utilização do NaCl¹⁰.

Atualmente, o consumo médio de Na pela população brasileira é 4.700 mg/dia, sendo que a recomendação ideal são de 2.000 mg/dia¹¹. A redução desse mineral em alimentos visa diminuir o impacto de doenças crônicas não transmissíveis no país, como, por exemplo, as doenças cardíacas e hipertensão arterial sistêmica, cumprindo a meta proposta pela Organização Mundial da Saúde³. Diante disso, a indústria alimentícia tem fundamental importância nesse processo e vem buscando alternativas para produzir alimentos com reduzido teor de Na.

A sopa é uma preparação consumida tanto em domicílio quanto em órgãos públicos como hospitais, creches e escolas. Dependendo de seus ingredientes, ela pode fornecer grande quantidade de nutrientes e energia, importantes para a alimentação. Dentre eles, entretanto, o sódio é, muitas vezes, utilizado em excesso⁴. Sendo assim, a sopa torna-se um veículo em potencial para o estudo na redução e/ou substituição do NaCl por outros sais de cloretos.

Um alimento deve produzir satisfação e ser agradável ao consumidor. Esse efeito resulta da interação entre diferentes parâmetros de qualidade sensorial. No desenvolvimento de novos produtos é imprescindível otimizar determinados atributos, como forma, cor, aparência, aroma, sabor, textura, consistência e a interação dos diferentes componentes, com a finalidade de alcançar um equilíbrio global que se traduza em uma qualidade excelente e que seja de boa aceitabilidade¹².

A redução no conteúdo de sal dos alimentos, sem ocasionar mudanças na aceitação do consumidor, é um importante desafio para a indústria de alimentos. Uma das principais consequências da redução de sal nos alimentos ocorre nas características sensoriais. Fato que se deve a presença de NaCl em quantidades significativas em produtos como pães, sopas, queijos e embutidos cárneos⁴, sendo relevante realizar avaliações junto à população. Nesse contexto, visando melhorar o sabor dos produtos, algumas substâncias chamadas de realçadores de sabor naturais vêm sendo muito utilizadas, com destaque para o Glutamato Monossódico (GM). Em geral, sua adição melhora a aceitabilidade dos alimentos, promovida pelo sabor "umami"¹³. Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi elaborar formulações de sopas com diferentes concentrações de NaCl e sais substitutos, com ou sem a presença de GM, verificando a aceitabilidade sensorial.

MATERIAL E MÉTODOS

Matéria-prima

Os ingredientes básicos utilizados para as formulações foram adquiridos em supermercados do município de Guarapuava, PR. Os sais foram doados por empresas parceiras e apresentavam a seguinte classificação: NaCl (para análise, PA), peso molecular 58,44; KCl (PA), peso molecular 74,55; CaCl₂ (PA), peso molecular 147,02 e; MgCl₂ (PA) peso molecular 203,30. O GM utilizado na pesquisa foi um produto comercial, contendo 12.300 mg Na/100 g.

Preparo das formulações

O preparo das sopas adicionadas de sais de cloretos foi realizado no Laboratório de Técnica e Dietética do curso de Nutrição da Universidade Estadual do Centro-Oeste (UNICENTRO).

Os seguintes ingredientes foram utilizados para a formulação da sopa base: coxa/sobre-coxa de frango (20 %); cebola (10 %); salsa em ramo (5 %); cebolinha em ramo (5 %) e; água mineral (60 %).

Inicialmente, procedeu-se o preparo dos ingredientes, como a limpeza da coxa e sobre-coxa com retirada de toda a gordura visível. Em seguida, procedeu-se a cocção em água fervente (150 °C), por aproximadamente 30 minutos. Logo após, foi acrescentada a cebola inteira que ficou sob cocção por mais 10 minutos (150 °C). Após, foram adicionados os ingredientes salsa e cebolinha, que ficaram sob cocção por mais 5 minutos (150 °C). Ressalta-se que para a análise sensorial (teste afetivo) foi utilizado apenas o caldo da sopa, sem a presença dos ingredientes.

Esta pesquisa foi realizada em três etapas distintas que são descritas a seguir:

Etapa 1: Foram elaboradas sete formulações de sopa contendo diferentes níveis de adição de NaCl, sendo: F1 (0 % - controle), F2 (0,10 %), F3 (0,20 %), F4 (0,30 %), F5 (0,40 %), F6 (0,50 %) e F7 (0,60 %). Nesta etapa foi realizada uma análise sensorial do sabor (gosto salgado) para avaliar a melhor porcentagem de aceitação de NaCl a ser adicionado à sopa.

Etapa 2: Com base no valor da porcentagem ideal de NaCl estipulado na *Etapa 1*, o qual foi de 0,50 % (F6), foram preparadas outras sete formulações de sopa. Estas continham diferentes níveis de adição de NaCl e sais cloretos substitutos, sendo: F1 (0,50 % de NaCl - controle), F2 (0,25 % de NaCl + 0,25 % de KCl), F3 (0,25 % de NaCl + 0,25 % de CaCl₂), F4 (0,25 % de NaCl

+ 0,25 % de MgCl₂), F5 (0,50 % de KCl), F6 (0,50 % de CaCl₂) e F7 (0,50 % de MgCl₂).

Etapa 3: Nesta etapa foram utilizadas as mesmas porcentagens de adição de sais da *Etapa 2*, porém cada uma das formulações foi acrescida do GM na porcentagem de 0,3 %, totalizando-se oito formulações, sendo elas: F1 (0,50 % de NaCl - controle), F2 (0,50 % de NaCl + 0,3 % de GM), F3 (0,25 % de NaCl + 0,25 % de KCl + 0,3 % de GM), F4 (0,25 % de NaCl + 0,25 % de CaCl₂ + 0,3 % de GM), F5 (0,25 % de NaCl + 0,25 % de MgCl₂ + 0,3 % de GM), F6 (0,50 % de KCl + 0,3 % de GM), F7 (0,50 % de CaCl₂ + 0,3 % de GM) e F8 (0,50 % de MgCl₂ + 0,3 % de GM). Ressalta-se que nesta avaliação a formulação padrão, contendo 100 % de NaCl, foi avaliada de duas formas diferentes, uma contendo o GM e outra não.

Análise Sensorial

A avaliação sensorial hedônica foi realizada no Laboratório de Análise Sensorial do Departamento de Engenharia de Alimentos da UNICENTRO, em cabines individuais e com iluminação artificial branca.

Participaram da pesquisa 200 provadores não treinados, sendo estudantes e funcionários do campus Cedeteg (UNICENTRO), de ambos os sexos, com idades variando entre 18 e 60 anos. Todos os provadores foram classificados como consumidores potenciais do produto, os quais foram avaliados através de um questionário aplicado anteriormente aos testes sensoriais.

Na *Etapa 1* foi avaliado apenas o atributo sabor, sendo que nas *Etapas 2 e 3* foram analisados os atributos: aroma, sabor e sabor residual. Os provadores avaliaram a aceitação das amostras por meio de uma escala hedônica estruturada de 9 pontos (1 “desgostei muitíssimo”, 9 “gostei muitíssimo”) ¹⁴. Nas *Etapas 2 e 3* também foram aplicadas questões de aceitação global analisadas pela escala hedônica estruturada de 9 pontos, e um teste de ordenação, onde o avaliador ordenou a amostra da menos salgada para a mais salgada ¹⁴.

Cada julgador recebeu uma porção da sopa elaborada (50 ml aproximadamente), em copo plástico branco, codificado com números aleatórios de três dígitos, de forma casualizada e balanceada, acompanhada de um copo de água para o branco. Todas as amostras foram oferecidas aos julgadores simultaneamente.

Índice de aceitabilidade (IA)

O cálculo do índice de aceitabilidade das

formulações (*Etapas 2 e 3*) foi realizado segundo a fórmula: $IA (%) = A \times 100/B$, onde A = nota média obtida para o produto; B = nota máxima dada ao produto¹⁴.

Questões éticas

Para a realização da pesquisa, os participantes assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Foram respeitadas as questões éticas, no qual o pesquisador responsável se responsabilizava por assegurar a integridade física e moral aos sujeitos

que participavam do estudo e a desistir a qualquer momento sem ônus ou risco ao indivíduo. A pesquisa foi previamente aprovada pelo Comitê de Ética e Pesquisa da UNICENTRO (COMEP/UNICENTRO), sob o parecer nº 277/2011.

