

# REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ

ISSN 0073-9855  
RIALA6



GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO  
SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE

Volume 73 número 3, 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 3, 2014  
Julho – Setembro 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(3)

ISSN 0073-9855 CDD<sub>18</sub>614.07205

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

(\*) ASSOCIAÇÃO PAULISTA DE BIBLIOTECÁRIOS. Grupo de Bibliotecários Biomédicos. Normas para catalogação de publicações seriadas especializadas, São Paulo, Ed. Polígono, 1.072.

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

Acesso on line / on line access.  
Texto integral / full text.  
<http://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, 01246-000 São Paulo/ SP – Brasil  
Tel/ Fax. + 55 11 3068-2869  
E-mail: [rial@saude.sp.gov.br](mailto:rial@saude.sp.gov.br)

■ ARTIGO DE REVISÃO/REVIEW ARTICLE

- 1611 Fraude em leite: Métodos de detecção e implicações para o consumidor**  
Adulteration of milk and dairy products: Methods for detecting fraudulent addition and its implications for consumer  
Maria Rociene ABRANTES, Carla da Silva CAMPÊLO, Jean Berg Alves da SILVA ..... 244-251

■ ARTIGO ORIGINAL/ ORIGINAL ARTICLE

- 1612 Pesquisa de anticorpos anti-*Leptospira* spp. em grupos ocupacionais no Estado de Pernambuco**  
Detection of antibodies to *Leptospira* spp. in serum samples from occupational groups in the State of Pernambuco  
Sérgio Gesika Maria da SILVA, Júnior Mário Baltazar de OLIVEIRA, Adalberto Leite SILVA NETO, Nivaldo Aparecido de ASSIS, Luis Antonio MATHIAS, Daniel Friguglietti BRANDESPIM, José Wilton PINHEIRO JÚNIOR ..... 252-258
- 1613 Avaliação das informações referentes à presença ou não de glúten em alguns alimentos industrializados**  
Evaluation of the information regarding to the presence or absence of gluten in some processed foods  
Christina Maria Queiroz de Jesus MORAIS, Bruna Kely Barbosa GODOI, Robson Alves LUIZ, Juliana Machado dos SANTO. 259-263
- 1614 Caracterização antibacteriana e fitoquímica de flores de *Hibiscus rosa-sinensis* L. (mimo-de-vênus) e *Hibiscus syriacus* L. (hibisco-da-síria), como fonte de alimento**  
Antibacterial and phytochemical characterization of flowers of *Hibiscus rosa-sinensis* L. (treat-of-venus) and of *Hibiscus syriacus* L. (hibiscus-the-syrian)  
Analú Barbosa da SILVA, José Maria WIEST, Marcelo Pinto PAIM, Giovani GIROLOMETTO..... 264-271
- 1615 Uso de PCR Duplex para detecção dos genes *femA* e *mecA* e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) em *Staphylococcus aureus* isolados de leite cru**  
Detection of *femA* and *mecA* genes in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine raw milk using duplex PCR and determination of the minimum inhibitory concentration of the isolates  
Junia Pacheco TEIXEIRA, Nivaldo da SILVA, Leorges Moraes da FONSECA, Geraldo Marcio da COSTA..... 272-279
- 1616 Sistema de abastecimento de água do município de Catalão-GO: Avaliação da turbidez, cloração e qualidade bacteriológica**  
Water supply system of the city of Catalão-GO: Evaluation of turbidity, chlorination and bacteriological quality  
Juliana Cassiano SILVA, Heleno de Paula PONTES, Gabriel José BARBOSA ..... 280-286
- COMUNICAÇÃO BREVE/ BRIEF COMMUNICATION
- 1617 Ocorrência de partículas magnéticas em amostras de açúcar produzidas e comercializadas no Estado de São Paulo/Brasil**  
Occurrence of magnetic particles in sugar's samples produced and sold in Sao Paulo State/ Brazil  
Sonia de Paula Toledo PRADO, Regina Célia Arantes STANCARI, Elaine Marra de Azevedo MAZON, Maria Helena MARTINI ..... 287-292

---

<b>1618</b>	<b>Comportamento de <i>Escherichia coli</i> entero-hemorrágica, enteropatogênica e enteroinvasiva em ambrosia</b> Behavior of enterohemorrhagic, enteropathogenic and enteroinvasive <i>Escherichia coli</i> in ambrosia) Marina de Mattos FERRASSO, Camile MILAN, Débora Rodrigues SILVEIRA, Cláudio Dias TIMM .....	293-297
<b>1619</b>	<b>Avaliação do sistema Petrifilm™ HS na contagem de Coliformes a 35 °C em leite pasteurizado</b> Evaluation of the Petrifilm™ HS system for counting coliforms at 35 °C in pasteurized milk Andréia CIROLINI, Andressa Mara BASEGGIO, Roberta Juliano RAMOS, Helen da Silva SILVESTRE, Cristhiane Stecanella de Oliveira CATTANI, Cleide Rosana Werneck VIEIRA .....	298-301
<b>1620</b>	<b>Que doce de leite é esse? Uma discussão sobre o padrão de identidade e qualidade do doce de leite pastoso</b> Which dulce de leche is that? A discussion on the identity and quality standard of creamy <i>dulce de leche</i> Louise Cristiane TURCATEL, Patrícia Fernanda Ferreira PIRES, Priscila Reis DINIZ, Sila Mary Rodrigues FERREIRA, Márcia Aurelina De Oliveira ALVES, Márcia Regina BEUX .....	302-308
■ RESUMOS DE TESES E DISSERTAÇÕES		
	<b>Doença renal policística autossômica dominante em felinos da raça Persa: aspectos clínicos, laboratoriais, imagenológicos e genéticos .....</b>	<b>309</b>
■ INSTRUÇÕES AOS AUTORES .....		
		310-315

## Fraude em leite: Métodos de detecção e implicações para o consumidor

### Adulteration of milk: Methods of detection and implications for consumer

RIALA6/1611

Maria Rociene ABRANTES<sup>1</sup>, Carla da Silva CAMPÊLO<sup>1</sup>, Jean Berg Alves da SILVA<sup>2</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Avenida Francisco Mota, 572, Bairro Costa e Silva, Mossoró-RN, CEP 59625-900. E-mail: rocienevet3@hotmail.com

<sup>2</sup>Departamento de Ciências Animais, Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA)

Recebido: 11.07.2013 - Aceito para publicação: 20.08.2014

#### RESUMO

A qualidade do leite consumido no Brasil é uma constante preocupação de técnicos e autoridades ligadas às áreas de saúde e de laticínios. Considerando-se a importância do leite na alimentação humana, é preciso ter conhecimento e fazer averiguação das metodologias empregadas para identificar as fraudes no leite, bem como realizar aperfeiçoamento das técnicas de detecção, com o intuito de garantir a sua autenticidade. Desta forma, este artigo tem por finalidade relatar as principais fraudes de leite evidenciadas, e de acordo com os métodos de detecção utilizados.

**Palavras-chave.** análises físico-químicas, fraude, leite.

#### ABSTRACT

The quality of the milk consumed in the country is a constant concern of technicians and authorities affiliated to the health and dairy products areas. Considering the importance of milk in human nutrition, the paramount issues are the investigation on the methodologies used for detecting fraudulent addition in milk and the improvement of detection techniques in order to ensure its authenticity. The present study aims at reporting the major milk adulterations in accordance with the methodologies used for detecting frauds.

**Keywords.** physico-chemical analyses, adulteration, milk.

## INTRODUÇÃO

A qualidade dos alimentos é um problema mundial, sendo necessária a detecção de produtos fraudados e de qualidade inferior no mercado<sup>1</sup>. Nas indústrias de laticínios, os principais prejuízos com as fraudes são a redução do rendimento de alguns produtos lácteos, a diminuição do valor nutricional, a alteração da qualidade dos produtos beneficiados e o risco aos consumidores em virtude da presença de substâncias que podem causar mal a saúde, tais como agente antimicrobianos, reconstituintes de densidade e neutralizante de acidez entre outras<sup>2,3</sup>.

Inicialmente, as adulterações do leite almejavam o aumento do volume, por meio da adição de água, e desnatam para produção de creme de leite. Posteriormente, foram surgindo novos tipos de adulterações, como adição de soro de queijo, de substâncias conservantes (peróxido de hidrogênio), neutralizantes (hidróxido de sódio, bicarbonato de sódio) e reconstituintes da densidade e crioscopia (sal, açúcar, amido)<sup>4</sup>.

Sousa<sup>5</sup> afirma que a venda de produtos lácteos inseguros a partir de leite cru é verificado em todo o território nacional ameaçando a saúde da população de uma maneira geral, e principalmente dos imunologicamente mais frágeis como crianças, idosos e imunocomprometidos. Em 2007, a Polícia Federal flagrou duas cooperativas de laticínios no estado de Minas Gerais acusadas de adicionar soro de leite, peróxido de hidrogênio e hidróxido de sódio ao leite longa vida integral, numa operação que ficou conhecida como “Ouro Branco”. No início de 2013, o Ministério Público desencadeou a “Operação Leite Compensado” com o objetivo de coibir a fraude em leite cru que era realizada por um grupo de transportadores do interior do Rio Grande do Sul com adição de água e ureia<sup>4</sup>. Em 2014, já foi deflagrada a chamada “Operação Leite Adulterado” I e II, no estado de Santa Catarina<sup>6</sup>, e o III envolvendo os estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul, com o objetivo de investigar e punir os envolvidos em adulteração de leite.

A legislação brasileira considera fraude, a adição de água; subtração de qualquer dos seus componentes, exceto a gordura nos tipos “C” e “magro”; adição de substâncias conservadoras ou de quaisquer elementos estranhos à sua composição; for de um tipo e se apresentar rotulado como de outro de categoria superior; cru vendido como pasteurizado; for exposto ao consumo

sem as devidas garantias de inviolabilidade<sup>7</sup>.

Atualmente as atividades de controle de qualidade do leite incluem prevenção de fraudes e adulterações do produto “in natura”. Segundo Zhang et al<sup>8</sup>, é necessário introduzir algum método de detecção sensível e preciso na rastreabilidade de alimentos no intuito de prevenir e verificar fraudes em produtos.

Assim, este trabalho tem como objetivo discorrer sobre os diferentes tipos de fraudes em leite e algumas técnicas utilizadas na detecção das mesmas, a partir de uma análise de dados e informações obtidas em pesquisa da literatura, bem como a implicação desse problema para o consumidor.

## ALTERAÇÃO INTENCIONAL NA COMPOSIÇÃO DO LEITE

A composição do leite é complexa e pode apresentar variação influenciada por fatores como a raça, alimentação, idade e número de parições, tempo de lactação e variações climáticas. Há limites para essa variação, tanto para detectar problemas na produção, como para acusar adulterações no produto<sup>9</sup>. Os parâmetros oficiais utilizados para este controle incluem acidez, densidade a 15 °C, índice crioscópico, percentual de gordura e de sólidos não solúveis<sup>10</sup>.

As maiores preocupações quanto à qualidade físico-química do leite estão associadas ao estado de conservação, à eficiência do seu tratamento térmico e integridade físico-química, principalmente aquela relacionada à adição ou remoção de substâncias químicas próprias ou estranhas à sua composição<sup>11</sup>.

A fraude pode ocorrer devido à adição de água ao leite, que vai alterar o seu índice de crioscopia, ou mesmo a adição de qualquer outra substância que poderá também alterar outros parâmetros físico-químicos como a densidade, acidez e teor de sólidos não gordurosos<sup>12</sup>. Há também riscos destas substâncias serem prejudiciais à saúde do consumidor.

O leite contaminado por resíduos de antibióticos também é considerado adulterado e impróprio para industrialização, pois afeta o processamento dos derivados lácteos como queijo e demais produtos fermentados e, para o consumo por causar vários problemas, tais como os microbiológicos, na seleção de cepas resistentes, os imunopatológicos, por desencadear reações de hipersensibilidade e choque anafilático, e os toxicofarmacológicos, devido ao efeito teratogênico<sup>13,14</sup>.



Para detecção de fraudes são utilizadas diversas técnicas de rotina<sup>3</sup> e novas metodologias são desenvolvidas a partir da necessidade, em resposta a um novo tipo de fraude que esteja sendo utilizado<sup>2</sup>.

Wanderley et al<sup>15</sup> avaliaram o comportamento dos métodos analíticos oficiais de rotina (lipídios, extrato seco desengordurado, acidez titulável, densidade relativa a 15 °C e crioscopia) e de detecção de fraudes utilizadas para leite fluido. De acordo com os autores, as análises oficiais de rotina não foram eficazes na detecção de irregularidades no leite, sendo necessário realizar análises complementares de substâncias neutralizantes da acidez, conservantes e reconstituintes da densidade.

### **Adição de água**

A principal fraude detectada no leite ainda continua sendo a adição de água com o objetivo de aumentar seu volume<sup>16,17</sup>. A adição de água no leite reduz de forma significativa o seu valor nutritivo, procedimento este que além de prejudicar a qualidade microbiológica do produto, reflete a falta de comprometimento com a produção de leite com qualidade<sup>18</sup>.