Análise Estatística

Os dados obtidos no teste afetivo foram avaliados através da análise de variância (ANOVA), utilizando-se o teste de Tukey para comparação de médias. Foram

Tabela 1. Valores hedônicos médios (M±EPM), somatórios do teste de ordenação (TO) e índice de aceitabilidade (IA) das formulações de sopas elaboradas na *Etapa 2 e Etapa 3*

Amostras/ Atributos	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8
	Média±EPM	Média±EPM	Média±EPM	Média±EPM	Média±EPM	Média±EPM	Média±EPM	Média±EPM
Etapa 2								
Aroma	7,05±0,15 ^a	6,30±0,18 ^{ab}	5,87±0,16 ^{bc}	5,87±0,19 ^{bc}	5,21±0,14 ^c	5,08±0,15 ^c	4,95±0,19 ^c	
IA (%)	78,33	70,00	65,11	65,11	57,77	63,50	54,88	
Sabor	6,02±0,13 ^a	6,02±0,25 ^a	5,74±0,09 ^a	3,74±0,12 ^b	3,40±0,17 ^b	2,34±0,16 ^c	2,14±0,12 ^c	-
IA (%)	66,88	66,88	63,77	53,42	37,77	33,42	30,57	
Sabor residual	6,12±0,23 ^a	6,33±0,09 ^a	5,56±0,13 ^a	3,64±0,11 ^b	3,68±0,20 ^b	2,30±0,17 ^c	2,30±0,11 ^c	-
IA (%)	68,00	70,33	61,77	52,00	40,88	28,75	32,85	
Aceitação Global	6,03±0,14 ^a	6,40±0,15 ^a	5,66±0,19 ^a	3,80±0,14 ^b	3,73±0,18 ^b	2,45±0,16 ^c	2,14±0,09 ^c	-
IA (%)	67,00	71,11	62,88	54,28	41,44	35,00	26,75	
Somatório	209 ^{abc}	232 ^{ab}	210 ^{abc}	243 ^a	140 ^d	197 ^{bc}	169 ^{cd}	-
notas (TO)*								
Etapa 3								
Aroma	6,49±0,12 ^a	6,54±0,09 ^a	6,89±0,15 ^a	6,47±0,15 ^a	6,70±0,10 ^a	6,38±0,13 ^a	6,69±0,17 ^a	6,38±0,11 ^a
IA (%)	72,11	72,66	76,55	64,70	74,44	79,75	74,33	70,88
Sabor	6,50±0,17 ^a	6,56±0,05 ^a	5,80±0,13 ^a	5,86±0,18 ^a	5,77±0,12 ^a	4,45±0,14 ^b	2,52±0,12 ^c	2,75±0,12 ^c
IA (%)	72,22	81,87	72,50	65,11	72,12	55,62	36,00	45,83
Sabor residual	7,14±0,15 ^{ab}	7,20±0,16 ^a	6,66±0,12 ^{ab}	5,08±0,19 ^c	6,18±0,13 ^b	4,82±0,18 ^c	2,65±0,13 ^d	2,57±0,11 ^d
IA (%)	79,33	80,00	74,00	63,50	77,25	53,55	44,16	72,83
Aceitação Global	6,67±0,14 ^a	6,74±0,16 ^a	6,18±0,11 ^a	6,16±0,20 ^a	5,90±0,15 ^a	4,6±0,17 ^b	3,07±0,15 ^c	2,96±0,10 ^c
IA (%)	73,33	84,12	68,66	68,44	73,75	57,50	42,85	49,33
Somatório	270 ^b	324 ^a	254 ^{bc}	278 ^{ab}	270 ^b	207 ^{cd}	200 ^d	177 ^d

notas (TO)**

Letras diferentes na linha indicam diferença significativa pelo teste de Tukey (p<0,05); escala hedônica: 1 = "desgostei muitíssimo"; 9 = "gostei muitíssimo"; M: média; EPM: erro padrão da média; *Resultados entre as amostras na linha com valor ≥ 42 apresentam diferença significativa (p<0,05) para 50 julgamentos e 7 amostras (Tabela de Christensen); **Resultados entre as amostras na linha com valor ≥ 48 apresentam diferença significativa (p<0,05) para 50 julgamentos e 8 amostras (Tabela de Christensen); *Etapa 2*: F1: 0,50 % de NaCl (controle); F2: 0,25 % de NaCl e 0,25 % de KCl; F3: 0,25 % de NaCl e 0,25 % de CaCl₂; F4: 0,25 % de NaCl e 0,25 % de MgCl₂; F5: 0,50 % de KCl; F6: 0,50 % de CaCl₂ e F7: 0,50 % de MgCl₂; *Etapa 3*: F1: 0,50 % de NaCl (controle); F2: 0,50 % de NaCl + 0,3 % de GM; F3: 0,25 % de NaCl + 0,25 % de KCl + 0,3 % de GM; F4: 0,25 % de NaCl + 0,25 % de CaCl₂ + 0,3 % de GM; F5: 0,25 % de NaCl + 0,25 % de MgCl₂ + 0,3 % de GM; F6: 0,50 % de KCl + 0,3 % de GM; F7: 0,50 % de CaCl₂ + 0,3 % de GM; F8: 0,50 % de MgCl₂ + 0,3 % de GM

empregados também, o Teste de Friedman e a Tabela de Christensen que indicaram a diferença mínima significativa (DMS) entre as amostras e o número de julgamentos obtidos no teste de ordenação¹⁴. Todos os testes foram analisados ao nível de 5 % de significância, com auxílio do *software Statgraphics plus*, versão 5.1.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados (média \pm erro padrão da média) do teste de Tukey ($p < 0,05$) da avaliação sensorial hedônica (atributo sabor) realizada para as formulações de sopas adicionadas de NaCl na *Etapa 1* foram: F1 ($1,44 \pm 0,61^d$), F2 ($2,12 \pm 1,27^d$), F3 ($3,68 \pm 1,63^c$), F4 ($5,22 \pm 2,09^b$), F5 ($7,18 \pm 1,53^a$), F6 ($7,34 \pm 1,20^a$) e F7 ($6,00 \pm 2,02^b$). Assim, é possível verificar que as formulações F5 e F6 obtiveram as maiores notas ($p < 0,05$), seguidas de F4 e F7. A menor aceitação foi constatada para a amostra sem adição de NaCl (F1 - 0 %).

A Tabela 1 apresenta as médias do teste sensorial afetivo (escala hedônica), do teste de ordenação e do IA das sopas elaboradas com diferentes sais substitutos de NaCl, sem adição de GM (*Etapa 2*) e com adição de GM (*Etapa 3*).

Na *Etapa 2* é possível verificar que as formulações F1, F2 e F3 ($p < 0,05$) foram aquelas que apresentaram maiores notas para os atributos sabor, sabor residual e aceitação global, enquanto que a adição dos sais das amostras F6 e F7 promoveram as menores referências de aceitação pelos julgadores (“desgostei muito”). As formulações F4 e F5 mostraram notas intermediárias. Para o aroma, F1 teve maior aceitação que F3, F4, F5, F6 e F7, enquanto F1 e F2 foram mais aceitas que F5, F6 e F7.

Na *Etapa 3*, em relação ao atributo aroma, não houve diferença significativa entre amostras ($p > 0,05$). Para sabor e aceitação global, as amostras F1, F2, F3, F4 e F5 praticamente não variaram e tiveram notas superiores à F6, sendo que F7 e F8 apresentaram as menores notas. Menores apontamentos para sabor residual foram verificados para as formulações F1, F2 e F3, seguidas de F5, enquanto as amostras F7 e F8 tiveram as maiores referências ($p < 0,05$) para este atributo. Observa-se que, de modo geral, a adição do GM às formulações melhorou a aceitação dos produtos.

Quanto ao IA, verifica-se que apenas as formulações F1 e F2 (*Etapa 2*) apresentaram IA mais elevados (acima de 70 %), enquanto que a adição de GM às sopas (*Etapa 3*), promoveu um aumento do IA de todos os produtos.

No teste de ordenação (*Etapa 2*) foi observado que as formulações F1, F2, F3 e F4 foram relatadas como

sendo as mais salgadas, seguidas por F6, enquanto que F5 foi considerada menos salgada ($p < 0,05$). Na *Etapa 3*, as formulações F2 e F4 foram relatadas como apresentando maior gosto salgado, seguidas de F1 e F5. Já, as amostras F7 e F8 foram menos referidas pelos julgadores neste quesito.

Na Figura 1 está representada a distribuição da porcentagem dos provadores pelos valores hedônicos obtidos na avaliação dos atributos aroma, sabor, sabor residual e aceitação global das formulações de sopa elaboradas nas *Etapas 2 e 3*.

Na *Etapa 2* (Figura 1 - a, b, c e d) as amostras F1, F2, F3 e F4 apresentaram, em geral, as maiores citações na nota 6 (“gostei ligeiramente”) para todos os atributos. As menores notas, 1 (“desgostei muitíssimo”) e 2 (“desgostei muito”), foram atribuídas, principalmente, às formulações F6 e F7, respectivamente, contendo sais de cálcio e magnésio (0,50 %).