A crioscopia indica a temperatura de congelamento do leite, sendo que essa medição do ponto de congelamento é usada como forma de detectar fraude por adição de água. O ponto de congelamento é determinado, principalmente, pelos elementos solúveis do leite, em especial a lactose<sup>19,20</sup>. Esta análise representa um importante atributo qualitativo do leite “in natura” e um determinante da autenticidade do leite de consumo<sup>21</sup>.

Rosa-Campos et al<sup>22</sup>, utilizando metodologias adotadas pelo Instituto Adolfo Lutz, ao analisar oito marcas de leite pasteurizado tipo C na região de Brasília, constataram que uma marca, apresentou ponto de crioscopia e a porcentagem de gordura fora do padrão. Já Mendes et al<sup>16</sup> evidenciaram que 50 % de amostras de leite informal comercializado na cidade de Mossoró/RN apresentaram-se fora dos padrões para crioscopia, seguida do Extrato Seco Desengordurado (ESD) (40,6 %), Extrato Seco Total (EST) (21,9 %), densidade (18,8 %) e acidez (6,2 %).

A presença de água pode ser percebida pela interpretação dos valores obtidos na crioscopia e densidade. A densidade fica reduzida e a crioscopia mais alta, de modo que o valor se aproxima do ponto de congelamento da água<sup>19</sup>.

### **Desnate**

O desnate, retirada de gordura, na propriedade rural é considerada ilegal e é um dos possíveis fatores que podem afetar a porcentagem da gordura no leite<sup>3</sup>. A determinação de gordura é também um dos meios utilizados para verificar fraude em leite<sup>23</sup>.

A determinação da densidade serve como método de detecção de fraudes no leite no que se refere ao desnate ou a adição de água, apesar de não ser um teste conclusivo, pois leites com alto teor de gordura apresentam-se com valores de densidade menores em virtude da baixa densidade das gorduras<sup>21</sup>. O desnate do leite e a adição de amido são alterações que fazem a densidade aumentar<sup>12</sup>.

Silva et al<sup>24</sup>, em pesquisa com leite pasteurizado destinado ao programa do leite no estado Alagoas, utilizando métodos convencionais, constataram que 112 (32 %) amostras analisadas quanto ao teor de gordura não atenderam aos padrões físico-químicos segundo a legislação vigente<sup>25</sup>.

### **Adição de alcalinos**

É considerada fraude intensional, a adição de soluções alcalinas no leite no intuito de aumentar de conservação ou diminuir a acidez. No entanto, a presença dessas substâncias pode ocorrer devido a falhas da higienização e da sanitização que utilizam soluções alcalinas na limpeza de equipamentos, utensílios ou mesmo da própria estrutura física para remoção de gordura do leite<sup>26</sup>.

Oliveira e Santos<sup>26</sup> evidenciaram substâncias alcalinas em 24 (80 %) amostras de leite pasteurizado estado do Ceará.

### **Adição de conservantes**

Outro tipo de fraude do leite é a adição bicarbonatos, formol, ácido bórico, peróxido de hidrogênio, bicromato de potássio, hipocloritos e ácido salicílico empregados como conservantes<sup>27,28</sup>.

O formol e o peróxido de hidrogênio são utilizados em fraudes de leite que visam paralisar a atividade microbiana. Leites com carga microbiana elevada apresentam pH alterado e, conseqüentemente, acidez Dornic elevada, diagnosticado através dos testes de plataforma efetuados durante a recepção, o que causa recusa do leite pelo laticínio<sup>22</sup>.

Fimino et al<sup>17</sup>, em estudo com leite cru dos tanques de expansão da região de Rio Pomba, Minas

Gerais, verificaram presença de formol e de nitrato em 13,0 % e 40,0 % das amostras, respectivamente.

### Adição de reconstituintes

De acordo com a IN 62<sup>10</sup>, não é permitida a utilização de aditivos e coadjuvantes de tecnologia na elaboração do leite. Mesmo que a adição desses elementos não cause problemas de saúde humana, uma vez que não são tóxicos, a legislação não permite sua adição ao leite<sup>22</sup>.

Em 2008, na China ocorreu um dos mais graves exemplos de fraude, onde morreram seis pessoas e 300 mil pessoas adoeceram, devido à adição de melamina ao leite no intuito de mascarar o seu valor protéico<sup>29</sup>.

Firmino et al<sup>17</sup>, verificando o uso de reconstituintes da densidade, não observaram presença de amido, entretanto, foram observados resultados positivos para análise de sacarose em 6,0 %, em 36,0 % das amostras para análise de cloretos, 48,0 % para a presença de pus e em 52,0 % para presença de urina.

A presença de ureia no leite indica a adição de urina animal ou ureia pecuária. A urina é usada para aumentar o volume e, como tem a densidade muito próxima à do leite, a alteração é muito pequena<sup>22</sup>.

Rosa-Campos et al<sup>22</sup> detectaram presença de sacarose em larga escala. De acordo com Behmer<sup>27</sup>, o amido, o açúcar e a urina são utilizados criminosamente para encobrir aguçagem do leite, aumentando a densidade.

### Adição de soro de queijo ao leite

A legislação brasileira, e também a de todos os países desenvolvidos, proíbe a adição de soro de queijo ao leite de consumo. Caso a adição seja feita, o produto final deverá chamar-se “bebida láctea” e não poderia ser considerado leite (tipo A, B, C, esterilizado, etc.)<sup>30</sup>.

A legislação brasileira considera fraude a adição de soro de queijo ao leite pasteurizado, esterilizado ou em pó. Entretanto, por estar quase sempre disponível, uma vez que é um subproduto da fabricação de queijos, de custo reduzido ou nulo, torna-se economicamente atrativa a adição de soro de queijo ao leite, prejudicando diretamente o consumidor e os concorrentes que obedecem à legislação, além de incorrer em crimes previstos na legislação. Uma vez que a adição de soro de queijo ao leite compromete a sua qualidade, torna-se imprescindível o controle deste importante alimento distribuído aos consumidores, para sua utilização como se fosse leite puro<sup>31</sup>.

Esta adição, assim como qualquer outra, é

proibida pela legislação brasileira por reduzir o valor nutritivo do alimento diluindo os teores de proteínas e gorduras. Caracteriza, ainda, prática abusiva que lesa os direitos do consumidor e que pode, em casos de consumo prolongado, gerar desnutrição, principalmente em lactentes. No entanto, para uma grande diversidade de outros produtos como leites fermentados, achocolatados, confeitos, panificações e as denominadas bebidas lácteas, o soro de queijo é um ingrediente de uso comum<sup>32</sup>.

A adição fraudulenta de soro ao leite é normalmente detectada e quantificada pela determinação do glicomacropéptido (GMP), que resulta da quebra da ligação peptídica da k-caseína entre os aminoácidos 105-106 Phe-Met. Desta cisão forma-se a para-k-caseína (1-105) que permanece nas micelas de caseína e o glicomacropéptido (106-169) que fica no soro<sup>31</sup>. No entanto, proteases termoestáveis produzidas por micro-organismos psicrotróficos podem, também, ser responsáveis por esse fenômeno mesmo após o tratamento térmico<sup>33</sup>.

Os hidrolisados podem ser caracterizados utilizando-se métodos que fornecem diferentes informações como a eletroforese em gel de poliácridamida em presença de uréia (ureia-PAGE), que permite boa resolução dos peptídeos com sua carga; eletroforese em presença de duodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), que apresenta uma relação muito boa dos peptídeos, especialmente com relação a sua massa; Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), de fase reversa, que permite uma resolução muito boa dos peptídeos com relação aos aspectos de hidrofobicidade e hidrofiliabilidade; e a de exclusão, que permite uma separação satisfatória dos peptídeos com base em seu tamanho<sup>34,35</sup>. Além desses, outros são também citados para esta detecção em produtos lácteos, como os citados por Bremer<sup>36</sup>, sendo eles colorimétricos ou imunológicos, e mais recentemente, a eletroforese capilar, a espectrometria de massa e os biosensores.

Em pesquisa de leite cru foi detectado percentual médio estimado de soro lácteo no leite variando de 0,81 % a 11,74 %. De acordo com os autores, essas baixas concentrações de soro encontradas em muitas amostras analisadas podem estar relacionadas com a ocorrência de mastite e com a ação dos micro-organismos psicrotróficos proteolíticos encontrados no leite desta região de Rio Pomba, MG. Já que, a proteólise causada por micro-organismos psicrotróficos no leite, principalmente *Pseudomonas* spp., proporciona a degradação parcial da caseína liberando

peptídeos contendo ácido siálico, que influencia no método de detecção de adição de soro ao leite<sup>17</sup>.

Já Montañez et al<sup>37</sup> avaliaram a presença de GMP utilizando SDS-PAGE em 108 amostras de leite em pó e detectaram amostras positivas para fraude por adição de soro em 14,81 % das amostras.

### Resíduos de antibióticos

De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, não é permitido o envio de leite a estabelecimento industrial quando oriundo de animais que estejam sendo submetidos a tratamento com drogas e medicamentos de uso veterinário em geral, passíveis de eliminação pelo leite, motivo pelo qual devem ser afastados da produção pelo período recomendado pelo fabricante, de forma a assegurar que os resíduos da droga não sejam superiores aos níveis fixados em normas específicas<sup>10</sup>.

Métodos usados para garantir amostras livres de resíduos de antimicrobianos incluem: método de inibição microbiológica, métodos imunológicos, métodos enzimáticos, cromatografia gasosa, cromatografia em camada delgada e cromatografia líquida de alta pressão<sup>38</sup>. Vários kits comerciais para pesquisa de antimicrobianos em leite estão disponíveis no mercado, sendo de fácil realização, relativamente baratos e mecanizados, possibilitando análise de várias amostras ao mesmo tempo<sup>39</sup>.

Costa e Lobato<sup>40</sup>, em estudo com leite e bebida láctea UHT utilizando teste de inibição microbiana comercial, observaram uma frequência de contaminação no teste de 1,1 % para amostras de leite UHT.

Segundo Tronco<sup>21</sup>, a adição de substâncias estranhas à composição normal do leite está ligada a fraudes que podem ocorrer desde a fonte de produção até a fase de comercialização.

### FALHAS NA PASTEURIZAÇÃO

Para verificar a eficiência da pasteurização do leite, o processo depende de fatores específicos como o número de micro-organismos iniciais razoavelmente baixo, o leite deve ser mantido em temperatura imprópria ao crescimento microbiano, embalagem adequada e as características físico-químicas do leite cru preservadas ao máximo<sup>41</sup>. Ainda deve avaliar a eficiência desse processo através de provas enzimáticas, como fosfatase e peroxidase, por meio de testes que comprovem a

presença ou ausência destas enzimas no leite<sup>42</sup>. A legislação vigente<sup>10</sup> considera que o leite pasteurizado deve apresentar teste negativo para fosfatase alcalina e teste positivo para peroxidase.

A enzima fosfatase, presente no leite cru e em muitos tecidos, é destruída por um processo de pasteurização adequado. Assim, pode-se determinar se o leite foi suficientemente pasteurizado, testando a ausência dessa enzima<sup>37</sup>. Já a prova de peroxidase também é usada como índice de eficiência da pasteurização e a averiguação de que não houve super aquecimento do leite. A enzima peroxidase é termorresistente e só é inativada quando submetida a temperaturas superiores a 80 °C<sup>22</sup>.

Paiva<sup>44</sup>, em estudo com leite pasteurizado tipo C distribuído em programa social governamental no estado de Minas Gerais, constatou presença de fosfatase alcalina em 23,18 % e ausência de lactoperoxidase em 22,52 % das 151 amostras analisadas, utilizando método oficial na pesquisa da enzima lactoperoxidase e Kit comercial para fosfatase alcalina. Já Silva et al<sup>45</sup>, utilizando método oficial, observaram que apenas 10 % das 30 amostras analisadas atingiram a temperatura ideal de pasteurização, sendo confirmado presença de fosfatase alcalina.

A pasteurização ineficiente pode trazer uma série de prejuízos à população, uma vez que expõe o consumidor à veiculação de vários micro-organismos patogênicos. Por outro lado, o superaquecimento do leite além de ser maléfico no que se refere ao seu conteúdo nutricional pode também mascarar a baixa qualidade da matéria-prima<sup>44</sup>.

### MISTURA DE LEITES DE ESPÉCIES DIFERENTES

Problemas decorrentes da mistura ilegal de leite mais barato com leites mais caros, durante a fabricação de queijos levaram a estudos de métodos para detectar a origem da espécie<sup>46</sup>.

As adulterações em produtos alimentares contendo leite e/ou proteínas lácteas são relativamente frequentes e diversificadas, incluindo adição de leite de vaca ao leite de ovelha e/ou cabra para a preparação de queijos; a incorporação de proteínas do soro na produção de queijos; a adição de caseínas, ou proteínas do soro a produtos alimentares<sup>47</sup>.

A identificação das espécies em produtos lácteos tem uma importância notável na rastreabilidade de alimentos, especialmente pela introdução de produtos no mercado de forma fraudulenta e de qualidade inferior,

levando a prejuízos econômicos e de saúde pública, além de desrespeitar o direito do consumidor<sup>1,48,49</sup>.