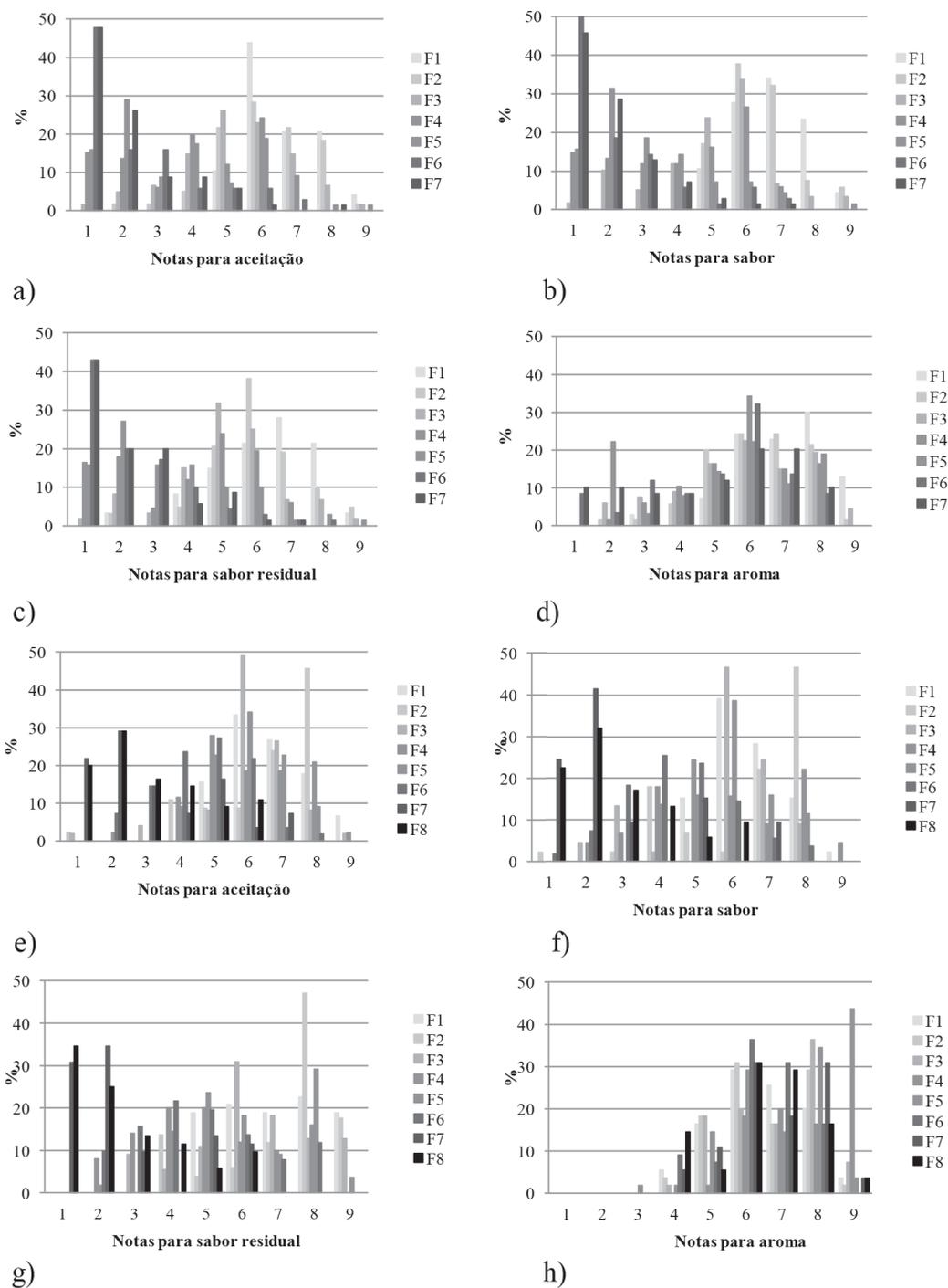
Com a adição de GM (*Etapa 3* - Figura 1 - e, f, g e h) houve uma elevação das notas hedônicas dos atributos avaliados, de 7 e 8 (“gostei moderadamente” e “gostei muito”, respectivamente), especialmente das formulações F1, F2, F3 e F4. Novamente, as formulações F7 (sais de cálcio) e F8 (sais de magnésio) foram as que obtiveram notas menos referidas (1 e 2), com porcentagens acima de 20 %.

Resultados semelhantes à pesquisa na *Etapa 1* foram constatados por Reis et al¹⁵, onde menor aceitação sensorial (9 %) foi verificada para as amostras de sopas sem adição de NaCl.

Os resultados da aceitabilidade para o atributo sabor da formulação F2 (*Etapa 2*), corroboram com Nascimento et al⁵ que analisaram a substituição de NaCl (75 %) por KCl (25 %) em salsichas, sendo que os provadores consideraram este produto com sabor igual ao controle. Segundo Barbosa et al⁶, os sais NaCl e KCl possuem quantidade próxima de moles por grama de sal (0,017 e 0,013, respectivamente), o que pode explicar a melhor aceitação sensorial dos produtos contendo estes ingredientes.

Na Tabela 1, verifica-se também que as amostras F6 e F7 obtiveram as menores notas ($p < 0,05$) nos quesitos avaliados, o que foi confirmado por Rech⁷ avaliando salames tipo italiano formulados com 40 % de CaCl_2 ou MgCl_2 e 60 % de NaCl.

No presente estudo, a adição de GM às sopas elevou, em média, a aceitação dos atributos em um ponto na escala sensorial da maioria das formulações. Segundo Carvalho et al¹⁶, este fato pode ser explicado, pois o gosto “umami”, característico do GM, melhora o sabor dos alimentos e permite que ele seja utilizado como



Legenda: N = 200 julgamentos; escala hedônica: 1 = “desgostei muitíssimo”, 9 = “gostei muitíssimo”; Etapa 2: F1: 0,50 % de NaCl (controle); F2: 0,25 % de NaCl e 0,25 % de KCl; F3: 0,25 % de NaCl e 0,25 % de CaCl₂; F4: 0,25 % de NaCl e 0,25 % de MgCl₂; F5: 0,50 % de KCl; F6: 0,50 % de CaCl₂ e F7: 0,50 % de MgCl₂; Etapa 3: F1: 0,50 % de NaCl (controle); F2: 0,50 % de NaCl + 0,3 % de GM; F3: 0,25 % de NaCl + 0,25 % de KCl + 0,3 % de GM; F4: 0,25 % de NaCl + 0,25 % de CaCl₂ + 0,3 % de GM; F5: 0,25 % de NaCl + 0,25 % de MgCl₂ + 0,3 % de GM; F6: 0,50 % de KCl + 0,3 % de GM; F7: 0,50 % de CaCl₂ + 0,3 % de GM; F8: 0,50 % de MgCl₂ + 0,3 % de GM.

Figura 1. Distribuição percentual de valores hedônicos do teste de aceitação sensorial das formulações de sopas elaboradas na Etapa 2 (a, b, c e d) e Etapa 3 (e, f, g e h)

substituinte do NaCl, reduzindo seu uso entre 30 e 40 % nos alimentos sem afetar significativamente o paladar. Além disso, o GM pode interagir com os receptores gustativos minimizando a percepção do gosto amargo dos produtos¹⁴. A maior aceitação dos produtos contendo GM pode ser comprovada também observando-se a Figura 1, onde houve um aumento das notas. Entretanto, nas *Etapas 2 e 3* (Figura 1) a alta frequência de notas baixas para os atributos sabor, sabor residual e aceitação global dos produtos com CaCl₂ e MgCl₂ corroboram Rech⁷, que afirma que estes cloretos não seriam aceitos em função do comprometimento da qualidade sensorial, isto devido ao gosto amargo que podem causar.

Segundo Teixeira et al¹⁷, IA acima de 70 % podem considerar os produtos com boa aceitação sensorial, sendo assim apenas F1 e F2 (*Etapa 2*) foram bem aceitos pelos provadores. Destaca-se que a adição de GM elevou o IA dos produtos, estando próximos a 70 % até a amostra F5.

As formulações referidas como mais salgadas corroboram com estudos de McGough et al⁸, que avaliaram a redução de sódio (0 a 100 %) em salsichas com o uso de realçador natural de sabor (0 a 100 %). O sabor foi impactado pela adição do ingrediente, onde todos os tratamentos foram percebidos como mais salgados ($p < 0,05$). Assim, os autores também concluíram que a inclusão do realçador permitiu um aumento da percepção do gosto salgado.

CONCLUSÃO

Conclui-se que foi possível restringir o teor de sódio em sopas, principalmente com a utilização conjunta do cloreto de sódio e cloreto de potássio ou cloreto de cálcio, podendo ser benéfico na redução do risco do desenvolvimento de patologias nos indivíduos.

A utilização de sais isolados como cloreto de potássio, cloreto de cálcio e cloreto de magnésio é praticamente inviável para adição em sopas, pois reduzem a aceitabilidade sensorial a níveis mínimos.

A adição do glutamato monossódico elevou a aceitação sensorial das sopas elaboradas com diferentes sais de cloretos, podendo ser utilizado como uma opção viável para realçar e melhorar o sabor desses produtos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná e a Universidade Estadual do Centro-Oeste pelo auxílio no desenvolvimento da pesquisa.

REFERÊNCIAS

1. Gomes E. Importância dos minerais na dieta. 2008 [acesso 2014 Jun 20]. Disponível em: [http://www.tribunamt.com.br/2008/11/a-importancia-dos-minerais-na-dieta/].
2. Guàrdia MD. Consumer attitude towards sodium reduction in meat products and acceptability of fermented sausages with reduced sodium content. *Meat Sci*.2006;73(3):484-90.
3. Sociedade Brasileira de Cardiologia – Departamento de Hipertensão Arterial. Consensos e Diretrizes. 2011 [acesso 2014 jun 20]. Disponível em: [http://departamentos.cardiol.br/dha/consenso3/tratamento.asp].
4. Lawrence G, Salles C, Septier C, Busch J, Thomas-Danguin T. Oudor-taste interactions: A way to enhance saltines in low-salt content solutions. *Food Qual Prefer*.2009;20(3):241-48.
5. Nascimento R, Campagnol PCB, Monteiro ES, Pollonio MAR. Replacement of sodium chloride by potassium chloride influence on sausage's physical-chemical and sensorial characteristics. *Alim Nutr*.2007;18(3):297-302.
6. Barbosa RG, Emanuelli T, Terra NN. Fabricação de salame tipo hamburguês com substituição parcial de sódio. [dissertação de mestrado]. Santa Maria (RS): Universidade Federal de Santa Maria; 2009.
7. Rech RA. Produção de salame tipo italiano com teor de sódio reduzido. [dissertação de mestrado]. Santa Maria (RS): Universidade Federal de Santa Maria; 2010.
8. McGough MM, Sato T, Rankin SA, Sindelar JJ. Reducing sodium levels in frankfurters using a natural flavor enhancer. *Meat Sci*.2012; 91(2):185-94.
9. Karppanen H, Mervaala E. Sodium intake and hypertension. *Prog Card Dis*.2006;49(2):59-75.
10. Pompeu FR. Tratamento não-farmacológico da hipertensão arterial. Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina da UFMG 2010. [acesso 2014 jun 20]. Disponível em: [http://www.medicina.ufmg.br/edump/clm/imphipert].
11. World Health Organization (WHO). Review and updating of current WHO recommendations on salt/sodium and potassium consumption. Geneva: WHO; 2011. 8p.
12. Barboza LMV, Freitas RJS, Waszczynskij N. Desenvolvimento de produtos e análise sensorial. *Bras Alim*.2003;(18):34-5.
13. Jinap S, Hajeb P. Glutamate. Its applications in food and contribution to health. *Appetite*.2010;55(1):1-10.
14. Dutcosky SD. Análise sensorial de alimentos. 3 ed. Curitiba: Champagnat, 2011. 246p.
15. Reis AT, Toscano MM, Meister MC. Sal em sopas. *Segur Qual Alim*.2008;3(4): 54-5.
16. Carvalho PRRM, Bolognesi VJ, Barreira SMW, Garcia CER. Características e segurança do glutamato monossódico como aditivo alimentar: artigo de revisão. *Visão Acad*.2011;12(1):53-64.
17. Teixeira E, Meinert E, Barbetta PA. Análise sensorial dos Alimentos. Florianópolis: Editora da Universidade Federal de Santa Catarina; 1987. 180 p.