É de suma importância a identificação do leite utilizado na fabricação do queijo, especialmente aqueles feitos a partir de uma única espécie, tais como queijos de ovelhas ou cabras. Para evitar a possível substituição fraudulenta de leite desta espécie pelo de vaca, que é mais barato, é necessário desenvolver procedimentos analíticos capazes de detectar tais fraudes e proteger os consumidores de rotulagem enganosa<sup>50</sup>.

Deste modo, a possibilidade de determinar a matéria prima (tipo do leite) que foi utilizada na produção de queijos tem grande importância, não só por garantir a genuidade dos queijos com denominação de origem e dos fabricados com leites puros, mas também na determinação das percentagens de leite em misturas de queijo<sup>47</sup>.

Diversas abordagens analíticas foram aplicadas para este fim, entre estes estão os métodos baseados nas proteínas que são os imunológicos, eletroforéticos e cromatográficos<sup>50</sup>, incluindo ELISA (Enzyme Linked Immno Sorbent Assay)<sup>51</sup>, western blot<sup>52</sup>, eletroforese capilar<sup>53</sup> e CLAE<sup>54</sup>.

Alternativamente, os métodos baseados em DNA, devido à sua extrema sensibilidade, reprodutibilidade e simplicidade, tornaram-se mais populares nas últimas décadas, a substituir os métodos a base de proteínas, devido algumas limitações, como por exemplo, a sensibilidade ao tratamento térmico<sup>49</sup>.

De et al<sup>48</sup> afirmam que as técnicas destinadas a analisar proteínas de leite ou ácidos graxos das diferentes espécies específicas são eficazes, mas têm algumas limitações. Segundo estes autores, os métodos imunológicos e eletroforéticos, com base no exame da proteína, são menos sensíveis ao leite tratado termicamente e não são bem aplicáveis para os produtos lácteos com matrizes complexas. Métodos cromatográficos são sensíveis a ácidos graxos do leite para diferenciar espécie específicas, mas envolvem tempo extra e trabalho.

Nos últimos anos, vários métodos baseados em Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foram desenvolvidos e aplicados em um grande número de teste para identificação das espécies animais<sup>55</sup>.

Particularmente, a PCR tem sido mais utilizada para a detecção específica de origem animal em produtos lácteos e queijos. As células somáticas do leite, principalmente representado por leucócitos, ainda

persistem durante os processos de fabricação de queijo e podem ser usadas como uma fonte de DNA amplificável<sup>51</sup>.

A técnica de PCR foi aplicada com êxito em queijos curados, mas esta técnica só permite uma avaliação qualitativa ou abordagem semi-quantitativa<sup>50</sup>.

## FRAUDES DE ROTULAGEM

Outro tipo de fraude que pode ser detectado é a presença de produtos em desacordo com a rotulagem. Por exemplo, o consumo de produtos que contenham leite bovino e este não seja declarado na rotulagem, poderá causar reações alérgicas, em indivíduos sensíveis a esse produto. As proteínas do soro e as caseínas são frequentemente adicionadas a produtos alimentares devido às suas propriedades agregantes. Assim, por razões éticas e econômicas, torna-se imperativo o desenvolvimento de métodos sensíveis para a detecção dos vários tipos de leites em produtos lácteos e não lácteos<sup>47</sup>.

Tal ato pode ser considerado crime sendo previsto da legislação brasileira: Lei N° 8.137/90, capítulo II, Dos Crimes Contra Economia e as Relações de Consumo: Art. Artigo VII, parágrafo II, vender ou expor à venda mercadoria cuja embalagem, tipo, especificação, peso ou composição esteja em desacordo com as prescrições legais ou que não corresponda à respectiva classificação oficial<sup>56</sup>.

Código de Defesa do Consumidor, Lei N° 8.078/90, capítulo IV, da Qualidade de Produtos e Serviços, da Prevenção e Reparação dos Danos, Seção I, da proteção à saúde e segurança: Art. 8 - os produtos e serviços colocados no mercado de consumo não acarretarão risco à saúde ou segurança dos consumidores exceto os considerados normais e previsíveis em decorrência de sua natureza e fruição, obrigando-se os fornecedores, em qualquer hipótese, a fornecer informações necessárias e adequadas à seu respeito; Art. 18 § 6° - São impróprios ao uso e consumo: II - os produtos deteriorados, alterados, adulterados, avariados, falsificados, corrompidos, fraudados, nocivo á vida ou à saúde, perigosos, ou ainda, aqueles em desacordo com as normas regulamentares de fabricação, distribuição e apresentação; Art. 39 - é vedado ao fornecedor de produtos ou serviços, dentre outras práticas abusivas: VIII - colocar no mercado de consumo, qualquer produto ou serviço, em desacordo com as normas expedidas pelos órgãos oficiais competentes<sup>56</sup>.

Por estas razões, os métodos de controle adequados são necessários para avaliar a autenticidade do produto e para detectar possíveis fraudes<sup>48</sup>.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Relatou-se as principais fraudes que alteram a qualidade do leite e os métodos mais utilizados para sua detecção. A fraude constitui crime, além de representar risco à saúde do consumidor. Fazendo-se necessário o desenvolvimento métodos eficazes para verificação da qualidade do leite.