Avaliação da contaminação por bromato em pães do tipo francês

Analysis on the occurrence of bromate contamination in *French type* bread

RIALA6/1610

Dayanna Joyce Marques QUEIROZ^{1*}, Everlane Ferreira MOURA¹, Manuela Alves da CUNHA¹, Anna Cecília Queiroz de Medeiros²

*Endereço para correspondência: ¹Departamento de Nutrição, Centro Universitário do Rio Grande do Norte (UNIRN), Rua Prefeita Eliane Barros, 2000, Tirol, CEP 59014-540, Natal, RN, Brasil. Tel.: (84) 32152917, 32152918. E-mail: dayannajoyse@hotmail.com

²Departamento de Nutrição, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, Brasil

Agência financiadora: CNPQ

Número do processo: 139059/2010-5

Recebido: 18.03.2014 - Aceito para publicação: 29.05.2014

RESUMO

O setor de panificação no Brasil tem realizado esforços para acompanhar as tendências de um mercado exigente e competitivo, e uma das alternativas tem sido os agentes oxidantes. O bromato de potássio (KBrO_3) é um agente oxidante que fortalece as cadeias de glúten. Apesar de benefícios tecnológicos e econômicos, sua toxicidade como aditivo alimentar tem sido demonstrada. No Brasil o emprego do KBrO_3 é proibido em qualquer quantidade nas farinhas e nos produtos de panificação. Foram investigadas amostras de pão Francês provenientes de 25 pontos comerciais, que foram analisadas em triplicatas, totalizando-se 75 ensaios. A determinação de bromatos foi realizada em duas etapas: primeiramente pela prova de triagem utilizando-se o método analítico qualitativo, para identificar amostras positivas para agentes oxidantes e, posteriormente, a determinação de BrO_3^- usando o reativo fucsina-bissulfito. Em todas as amostras foram detectados agentes oxidantes. Na análise confirmatória de bromato, foi identificada a presença deste aditivo em amostras de seis estabelecimentos dos 25 analisados, correspondendo à frequência de 24 % nas amostras examinadas. Este estudo mostra que apesar da proibição do emprego de KBrO_3 em produtos de panificação, há ainda o uso deste componente pelos estabelecimentos comerciais, e isto representa risco à saúde da população.

Palavras-chave. pão, aditivos alimentares, contaminantes químicos.

ABSTRACT

Bread-making sector in Brazil has been doing efforts in order to follow the trends of a demanding and competitive market, and the use of additives (oxidizing agents) has been one alternative. Bromate potassium (KBrO_3) is an oxidizing agent that enhances the gluten chains. Despite their technological and economical benefits, the toxicity of this product has been demonstrated when used as a food additive. In Brazil the addition of KBrO_3 in flour and bakery products is prohibited, in any amount. The *French-type* bread samples collected from 25 commercial spots were analyzed in triplicates, being in total 75 trials. The bromate detection was performed in two steps: firstly a screening test by using a qualitative analytical method for identifying the oxidizing agents-positive samples; and subsequently the determination of BrO_3^- using the fuchsin-bisulfite reagent. This component was found in all of the analyzed samples. The confirmatory analysis identified bromate occurrence in samples from six of 25 analyzed stores, corresponding to a frequency of 24 % of analyzed samples. In spite of the use of potassium bromate has been forbidden in bakeries, this additive has still been employed by bread factories, representing a risk to the population health.

Keywords. bread, food additives, chemical contaminants.

INTRODUÇÃO

O pão, um dos alimentos mais antigos da humanidade, também é um dos mais populares ainda hoje. Sua popularidade se deve ao excelente sabor, preço e fácil disponibilidade. O Brasil conheceu este alimento no século XIX tendo sua atividade de panificação expandida com a chegada dos imigrantes italianos. Sua produção é o resultado do cozimento de massa feita com farinha de trigo, água, sal e fermento (biológico ou químico), sendo estes os componentes básicos para a sua fabricação¹.

É um alimento considerado popular, sendo consumido na forma de lanches ou com refeições, possuindo em sua composição a principal fonte energética do ser humano, o carboidrato, além de apresentar vitaminas do complexo B (tiamina-B1, riboflavina-B2, niacina e tocoferóis) e minerais, como ferro, potássio, sódio, cálcio, magnésio e fósforo².

Porém, o pão é composto não só por componentes básicos e nutricionais, mas também por pequenas quantidades de aditivos alimentares para melhorar as características da massa durante o processamento e a qualidade comercial do produto final. Estes aditivos podem ser gorduras vegetais, açúcares, emulsificantes, agentes oxidantes e enzimas³.

Aditivos alimentares são utilizados para corrigir as deficiências da farinha de trigo, melhorar as características reológicas da massa, aumentar o volume do pão e prolongar a vida útil dos produtos obtidos, entretanto podem agir como agentes oxidantes, branqueadores, emulsificantes e conservantes⁴.

O bromato de potássio ($KBrO_3$) é um agente oxidante que tem como finalidade favorecer a maior retenção de gases (aumento do volume), umidade e melhor textura. Entretanto, através de estudos toxicológicos *in vivo* e *in vitro*, o comitê de peritos da FAO/OMS em Aditivos Alimentares considerou o bromato de potássio como sendo um carcinógeno genotóxico, além de a ingestão prolongada poder ocasionar vômitos, diarreia, possuir efeitos mutagênicos, destruir a vitamina B1, inibir a disponibilidade do ferro e degradar o ácido fólico, sendo, portanto, impróprio para uso como aditivo em farinhas e pães⁵.

Desta forma em muitas partes do mundo, o uso do bromato de potássio como melhorador de pão foi proibido. No Brasil, sua utilização foi proibida a partir da lei nº 10.273/2001⁶ em qualquer quantidade nas farinhas,

no preparo de massas e nos produtos de panificação. No entanto, na literatura encontram-se registros que provam o uso do bromato ilegalmente para o crescimento de pães adulterados, por padarias pouco e sem nenhuma fiscalização nas grandes cidades do país^{5,7}.

Diante do exposto, o presente estudo torna-se relevante tendo em vista a importância para a saúde da população e os escassos estudos no Brasil após a proibição da sua utilização na indústria de panificação. Desta forma, a presente pesquisa teve por objetivo investigar a presença de bromatos em pães do tipo francês de diversos estabelecimentos nas quatro regiões da cidade do Natal-RN.

MATERIAL E MÉTODOS

Tipo de estudo, local de realização e procedimentos gerais

Realizou-se pesquisa laboratorial com abordagem qualitativa em amostras de pães do tipo francês, comercializados em diferentes regiões da cidade de Natal-RN, para avaliar a presença de bromato.

A amostragem compreendeu padarias, mercadinhos e supermercados, localizados em quatro regiões de Natal, de forma não probabilística. As análises foram realizadas no Laboratório de Bromatologia do Centro Universitário do Rio Grande do Norte (UNIRN).

Obtenção e preparação das amostras

Foram coletadas oito amostras de pães do tipo francês em cada um dos 25 pontos comerciais da cidade de Natal/RN e distribuídos pelas quatro regiões da cidade, (norte, sul leste e oeste) sendo 17 padarias, três mercadinhos e cinco supermercados. Todas as amostras foram adquiridas na qualidade de consumidor.

As amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Bromatologia do UNIRN em embalagem original e foram mantidas em temperatura ambiente e protegidas de umidade. Ao início de cada experimento, as amostras foram submetidas a secagem em estufa a 105 °C por 24 horas, trituradas em um multiprocessador de alimentos (modelo RI 7762 Philips Wallita) e pesadas em triplicata, totalizando 75 ensaios. As amostras foram preparadas de acordo com o tipo de análise ao qual seriam submetidas: (i) identificação qualitativa de agentes oxidantes e (ii) identificação qualitativa de bromatos.

Prova de triagem para a presença de agentes oxidantes

A pesquisa de agentes oxidantes foi realizada com base na metodologia descrita pelo Instituto Adolfo Lutz - IAL8.

Após a trituração, com um auxílio de uma peneira de malha fina, 10 g das amostras foram distribuídas sobre um papel filtro, sobre as quais foi adicionada solução de iodeto, sendo o aparecimento de pontos violetas indicativo da presença de agentes oxidantes⁸. As amostras que apresentaram reação positiva foram submetidas à investigação comprobatória de BrO_3^- .

Prova confirmatória de bromatos

Nas amostras positivas para agentes oxidantes, foi realizada a confirmação da presença do bromato com o método indireto com o reativo fucsina-bissulfito, conforme descrito pelo Instituto Adolfo Lutz⁸.

Cada amostra com aproximadamente 50g foi incinerada em mufla a 550 °C por 2- 4 horas até a obtenção de resíduo com cor cinza claro, transferido para dessecador até esfriar, por 30 minutos e posterior identificação do brometo formado pela decomposição térmica do bromato. Foi utilizado sistema de dissolução para isolar o brometo em cada amostra, através da mistura das cinzas com o ácido sulfúrico a 10 % m/v, seguida da adição de água oxigenada a 30 % m/v e acrescentados 3 mL do reativo fucsina-bissulfito previamente preparado (dissolução de 0,1 g de fucsina em pequenas porções de água, triturando-a com bastão de vidro, até atingir 100 mL. Adicionando, com agitação, o bissulfito de sódio em pó até descorar totalmente a solução). O aparecimento de coloração lilás persistente é um indicativo da presença de brometos. Esse método indica qualitativamente a presença de bromatos presente no alimento.

Análise estatística dos dados

Os dados foram analisados por software estatístico SPSS (Statistical Package for the Social Sciences). Os dados foram submetidos à análise descritiva e para investigar a dependência entre as variáveis, foi feito o teste exato de Fisher, com nível de significância de 5 %.

RESULTADO E DISCUSSÃO

Os resultados das análises indicaram a presença de agentes oxidantes em todas as amostras conforme previsto, considerando que na formulação da massa do

pão geralmente são usados aditivos oxidantes, estes agem nas proteínas do glúten formando ligações dissulfeto e conferem fortalecimento à massa. Os agentes oxidantes, como ácido ascórbico, azodicarbonamida e bromato de potássio são os mais comumente usados no setor de panificação, entretanto, o bromato de potássio tem seu uso proibido pela legislação brasileira⁹.

Indrani e Rao¹⁰ avaliaram o efeito de agentes oxidantes, agentes redutores e enzimas na massa de farinha de trigo e observaram que o bromato de potássio e o ácido ascórbico promoveram aumento da estabilidade da massa e área extensográfica, sendo este um dos fatores que levam as panificadoras a fazerem uso dos agentes oxidantes.

A partir dos resultados encontrados dos agentes oxidantes foi realizada a investigação comprobatória do bromato, indicando a presença de BrO_3^- em pães do tipo francês coletados em seis estabelecimentos dos 25 analisados, distribuídos pelas zonas norte, sul, leste e oeste da cidade do Natal/RN, correspondendo a uma frequência de 24 % nas amostras analisadas (Figura 1), sendo que as zonas que apresentaram maiores índices de contaminação por BrO_3^- foram as norte e leste.

Os resultados obtidos confirmam os índices encontrados na literatura sobre o uso indevido desse agente oxidante, proibido pela legislação⁶. Machado e Reyes¹¹ identificaram a presença de bromato de potássio em nove das 18 amostras de marcas de melhoradores líquidos provenientes da região nordeste, enquanto Albino et al¹², quando analisaram amostras de pães em 29 estabelecimentos, detectaram a presença do bromato de potássio em amostras de seis deles.

Oloyede e Sunmonu¹³ demonstraram que a ingestão de pães contendo bromato de potássio por camundongos ocasionou graves efeitos sobre o fígado e células renais, evidenciado por atividades reduzidas de alanina transaminase (AST), aspartato transaminase (ALT) e fosfatase alcalina (ALP) nos tecidos. O consumo de tais pães pode resultar em danos nos rins e no fígado e, como tal, devem ser evitados.

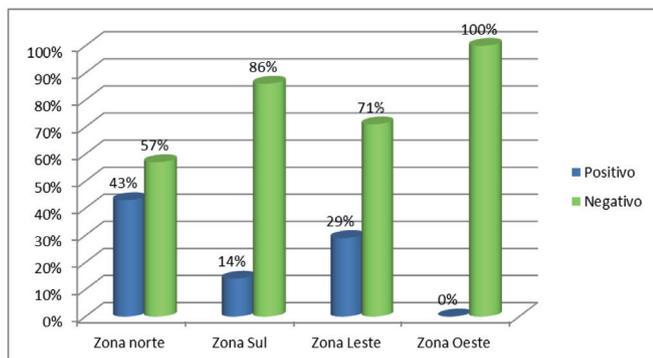
Na Figura 2, observa-se o resultado da análise qualitativa confirmatória para bromato em pães do tipo francês de acordo com o tipo de estabelecimento pesquisado, na qual é evidenciada que a contaminação por bromato ocorre apenas em padarias e mercadinhos, o que pode ser explicado pelo maior rigor na fiscalização a que estão submetidas as grandes empresas. Estes dados corroboram o estudo de Rafael et al¹⁴, que destacou que embora alguns países já tenham proibido o uso de

bromato de potássio na produção do pão, este ainda continua a ser utilizado principalmente por padarias que comercializam produtos artesanais.

Emeje et al⁵ mostraram que, na análise qualitativa de 23 amostras de pães analisadas, 21 delas apresentaram a cor lilás indicativa da presença de bromato, enquanto que na análise quantitativa foi percebida a presença do aditivo em 100 % das amostras. O estudo justificou este resultado estabelecendo a possibilidade de que possivelmente as amostras de pães que não foram identificadas na análise qualitativa devido à presença de quantidade residual insuficiente na amostra que não poderia ser detectados pelo reagente.

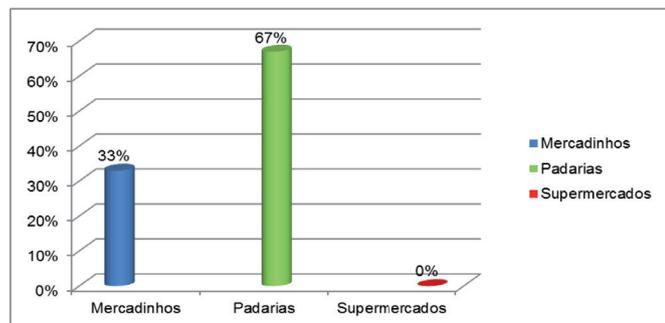
Porém, no presente estudo não houve relação estatisticamente significativa entre a positividade para bromato e a zona da cidade e/ou o tipo de estabelecimento ($p>0,05$).

CONCLUSÃO



Fonte: Dados da Pesquisa (2011)

Figura 1. Percentagem de amostras de pão francês contaminadas por bromatos por zonas da cidade do Natal/RN em 2011



Fonte: Dados da Pesquisa (2011)

Figura 2. Percentagem de amostras de pão do tipo francês contaminadas por bromatos por tipo de estabelecimentos da cidade do Natal/RN em 2011

Todas as amostras de pães do tipo francês analisadas indicaram a presença de agente oxidante, sendo que 24 % apresentaram bromato, principalmente na região da zona norte de Natal/RN. Este fato é preocupante, tendo em vista que não é permitida qualquer quantidade deste aditivo em produtos de panificação, devido o grau de toxicidade e carcinogenicidade, além de perdas nutricionais. Os resultados obtidos sugerem a necessidade de intensificar a fiscalização junto aos proprietários dos estabelecimentos, através de orientações sobre os riscos do uso do bromato de potássio, além do desenvolvimento de mais estudos com análises qualitativas e quantitativas nos pães e produtos de panificação a fim de identificar este aditivo mesmo que em pequenas quantidades.

REFERÊNCIAS

1. Sebrae. Encarte Técnico: A importância do Pão do Dia (Tipo Francês) para o segmento da Panificação no Brasil. [acesso em: 15 Julho. 2011] Disponível em: [http://www.biblioteca.sebrae.com.br/bds/bds.nsf/d086c43daf01071b03256ebe004897a0/4c9fe331fb9d9a73832576ac00662e6a?OpenDocument]
2. Araújo WMC, Montebello NP, Botelho RBA, Borgo L. *Alquimia dos Alimentos*. Brasília: Editora SENAC-DF; 2009.
3. Polônio MLT, Peres F. Consumo de aditivos alimentares à saúde: desafios para a saúde pública brasileira. *Cad.Saúde Pública*. 2009; 25(8): 1653-66.
4. Pavanelli AP. Aditivos para panificação: conceitos e funcionalidade. Oxiteno S/A Indústria e Comércio, São Paulo, 2000. [acesso em: 2 jul. 2010] Disponível em: http://www.oxiteno.com.br/aplicacoes/mercados/doc/documento
5. Emeje MO, Ofoefule SI, Nnaji AC, Ofoefule AU, Brow SA. Assessment of bread safety in Nigeria: quantitative determination of potassium bromate and lead. *Afr J Food Sci*.2014;(6):394- 97:
6. Brasil. Lei nº. 10.273, de 05 de setembro de 2001. Dispõe sobre o uso do bromato de potássio na farinha e nos produtos de panificação. *Diário Oficial [da] União*. Brasília, DF, 06 de Set. 2001. [acesso em: 5 de Maio de 2010]. Disponível em: http://www.lexml.gov.br/urn/urn:lex:br:federal:lei:2001-09-05;10273.
7. Dallago RM, Nascimento Filho L, Zanella R, Maroneze AM. Determinação de bromato em melhoradores de farinha por cromatografia de troca iônica com detecção espectrofotométrica. *Quim Nova*.2005;28(4):716-8.
8. Zenebon O, Pascuet NS, Tiglea P. *Métodos físicos e químicos de análise de alimentos*. 4ª ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz; 2008.
9. Pereira EPR, Amorim EOC, Ambiel HCI, Chang YK. Influência de agentes oxidantes sobre as propriedades reológicas de massas de farinha de trigo branca sobre o volume específico de pão francês. *Braz J Food Technol*.2009;12(3):161-171.
10. Indrandi D, Rao GV. Effect of additives on rheological characteristics and quality of wheat hour parotta. *J Tex Stud*.2006;37(3):315-38.