## REFERÊNCIAS

1. Egito AS, Rosinha GMS, Laguna LE, Miclo L, Girardet JM, Gaillard JL. Método eletroforético rápido para detecção da adulteração do leite caprino com leite bovino. *Arq Bras Med Vet Zootec*.2006;58(5):932-9.
2. Cortez MAS, Dias VG, Maia RG, Costa CCA. Características físico-químicas e análise sensorial do leite pasteurizado adicionado de água, soro de queijo, soro fisiológico e soro glicosado. *Rev Inst Latic Cândido Tostes*.2010;65(376):18-25.
3. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 68, de 12 de dezembro de 2006. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para Controle de Leite e Produtos Lácteos. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Diário Oficial [da] União, Brasília, DF, 14 dez. 2006.
4. Almeida TV. Detecção de adulteração em leite: análises de rotina e espectroscopia de infravermelho. Seminário apresentado ao Curso de Mestrado em Ciência Animal da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, Goiania, 2013. 23p.
5. Sousa DDP. Consumo de produtos lácteos informais, um perigo para saúde pública. Estudo fatores relacionados a esse consumo no município de Jacaré, SP [dissertação de mestrado]. São Paulo (SP): Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo; 2005.
6. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Operação Leite Adulterado I e II. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal/noticias/2014/08/operacao-leite-adulterado-i-e-ii>. Acesso em 20 de nov. de 2014.
7. Brasil. Ministério da Agricultura. Decreto nº 30.691 de 29/03/1952 e alterado pela última vez pelo Decreto nº 6.385, de 27 de fevereiro de 2008. Regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal - RIISPOA. Diário Oficial [da] União, Brasília, DF, 27 fev. 2008. Seção 1, p. 10785.
8. Zhang J, Zhang X, Dediú L, Victor C. Review of the current application of fingerprinting allowing detection of food adulteration and fraud in China. *Food Control*.2011;22:1126-35.
9. Bhemer MLA. Tecnologia do leite: produção, industrialização e análise. 13ª ed. São Paulo (SP):Nobel; 1999.
10. Brasil. Ministério da Agricultura. Instrução normativa nº 62 de 29 de dezembro de 2011. Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. Diário Oficial [da] União, Brasília, 29 dez. 2011.
11. Polegato EPS, Rudge AC. Estudo das características físico-químicas e microbiológicas dos leites produzidos por mini-usinas da região de Marília – São Paulo/ Brasil. *Rev Hig Aliment*.2003;17(110):56-63.
12. Agnese AP. Avaliação físico-química do leite cru comercializado informalmente no município de Seropédica, Rio de Janeiro. *Rev Hig Aliment*.2002;17(94):58-61.
13. Martins PF, Andrade HV. Identificação de resíduos de antibióticos na recepção de leite cru pré-beneficiado como perigo potencial para implantação do plano APPCC em laticínios. *Cad Pós-Grad FAZU*.2011; 2.
14. Martin JGP. Resíduos de antimicrobianos em leite – uma revisão. *Seg Alim Nutr*.2011;18(2):80-7.
15. Wanderley CH, Silva ACO, Silva FER, Mársico ET, Conte Junior CA. Avaliação da sensibilidade de métodos analíticos para verificar fraude em leite fluido. *Rev de Ci Vida*. 2013;33(1):54-63.
16. Mendes CG, Sakamoto SM, Silva JBA, Jácome CGM, Leite AI. Análises físico-químicas e pesquisa de fraude no leite informal comercializado no município de Mossoró, RN. *Ci Anim Bras*.2010;11(2):349-56.
17. Firmino FC, Talma SV, Martins ML, Leite MO, Martins ADO. Detecção de fraudes em leite cru dos tanques de expansão da região de Rio Pomba, Minas Gerais. *Rev Inst Latic Cândido Tostes*.2010;65(376)5-11.
18. Cavalcanti VR. Avaliação físico-química e microbiológica de leite cru recebido em tanques comunitários [dissertação de mestrado]. João Pessoa (PB): Universidade Federal da Paraíba; 2011.
19. Santos MV, Fonseca LFL. Estratégia para controle de mastite e melhoria da qualidade do leite. 2ª ed. Barueri (SP): Manole; 2007.
20. Guo M. Goat's milk. In: Caballero B, Trugo L, Finglas P. (Eds.), *Encyclopedia of Food Science and Nutrition*.2003;2944-9.
21. Tronco VM. Controle Físico-Químico do Leite. In: Manual para Inspeção da Qualidade do Leite. 1997. Santa Maria (RS): UFMS,103-5.
22. Rosa-Campos AA, Rocha JES, Borgo LA, Mendonça MA. Avaliação físico-química e pesquisa de fraude em leite pasteurizado integral tipo C produzido na região de Brasília, Distrito Federal. *Rev Inst Latic Cândido Tostes*.2011;66(379):30-4.
23. Venturini KS, Sarcinelli MF, Silva SC. Características do Leite. *Boletim Técnico, UFES*, 2007.
24. Silva MCD, Silva JVL, Ramos CS, Melo RO, Oliveira JO. Características microbiológicas e físico-química de leite pasteurizado destinado ao programa do leite no Estado de Alagoas. *Ciênc Tecnol Aliment*.2008;28(1):226-30.

25. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuárias e Abastecimento. Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002. Regulamentos Técnicos de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A, do Leite tipo B, do Leite tipo C, do Leite Pasteurizado e do Leite Cru Refrigerado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. Diário Oficial [da] União, Brasília, DF, 20 set. 2002.
26. Oliveira ENA, Santos DC. Avaliação da qualidade físico-química de leites pasteurizados. *Rev Inst Adolfo Lutz*.2012;71(1):193-7.
27. Behmer MLA. Tecnologia do leite: leite, queijo, manteiga, caseína, iogurte, sorvetes e instalações: produção, industrialização, análise. 15ª ed. São Paulo (SP): Nobel; 1987.
28. Pereira DBC, Silva PHF, Costa Júnior LCG, Oliveira LL. Físico-química do leite e derivados: métodos analíticos. 2ª ed. Juiz de Fora (MG): EPAMIG, 2001.
29. Sharma K, Paradakar M. The melamine adulteration scandal. *Food Security*.2010;2:97-107.
30. Dracz S. Desenvolvimento de um método imunoenzimático para análise de queijo em leite [tese de doutorado]. Viçosa (MG): Universidade Federal de Viçosa; 1996.
31. Carvalho BMA, Carvalho LM, Alcântara LAP, Bonomo RCF. Métodos de detecção de fraude em leite por adição de soro de queijo. *RedVet*.2007;8(6):1695-7504.
32. Oliveira DT, Camera L, Noskoski L. Adulteração em leite fluido – Revisão Bibliográfica. XVI Seminário. Interinstitucional de ensino, pesquisa e extensão. UNICRUZ, Cruz Alta (RS), 2011.
33. Recio I, Garcia-Risco MR, Ramos M, López-Fandin R. Characterization of peptides produced by the action of psychrotrophic proteinases on k-casein. *J Dairy Res*.2000;67:625-30.
34. Oliveira GBO. Detecção da Adição Fraudulenta de Soro de Queijo em leite: Interferência da Atividade de Proteases Bacterianas [dissertação de mestrado]. Seropédica (RJ): Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; 2009.
35. Fukuda SP, Roig SM, Prata LF. Correlation between acidic ninhydrin and HPLC methods to evaluate fraudulent addition of whey in milk. *Lait*.2004;84:501-12.
36. Bremer MCEG, Kemmers-Voncken AEM, Boers EAM, Frankhuizen R, Haasnoot W. Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of bovine rennet whey powder in milk powder and buttermilk powder. *Int Dairy J*.2008;18:294-302.
37. Montáñez CDA, Ramírez JR, Arango CJJ, Betancourt SDP. Detección de glucomacropéptido (GMP) como indicador de adulteración con suero de quesería en leche deshidratada. *Vet Méx*.2000;31(3):217-22.
38. Kang JH, Kondo F. Occurrence of false-positive results of inhibitor on milk samples using the Delvotest SP assay. *J Food Prot*.2001;64(8):1-5.
39. Tenório CGMSC, Cerqueira MMOP, Viegas RP, Resende MFS, Clinquart DL, Santos AKR, et al. Eficiência dos testes COPAN (Microplate e Single) na detecção de resíduos de antimicrobianos no leite. *Arq Bras Med Vet Zootec*.2009;61(2):504-10.
40. Costa AS, Lobato V. Avaliação da presença de resíduos de antimicrobianos em leite e bebida láctea UHT por teste de inibição microbiana comercial. *Rev Inst Latic Cândido Tostes*.2009;64:72-6.
41. Lawrence CA, Block SB. Disinfection, sterilization, and preservation. Lea of Febiger. Philadelphia, 1971.
42. Spreer E. *Lactologia Industrial*. 2ª ed. Zaragoza: Acribia, 1991.
43. Pelczar M, Reid R, Chan ECS. *Microbiologia*. v.2. São Paulo: McGraw-Hill do Brasil, 1981.
44. Paiva RMB. Avaliação físico-química e microbiológica de leite pasteurizado tipo c distribuído em programa social governamental [dissertação de mestrado]. Belo Horizonte (BH): Universidade Federal de Minas Gerais; 2007.
45. Silva JN, Sousa FC, Parente GDL, Silva LMM, Alves TTL. Avaliação da eficiência da pasteurização em leite tipo c através de parâmetros enzimáticos. *Rev Verde*.2011;6(3):6-9.
46. Veloso ACA, Teixeira N, Ferreira IMPLVO, Ferreira MA. Detection of adulterations in food products containing milk and/or milk proteins. *Quím Nova*.2002;25(4):609-15.
47. Dalmaso ACT, La Neve F, Bottero MT. Simultaneous detection of cow and buffalo milk in mozzarella cheese by Real-Time PCR assay. *Food Chem*.2011;124(1):362-6.
48. De S, Brahma B, Polley S, Mukherjee A, Banerjee D, Gohaina M, et al. Simplex and duplex PCR assays for species specific identification of cattle and buffalo milk and cheese. *Food Control*.2011;22:690-6.
49. Mafra I, Roxo A, Ferreira IMPLVO, Oliveira MBPP. A duplex polymerase chain reaction for the quantitative detection of cows' milk in goats' milk cheese. *Int Dairy J*.2007;17:1132-8.
50. López-Calleja Díaz I, Alonso IG, Fajardo V, Martín I, Hernández P, Lacarra TG, ET al. Application of a polymerase chain reaction to detect adulteration of ovine cheeses with caprine milk. *J Dairy Sci*.2007;225:345-9.
51. Chávez NA, Salinas E, Jauregui J, Palomares LA, Macas K. Detection of bovine milk adulterated with cheese whey by western blot immunoassay. *Food Agric Immun*.2008;19(4):265-72.
52. Molina E, Martin-Alvarez PJ, Ramos M. Analysis of cows' ewes' and goats' milk mixtures by capillary electrophoresis: Quantification by multivariate regression analysis. *Int Dairy J*.1999;9:99-105.
53. Bordin G, Cordeiro Raposo F, Calle BL, Rodriguez AR. Identification and quantification of major bovine milk proteins by liquid chromatography. *J Chromatogr*.2001;928:63-76.
54. Lockley AK, Bardsley RG. DNA-based methods for food authentication. *Int Dairy J*.2000;9:99-105.
55. Brasil. Ministério da Justiça. Lei nº 8.137 de 27 de dezembro de 1990 – Define crimes contra a ordem tributária, econômicas e contra as relações de consumo e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 28 dez. 1990. Sec. 1, pt. 176.

## Pesquisa de anticorpos *anti-Leptospira* spp. em grupos ocupacionais no Estado de Pernambuco

### Detection of antibodies to *Leptospira* spp. in serum samples from occupational groups in the State of Pernambuco

RIALA6/1612

Gesika Maria da SILVA<sup>1\*</sup>, Júnior Mário Baltazar de OLIVEIRA<sup>2</sup>, Adalberto Leite SILVA NETO<sup>3</sup>, Nivaldo Aparecido de ASSIS<sup>3</sup>, Luis Antonio MATHIAS<sup>3</sup>, Daniel Friguglietti BRANDESPIM<sup>2</sup>, José Wilton PINHEIRO JÚNIOR<sup>2</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, Universidade Federal Rural de Pernambuco. Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife, Brasil. CEP: 52171-900. Tel: (81) 3320-6103. E-mail: gesika.silva@yahoo.com.br

<sup>2</sup>Unidade Acadêmica de Garanhuns, Universidade Federal Rural de Pernambuco

<sup>3</sup>Laboratório de Diagnóstico de Brucelose e Leptospirose, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, Faculdade de Ciências Agrárias, UNESP Jaboticabal

Recebido: 13.08.2014 - Aceito para publicação: 22.09.2014

#### RESUMO

A prevalência de anticorpos anti-*Leptospira* spp. foi determinada em grupos ocupacionais do município de Garanhuns no Estado de Pernambuco, Brasil. Foram colhidas 154 amostras, e um questionário foi aplicado para a análise dos fatores de risco. O diagnóstico sorológico foi realizado utilizando-se a técnica de soroaglutinação microscópica (SAM). A prevalência de anticorpos anti-*Leptospira* spp. foi de 5,19 % (8/154; I.C. 2,27 % - 9,98 %); os participantes da zona urbana apresentaram prevalência de 5,68 % (5/88; I.C. 1,87 % - 12,76 %) e os da zona rural de 4,55 % (3/66; I.C. 0,95 % - 12,71 %). Os sorovares mais frequentes foram Grippotyphosa (12,5 %) na área rural, na área urbana Autumnalis (12,5 %), enquanto Wolffi (25 %) e Australis (50 %) foram verificados na área rural e na urbana. Na análise de fatores de risco não foi observada associação entre as variáveis estudadas e a reatividade na sorologia. Este foi o primeiro estudo a relatar a presença de anticorpos anti-*Leptospira* spp. em trabalhadores urbanos e rurais do município de Garanhuns. Este achado alerta para a atenção e realização de pesquisas em áreas de baixa prevalência ou silenciosas para leptospirose, pois desta forma medidas de controle e prevenção poderão ser implementadas.

**Palavras-chave.** epidemiologia, leptospirose, saúde pública.

#### ABSTRACT

This study aimed at determining the prevalence of anti-*Leptospira* spp. antibodies in occupational groups in the municipality of Garanhuns - State of Pernambuco, Brazil. One hundred fifty-five samples were collected, and a questionnaire for analyzing risk factors was applied. The serological diagnosis was performed by using Microscopic Agglutination Test (MAT). The prevalence of anti-*Leptospira* spp. was 5.19 % (8/154, CI 2.27 % - 9.98 %). Among the participants from urban areas the prevalence was 5.68 % (5/88, CI 1.87 % - 12.76 %), and 4.55 % in rural areas (3/66, CI 0.95 % - 12.71 %). The most common serotypes were Grippotyphosa (12.5 %) in rural areas, and in the urban area was Autumnalis (12.5 %); Wolffi (25 %) and Australis (50 %) were observed both in rural and urban areas. In analyzing the risk factors, no association was observed between variables and serology reactivity. This study has been the first report on the detection of anti-*Leptospira* spp. antibodies in urban and rural workers of the municipality of Garanhuns. This finding points out the care and the performance of studies in areas of low or silent prevalence for leptospirosis, for implementing prevention and control measures.