11. Machado MCMST, Reyes FGR. Determinação de bromato de potássio em farinhas. *Rev Farm Bioquim Univ SP*.1995;31(1):29-33.
12. Albino E, Souza RCR, Gomes SC, Santos AC, Beltrão AB. Bromato de potássio em aditivos para a panificação usada em padarias do III Distrito Sanitário do Recife, PE-2006. *Hig Alim*.2009;23(170/171):151-5.
13. Oloyede OB, Sunmonu TO. Potassium bromate content of bread samples selected in Ilorin, Nigeria Central and their effect on some enzymes of the liver and rat kidney. *Food Chem Toxicol*.2009;47(8):2067-70.
14. Rafael A, Pino J, Gonzales J, Francia JC, Shiga B. Efecto citoprotector del camu-camu *Myrciaria dúbia* en tres líneas celulares de ratón expuestos in vivo a bromato de potássio. *Rev Peru Biol*.2010;17(3):389- 92.

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

A Revista do Instituto Adolfo Lutz (RIAL), iniciada em 1941, é uma publicação trimestral com a missão de divulgar resultados de investigações científicas relacionadas às ações de promoção à saúde, prevenção e controle de agravos e doenças de interesse em saúde pública, além de incentivar a produção de artigos científicos nas áreas de vigilância epidemiológica e sanitária e de proporcionar a atualização e aprimoramento de profissionais da área em âmbito nacional e internacional.

A RIAL é inter e multidisciplinar, arbitrada, aberta a contribuições de autores nacionais e estrangeiros. Publica prioritariamente pesquisas originais com contribuições relevantes na área laboratorial em saúde pública, realizadas com rigor científico e que possam ser replicadas e generalizadas.

POLÍTICA EDITORIAL

Editada nos formatos impresso e eletrônico, a RIAL tem interesse por trabalhos originais em todas as áreas laboratoriais em saúde pública. São também publicadas outras contribuições inéditas, desde que sobre temas atuais e importantes – revisões de literatura, comunicações breves e notas científicas – além de resumos de teses e dissertações.

Os manuscritos devem destinar-se exclusivamente à RIAL, não sendo permitida sua apresentação simultânea a outro periódico. As contribuições podem ser apresentadas em português ou inglês.

Os manuscritos submetidos são analisados inicialmente pelos editores quanto ao atendimento aos padrões da RIAL e às normas para o envio dos originais. Aqueles manuscritos selecionados são encaminhados para avaliação por pares externos de área pertinente, sempre de instituições distintas àquela da origem do manuscrito, sendo garantido o anonimato e a confidencialidade durante todo o processo de avaliação. Após receber os pareceres, o Corpo Editorial, que detém a decisão final sobre a publicação ou não do texto, avalia a aceitação do texto sem modificações, a recusa ou a devolução ao autor com as sugestões apontadas pelos relatores. Os manuscritos submetidos devem atender à política editorial da RIAL e às Instruções aos Autores, que seguem os *Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Writing and Editing for Biomedical Publication* (<http://www.icmje.org>), além dos critérios éticos da pesquisa humana e animal.

Os autores devem explicitar em MÉTODOS que a pesquisa foi conduzida dentro dos padrões exigidos pela Resolução 466 de 12 de dezembro de 2012 do Ministério da Saúde – Conselho Nacional da Saúde, em caso de ética humana, e pela Lei Federal 11.794 de 08 de outubro de 2008, pela Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos - DBCA de 2013 e pelas Resoluções Normativas Nº 12, Nº 13 e Nº 14 no caso de experimentação animal. A pesquisa deverá ser aprovada por comissão de ética humana (CEP) reconhecida pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) – vinculada ao Conselho Nacional de Saúde (CNS), bem como registro dos estudos de ensaios clínicos em base de dados, conforme recomendação aos editores da Lilacs e Scielo, disponíveis em: <http://bvsmodelo.bvsalud.org/site/lilacs/homepage.htm>. No caso de experimentação animal o projeto deverá ser aprovado por Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) reconhecida pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal do Ministério de Ciência e Tecnologia e Inovação (CONCEA). O nome da base de dados, sigla e/ou número do ensaio clínico, assim como o número do processo e o nome da comissão de ética que aprovou o projeto, deverão ser colocados ao final do RESUMO. Nos casos de ensaios envolvendo animais, estes deverão atender a Lei Federal 9605 contra crimes ambientais, a Lei federal 6638/76 e a Lei 11.794/08, que normatiza a utilização de animais em pesquisa científica. Os autores deverão ter em seu poder todos os documentos referentes a este procedimento, que poderão ser solicitados em qualquer momento pelos editores.

Os autores serão responsáveis por reconhecer e revelar conflitos financeiros, de interesse comercial e/ou associativo, relacionados ao material de trabalho ou outros que possam influenciá-los, apresentando uma declaração sobre a existência ou não de tais conflitos. Os relatores também devem revelar aos editores qualquer conflito que possa influir ou impedir as suas avaliações.

Os manuscritos publicados são de propriedade da RIAL. A transferência de direitos autorais será solicitada após a aprovação do manuscrito para publicação.

Informações Gerais

Os manuscritos submetidos à publicação na RIAL devem ser apresentados de acordo com as Instruções aos Autores.

São aceitos manuscritos nos idiomas: português e inglês.

O manuscrito deve ser encaminhado em formato eletrônico (e-mail) ou impresso, aos cuidados do editor-chefe da RIAL, no seguinte endereço:

REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ (RIAL)

Núcleo de Acervo

Av. Dr. Arnaldo, 355 - Cerqueira César - São Paulo - SP - Brasil - CEP: 01246-902

Ou por meio eletrônico em rial@saude.sp.gov.br

Pormenores sobre os itens exigidos para apresentação do manuscrito estão descritos a seguir.

1. CATEGORIA DE ARTIGOS

1.1 Artigos Originais: Incluem estudos relacionados à prevenção e controle de agravos e à promoção à saúde. Devem ser baseados em novos dados ou perspectivas relevantes para saúde pública. Cada artigo deve conter objetivos e hipóteses claras, desenho e métodos utilizados, resultados, discussão e conclusões.

Informações Complementares:

- Devem ter até 20 laudas impressas, excluindo resumos, tabelas, figuras e referências.
- As tabelas, figuras, gráficos e fotos, limitadas a 05 no conjunto, devem incluir apenas os dados imprescindíveis. As figuras não devem repetir dados já descritos em tabelas. Devem ser apresentadas em arquivo separado.
- As referências bibliográficas, limitadas a 40, devem incluir apenas aquelas estritamente pertinentes e relevantes à problemática abordada. Deve-se evitar a inclusão de número excessivo de referências numa mesma citação. Citações de documentos não publicados e não indexados na literatura científica (teses, relatórios e outros) devem ser evitadas.
- Os resumos em português e em inglês (*abstract*) devem ter até 200 palavras, com a indicação de 3 a 6 palavras-chave (*keywords*).
- A estrutura dos artigos originais de pesquisa é a convencional: Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão e Conclusão, embora outros formatos possam ser aceitos, mas respeitando a lógica da estrutura de artigos científicos.

1.2 ARTIGOS DE REVISÃO: Dedicados à apresentação e à discussão de temas de interesse científico e de relevância para a saúde pública. Devem apresentar formulação clara de um objeto científico de interesse, argumentação lógica, crítica teórico-metodológica dos trabalhos consultados e síntese conclusiva. Devem ser elaborados por pesquisadores com experiência no campo em questão ou por especialistas de reconhecido saber.

Informações complementares:

- Devem ter até 25 laudas impressas, excluindo resumos, tabelas, figuras e referências.
- As tabelas, figuras, gráficos e fotos, limitadas a 03 no conjunto, devem incluir apenas os dados imprescindíveis. As figuras não devem repetir dados já descritos em tabelas. Devem ser apresentadas em arquivo separado.
- As referências bibliográficas, limitadas a 50, devem incluir apenas aquelas estritamente pertinentes e relevantes à problemática abordada. Deve-se evitar a inclusão de número excessivo de referências numa mesma citação. Citações de documentos não publicados e não indexados na literatura científica (teses, relatórios e outros) devem ser evitadas.
- Os resumos em português e em inglês (*abstract*) devem ter até 200 palavras, com a indicação de 3 a 6 palavras-chave (*keywords*).

1.3 COMUNICAÇÕES BREVES: São relatos sucintos destinados à rápida divulgação de eventos significativos no campo da pesquisa de interesse em saúde pública e que não comportam uma análise mais abrangente.

Informações complementares:

- Devem ter até 10 laudas impressas, excluindo resumos, tabelas, figuras e referências.
- As tabelas, figuras, gráficos e fotos, limitadas a 02 no conjunto, devem incluir apenas os dados imprescindíveis. As figuras não devem repetir dados já descritos em tabelas. Devem ser apresentadas em arquivo separado.
- As referências bibliográficas, limitadas a 15, devem incluir apenas aquelas estritamente pertinentes e relevantes à problemática abordada. Deve-se evitar a inclusão de número excessivo de referências numa mesma citação. Citações de documentos não publicados e não indexados na literatura científica (teses, relatórios e outros) devem ser evitadas.
- Os resumos em português e em inglês (*abstract*) devem ter até 200 palavras e devem ter entre 3 a 6 palavras-chave (*keywords*).
- Sua apresentação deve acompanhar as mesmas normas exigidas para artigos originais.

1.4 NOTAS CIENTÍFICAS: São relatos sucintos destinados à rápida divulgação de eventos relevantes de uma pesquisa experimental que justifique a publicação de resultados parciais.

Informações complementares:

- Devem ter até 06 laudas impressas, excluindo resumos, tabelas, figuras e referências.
- As tabelas, figuras, gráficos e fotos, limitadas a 02 no conjunto, devem incluir apenas os dados imprescindíveis. As figuras não devem repetir dados já descritos em tabelas. Devem ser apresentadas em arquivo separado.
- As referências bibliográficas, limitadas a 10, devem incluir apenas aquelas estritamente pertinentes e relevantes à problemática abordada. Deve-se evitar a inclusão de número excessivo de referências numa mesma citação. Citações de documentos não publicados e não indexados na literatura científica (teses, relatórios e outros) devem ser evitadas.
- Os resumos em português e em inglês (*abstract*) devem ter até 200 palavras e devem ter entre 3 a 6 palavras-chave (*keywords*).
- Sua apresentação deve acompanhar as mesmas normas exigidas para artigos originais, porém na forma de texto único.

1.5 RELATOS DE CASO: São textos que contemplam principalmente a área médica, em que o resultado é anterior ao interesse de sua divulgação ou a ocorrência dos resultados não é planejada.

Informações complementares:

- Devem ter até 03 laudas impressas, excluindo resumos, tabelas, figuras e referências.
- As tabelas, figuras, gráficos e fotos, limitadas a 02 no conjunto, devem incluir apenas os dados imprescindíveis. As figuras não devem repetir dados já descritos em tabelas. Devem ser apresentadas em arquivo separado.
- As referências bibliográficas, limitadas a 10, devem incluir apenas aquelas estritamente pertinentes e relevantes à problemática abordada. Deve-se evitar a inclusão de número excessivo de referências numa mesma citação. Citações de documentos não publicados e não indexados na literatura científica (teses, relatórios e outros) devem ser evitadas.
- Os resumos em português e em inglês (*abstract*) devem ter até 200 palavras e devem ter entre 3 a 6 palavras-chave (*keywords*).
- Devem apresentar Introdução, Relato de caso, Discussão e Conclusão, na forma de texto único.

1.6 RESUMOS DE TESES E DISSERTAÇÕES: São aceitos resumos de teses e dissertações até um ano após a defesa.

Informações complementares:

- Devem ter até 400 palavras e devem ter entre 3 a 6 palavras-chave (*keywords*).
- Sua apresentação deve conter o nome do autor e do orientador, título do trabalho em português e em inglês, nome da instituição em que foi apresentado, área de concentração e ano da defesa.

2. APRESENTAÇÃO DO MANUSCRITO: Os textos devem ser redigidos em processador de texto Word for Windows 2003 ou compatível, no formato A4, espaço duplo, fonte Times New Roman, tamanho 12. Devem ser evitados arquivos compactados. A estrutura do manuscrito deve estar em conformidade com as normas do Sistema Vancouver – Título; Autores e Instituições; Resumo e *Abstract*; Introdução; Material e Métodos; Resultados; Discussão; Conclusão; Agradecimentos; Referências; Tabelas; Figuras e Fotografias.

2.1 PÁGINA DE IDENTIFICAÇÃO: Deve constar:

Título em português e em inglês: O título deve ser conciso, completo e conter informações. Se o manuscrito for submetido em inglês, deve ser fornecido um título em português.

Autores: De acordo com o *International Committee of Medical Journal Editors* (ICMJE), são considerados autores aqueles que contribuíram substancialmente para a concepção e planejamento, ou análise e interpretação dos dados; contribuíram significativamente na elaboração do rascunho ou na revisão crítica do conteúdo e participaram da aprovação da versão final do mesmo. Somente a aquisição de financiamento, a coleta de dados ou supervisão geral de grupos de pesquisa não justificam autoria – maiores esclarecimentos sobre autoria podem ser encontrados na página do ICMJE (<http://www.icjme.org>). Deve constar o nome completo, sem abreviações e com último sobrenome em caixa alta (exemplo: Ana Maria Camargo da SILVA) e o e-mail do autor responsável. O autor responsável para troca de correspondência deve estar assinalado com asterisco (*) e apresentar também o endereço completo.

Afiliação: Deve ser indicada a instituição à qual cada autor está afiliado, na seguinte ordem de hierarquias institucionais de afiliação: laboratório, setor, seção, serviço, divisão, departamento, instituto, faculdade e universidade.

Financiamento da pesquisa: Se a pesquisa foi subvencionada, indicar o tipo de auxílio, o nome da agência financiadora e o respectivo número do processo.

Apresentação prévia: Quando baseado em tese ou dissertação, indicar o nome do autor, título, ano, nome do programa de pós-graduação e instituição onde foi apresentada. Quando apresentado em evento científico, indicar o nome do evento, local e ano da realização.

2.2 PREPARO DO MANUSCRITO:

Resumo/Abstract: Todos os textos deverão ter resumos em português e inglês, dimensionados para ter até 200 palavras. Como regra geral, o resumo deve incluir objetivos do estudo, principais procedimentos metodológicos, principais resultados e conclusões.

Palavras-chave/keywords: Devem ser indicados entre 3 a 6 descritores do conteúdo, extraídos do vocabulário Descritores em Ciências da Saúde (DeCS) da Bireme (disponível em <http://www.bireme.br>) nos idiomas português e inglês. Em inglês, com base no Medical Subject Headings (MeSH).

Caso não sejam encontrados descritores adequados para a temática do manuscrito, poderão ser indicados termos não existentes nos conjuntos citados.

Estrutura do texto:

A) Introdução: Deve ser breve, relatando o contexto e a justificativa do estudo, apoiados em referências pertinentes ao objetivo do manuscrito, sintetizando a importância e destacando as lacunas do conhecimento abordadas. Não deve incluir dados ou conclusões do estudo em referência

B) Material e Métodos: Os procedimentos adotados devem ser descritos claramente, bem como as variáveis analisadas, com a respectiva definição, quando necessária, e a hipótese a ser testada. Devem ser descritas a população e a amostra, instrumentos de medida, com a apresentação, se possível, de medidas de validade e conter informações sobre a coleta e processamento de dados. Deve ser incluída a devida referência para os métodos e técnicas empregados, inclusive os métodos estatísticos; métodos novos ou substancialmente modificados devem ser descritos, justificando as razões para seu uso e mencionando suas limitações.

Os critérios éticos da pesquisa devem ser respeitados; os autores devem explicitar que a pesquisa foi conduzida dentro de padrões éticos e foi aprovada por comitê de ética, indicando o nome do comitê de ética, número e data do registro.

C) Resultados: Devem ser apresentados em uma sequência lógica, iniciando-se com a descrição dos dados mais importantes. Tabelas e figuras devem ser restritas àquelas necessárias para argumentação e a descrição dos dados no texto deve ser restrita aos mais importantes. Os gráficos devem ser utilizados para destacar os resultados mais relevantes e resumir relações complexas. Dados em gráficos e tabelas não devem ser duplicados nem repetidos no texto. Os resultados numéricos devem especificar os métodos estatísticos utilizados na análise.

D) Discussão: A partir dos dados obtidos e resultados alcançados, os novos e importantes aspectos observados devem ser interpretados à luz da literatura científica e das teorias existentes no campo. Argumentos e provas baseadas em comunicação de caráter pessoal ou divulgadas em documentos restritos não podem servir de apoio às argumentações do autor. Tanto as limitações do trabalho quanto suas implicações para futuras pesquisas devem ser esclarecidas. Incluir somente hipóteses e generalizações baseadas nos dados do trabalho. As conclusões podem finalizar esta parte, retomando o objetivo do trabalho ou serem apresentadas em item separado.

E) Agradecimentos: Este item é opcional e pode ser utilizado para mencionar os nomes de pessoas que, embora não preencham os requisitos de autoria, prestaram colaboração ao trabalho. Será preciso explicitar o motivo do agradecimento, por exemplo, consultoria científica, revisão crítica do manuscrito, coleta de dados etc. Deve haver permissão expressa dos nomeados e o autor responsável deve anexar a Declaração de Responsabilidade pelos Agradecimentos. Também pode constar desta parte apoio logístico de instituições.

2.3 CITAÇÃO NO TEXTO: A exatidão das referências é de responsabilidade dos autores. Devem ser indicadas pelo seu número na listagem, na forma de expoente, sem uso de parênteses, colchetes e similares. Nos casos em que há citação do nome do autor, o número da referência deve ser colocado a seguir do nome do autor. Trabalhos com dois autores devem fazer referência aos dois autores ligados por “e”. Nos outros casos apresentar apenas o primeiro autor (seguido de et al, em caso de autoria múltipla).

Exemplos: Nos Estados Unidos e Canadá, a obrigatoriedade da declaração dos nutrientes no rótulo do alimento é mais antiga e foram desenvolvidos métodos hidrolíticos, como o AOAC 996.061, de extração e determinação da GT por cálculo a partir dos AG obtidos por cromatografia gasosa com detector de ionização em chama (GC/DIC)^{2,3}.

Segundo Chang et al³¹, o aumento do tamanho das partículas resulta numa redução da área de superfície conferindo uma melhora na retenção e estabilidade das mesmas.

2.4 REFERÊNCIAS: Listadas ao final do texto, devem respeitar a quantidade definida para cada categoria de artigos aceitos pela RIAL. As referências devem ser normalizadas de acordo com o estilo *Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Writing and Editing for Biomedical Publication*, numeradas consecutivamente na ordem em que foram mencionadas a primeira vez no texto.

Os títulos de periódicos devem ser referidos de forma abreviada, de acordo com o *Medline*, disponível no endereço <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=journals>. Para consultar periódicos nacionais e latino-americanos: <http://portal.revistas.bvs.br/main.php?home=true&lang=pt>.

No caso de publicações com até seis autores, citam-se todos; acima de seis, citam-se os seis primeiros, seguidos da expressão latina “et al”. Referências de um mesmo autor devem ser organizadas em ordem cronológica crescente.

Exemplos:**Artigos de periódicos:**

Aued-Pimentel S, Zenebon O. Lipídios totais e ácidos graxos na informação nutricional do rótulo dos alimentos embalados: aspectos sobre legislação e quantificação. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2009;68(2):121-6.

Weihrauch JL, Posati LP, Anderson BA, Exler J. Lipid conversion factors for calculating fatty acids contents of foods. *J Am Oil Chem Soc*. 1977;54:36-40.

Hennington EA. Acolhimento como prática interdisciplinar num programa de extensão. *Cad Saude Coletiva [Internet]*. 2005;21(1):256-65. Disponível em: [\[http://www.scielo.br/pdf/csp/v21n1/28.pdf\]](http://www.scielo.br/pdf/csp/v21n1/28.pdf).

LIVROS:

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

Lopez D, organizador. Estudos epidemiológicos qualitativos. São Paulo: James Martim; 2009.

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

Foley KM, Gelband H, editors. Improving palliative care for cancer. Washington: National Academy Press 2001 [acesso 2003 Jul 13]. Disponível em: [http://www.nap.edu/catalog.php?record_id=10149].

Capítulos de livro:

Wirdh L. História da Epidemiologia. In: Lopez D, organizador. Estudos epidemiológicos qualitativos. São Paulo: James Martim; 2009.p.64-76.

Dissertações, teses e monografias:

Santos EP. Estabilidade química da manteiga da terra [dissertação de mestrado]. Bananeiras (PB): Universidade Federal da Paraíba;1995.

Moreschi ECP. Desenvolvimento e validação de métodos cromatográficos e avaliação da estabilidade de vitaminas hidrossolúveis em alimentos [tese de doutorado]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo; 2006.

Trabalhos de congressos, simpósios, encontros, seminários e outros:

Barboza et al. Descentralização das políticas públicas em DST/AIDS no Estado de São Paulo. III Encontro do Programa de Pós-Graduação em Infecções e Saúde Pública; agosto de 2004; São Paulo: Rev Inst Adolfo Lutz. p. 34 [resumo 32-SC].

DADOS ELETRÔNICOS:

Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo – SABESP. O que fazemos/Qualidade da água. [acesso 2008 Set 17]. Disponível em: [<http://www.sabesp.com.br/CalandraWeb/CalandraRedirect/?temp=4&proj=sabesp&pub=T&db=&doci>].

Legislação:

Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. Diário Oficial [da] Republica Federativa do Brasil. Brasília, DF, 10 jan. 2001. Seção 1, nº7-E. p.45-53.

Autoria institucional:

Instituto Adolfo Lutz (São Paulo - Brasil). Métodos físico-químicos para análise de alimentos: normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. 4ª ed. [1ª ed. digital]. São Paulo (SP): Instituto Adolfo Lutz; 2008. Disponível em: [http://www.ial.sp.gov.br/index.php?option=com_remository&Itemid=7&func=select&orderby=1&Itemid=7].

Organización Mundial de la Salud – OMS. Como investigar el uso de medicamentos em los servicios de salud. Indicadores seleccionados del uso de medicamentos. Ginebra; 1993. (DAP. 93.1).

Patente:

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

Casos não contemplados nesta instrução devem ser citados conforme indicação do Committee of Medical Journals Editors (Grupo Vancouver), disponível em: <http://www.cmje.org>. Referências a documentos não indexados na literatura científica mundial, em geral de divulgação circunscrita a uma instituição ou a um evento (teses, relatórios de pesquisa, comunicações em eventos, dentre outros) e informações extraídas de documentos eletrônicos, não mantidas permanentemente em sites, se relevantes, devem figurar no rodapé das páginas do texto onde foram citadas.

2.5 NÚMEROS DE FIGURAS E TABELAS: A quantidade de figuras e tabelas de cada manuscrito deve respeitar a quantidade definida para cada categoria de artigos aceitos pela RIAL. Todos os elementos gráficos ou tabulares apresentados serão identificados como figura ou tabela, e numerados sequencialmente a partir de um, e não como quadros, gráficos etc.

A) Tabelas: Devem ser redigidas em processador de texto Word for Windows 2003 ou compatível e serem apresentadas em arquivos separados, numeradas consecutivamente com algarismos arábicos, na ordem em que foram citadas no texto. A cada uma deve-se atribuir um título breve, não se utilizando traços internos horizontais ou verticais. As notas explicativas devem ser limitadas ao menor número possível e colocadas no rodapé das tabelas e não no cabeçalho ou título. Se houver tabela extraída de outro trabalho, previamente publicado, os autores devem solicitar formalmente autorização da revista que a publicou, para sua reprodução.

B) Figuras: As ilustrações (fotografias, desenhos, gráficos etc.) devem ser citadas como Figuras, apresentadas em arquivos separados e numeradas consecutivamente com algarismos arábicos na ordem em que foram citadas no texto. Devem conter título e legenda apresentados na parte inferior da figura. Só serão admitidas para publicação figuras suficientemente claras e com qualidade digital que permitam sua impressão, preferencialmente no formato vetorial. No formato JPEG,

a resolução mínima deve ser de 300 dpi. Figuras em cores serão publicadas quando for necessária à clareza da informação e os custos deverão ser cobertos pelos autores. Se houver figura extraída de outro trabalho, previamente publicado, os autores devem solicitar autorização, por escrito, para sua reprodução.

3. DECLARAÇÕES E DOCUMENTOS SOLICITADOS: Em conformidade com as diretrizes do International Committee of Medical Journal Editors, são solicitados alguns documentos e declarações do(s) autor(es) para a avaliação de seu manuscrito. Observe a relação dos documentos abaixo e, nos casos em que se aplique, anexe o documento ao processo. O momento em que tais documentos serão solicitados é variável:

Documento/declaração	Quem assina	Quando anexar
Carta de Apresentação	Todos	Submissão
Responsabilidade pelos Agradecimentos	Autor responsável	Aprovação
Responsabilidade pelos Agradecimentos	Todos	Aprovação

A carta de Apresentação do manuscrito, assinada por todos os autores, deve conter:

- Um parágrafo declarando a responsabilidade de cada autor: ter contribuído substancialmente para a concepção e planejamento ou análise e interpretação dos dados; ter contribuído significativamente na elaboração do rascunho ou na revisão crítica do conteúdo; e ter participado da aprovação da versão final do manuscrito. Para maiores informações sobre critérios de autoria, consulte a página do ICMJE (<http://www.icjme.org>).
- Um parágrafo contendo a declaração de potenciais conflitos de interesses dos autores.
- Um parágrafo contendo a declaração que o trabalho não foi publicado, parcial ou integralmente, em outro periódico. Todos os autores devem ler, assinar e enviar documento transferindo os direitos autorais. O artigo só será liberado para publicação quando esse documento estiver de posse da RIAL.

4. VERIFICAÇÃO DOS ITENS EXIGIDOS NA SUBMISSÃO:

1. Nome e instituição de afiliação de cada autor, incluindo e-mail e telefone do autor responsável.
2. Título do manuscrito, em português e inglês.
3. Texto apresentado em letras Times New Roman, corpo 12, em formato Word ou similar (doc, txt, rtf).
4. Resumos em dois idiomas, um deles obrigatoriamente em inglês.
5. Carta de Apresentação assinada por todos os autores.
6. Nome da agência financiadora e número(s) do processo(s).
7. No caso de artigo baseado em tese/dissertação, indicar o nome da instituição/Programa, grau e o ano de defesa.
8. Referências normalizadas segundo estilo Vancouver, ordenadas pela citação no texto e numeradas, e se todas estão citadas no texto.
9. Tabelas numeradas sequencialmente, com título e notas, e no máximo com 12 colunas, em formato Word ou similar (doc, txt, rtf).
10. Figura no formato vetorial ou em pdf, ou tif, ou jpeg ou bmp, com resolução mínima 300 dpi.

5. REVISÃO DA REDAÇÃO CIENTÍFICA: Para ser publicado, o manuscrito aprovado é submetido à revisão da redação científica, gramatical e de estilo. A RIAL se reserva o direito de introduzir alterações nos originais, visando a manutenção da homogeneidade e qualidade da publicação, respeitando, porém, o estilo e as opiniões dos autores. Inclusive a versão em inglês do artigo terá esta etapa de revisão.

6. PROVAS: Após sua aprovação pelos editores, o manuscrito será revisado quanto à redação científica. O autor responsável pela correspondência receberá as provas gráficas para revisão por correio eletrônico em formato pdf (portable document format). O prazo máximo para a revisão da prova é de dois dias. É importante cumprir os prazos de revisão para garantir a publicação no fascículo programado. Atrasos nesta fase poderão resultar em remanejamento do artigo para fascículos subsequentes.

7. PUBLICAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO: Os artigos serão publicados em ordem cronológica de aprovação. As datas de recebimento e de aprovação do artigo constarão obrigatoriamente no mesmo.

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

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



CCD
COORDENADORIA DE
CONTROLE DE DOENÇAS



GOVERNO DO ESTADO
SÃO PAULO

Secretaria da Saúde

ISSN 0073-9555