**Keywords.** epidemiology, leptospirosis, public health.

## INTRODUÇÃO

A leptospirose é uma antropozoonose, causada por bactérias do gênero *Leptospira* que pode provocar uma doença infecciosa febril de início abrupto, apresentando um amplo espectro de manifestação da doença, de infecções inaparentes à evolução para quadros clínicos de alta gravidade que podem levar à morte<sup>1</sup>.

O gênero *Leptospira* possui 14 espécies patogênicas e mais de 260 sorovares já foram identificados<sup>2</sup>. As diferentes espécies de roedores podem ser reservatórios de sorovares distintos<sup>3</sup>. Os homens são hospedeiros acidentais, infectam-se de maneira direta quando entram em contato com urina do reservatório contaminada, ou indiretamente por meio do contato com água, solo lamacento ou alimentos contaminados<sup>4</sup>.

Estudos de prevalência são realizados para investigação da infecção em diferentes partes do mundo, como o realizado no nordeste do Irã, com uma prevalência de anticorpos anti-*Leptospira* de 15,79 % (45/285), para os sorovares Icterohaemorrhagiae, Hardjo, Grippotyphosa, Pomona, Canicola e Ballum<sup>5</sup>. No estado de Veracruz, no México, foi observada uma prevalência de anticorpos anti-*Leptospira* de 6,4 % (11/171)<sup>6</sup>. Na cidade de Pereira, na Colômbia, foi detectada uma prevalência de 25 % (5/20) em funcionários de um zoológico e os sorovares mais frequentes foram Bataviae, Grippotyphosa, Hurstbridge<sup>7</sup>.

No Brasil, alguns estudos sorológicos foram realizados para determinar a prevalência da infecção por *Leptospira* spp. em humanos e observou-se uma variação de 1,3 % a 25 %<sup>8-14</sup>.

Em relação aos fatores de risco, estudo aponta que êxodo rural e a ocupação desordenada das cidades, principalmente em lugares próximos a córregos e riachos, além da falta de organização das redes de saneamento básico, aliados à grande aglomeração populacional de baixa renda e infestações por roedores favoreceram o aumento na incidência de casos de leptospirose no meio urbano e peri-urbano<sup>15</sup>.

Considerando a importância e o risco ocupacional relacionado a essa enfermidade, objetivou-se com este estudo determinar a soroprevalência e fatores de risco associados à infecção por *Leptospira* spp. em profissionais responsáveis pela limpeza urbana, catadores de material reciclável e trabalhadores rurais do município de Garanhuns, Estado de Pernambuco, Brasil.

## MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi submetido à apreciação e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade de Pernambuco (PROPEGE/UPE) por meio da Plataforma Brasil, com número CAAE 03798812.3.0000.5207, com o parecer número 79157.

Para realização deste estudo, utilizou-se uma análise epidemiológica transversal com profissionais que atuavam no município de Garanhuns/PE, localizado no Planalto da Borborema, a 230 Km da capital do Estado, Recife. Para determinar o tamanho da amostra utilizou-se uma prevalência esperada para infecção por *Leptospira* spp. de 10,4 %<sup>9</sup>, o que determinou um tamanho mínimo de 110 indivíduos, considerando o nível de confiança de 95 % e erro estatístico de 5 %<sup>16</sup>. Como margem de segurança, foram colhidas 154 amostras de profissionais que atuam na zona urbana e rural, sendo 95 do sexo masculino e 59 do sexo feminino, nos meses de agosto e setembro de 2012. Na zona urbana, foram selecionadas uma empresa terceirizada de limpeza urbana (n = 80) e uma associação de catadores de material para reciclagem (n = 8). Na zona rural, foram amostrados 66 trabalhadores rurais cadastrados no Posto de Saúde da Família (PSF) localizado no distrito de São Pedro, pertencente ao município de Garanhuns.

Não houve critérios de inclusão ou exclusão, os voluntários foram convidados a participar da pesquisa com antecedência, por demanda espontânea e nos dias agendados foram obtidas as amostras. Antes da colheita das amostras, foi esclarecido sobre os objetivos da pesquisa e, os que concordaram em participar assinaram e receberam uma via do TCLE – Termo de Consentimento Livre Esclarecido, conforme Resolução nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde<sup>17</sup>. Foi aplicado um questionário com questões objetivas que incluía informações demográficas (sexo, idade, endereço, ocupação e tempo exercendo essa atividade) e perguntas relacionadas aos fatores de risco para a ocorrência da infecção (presença de roedores em casa ou no trabalho, destino do lixo, acúmulo de lixo próximo a casa). Foram colhidas amostras com aproximadamente 10 mL de sangue, com seringa e agulha descartáveis. Os tubos identificados posteriormente foram centrifugados a 5000 rpm por 10 minutos, e as alíquotas de soro em microtubos de polipropileno foram armazenadas a -20° C na Central de Laboratórios de Garanhuns da Unidade Acadêmica de



Garanhuns - CENLAG, até a realização da sorologia.

Para o diagnóstico sorológico empregou-se a técnica de Soroaglutinação Microscópica (SAM)<sup>18</sup>, na qual utilizaram-se como antígenos 24 sorovares de *Leptospira interrogans* vivas cultivadas em meio EMJH (Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris), livres de contaminação e auto-aglutinação, sendo eles: Andamana, Australis, Autumnalis, Bataviae, Bratislava, Butembo, Canicola, Castellonis, Copenhageni, Cynopteri, Hardjo, Hebdomadis, Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae, Javanica, Panama, Pomona, Patoc, Pyrogenes, Sentot, Shermani, Tarassovi, Whitcombi e Wolffi<sup>19</sup>. Foram considerados positivos os soros que apresentaram aglutinação de pelo menos 50 % das *Leptospiras* no campo microscópico a partir da diluição 1:100<sup>14</sup>. Os reagentes na triagem (1:50) foram submetidos a diluições seriadas a partir de 1:100, sendo considerado o maior título o último em que ainda foi observada aglutinação em mais de 50 % do campo escuro.

Realizou-se a análise estatística descritiva para cálculos das frequências relativa e absoluta dos resultados obtidos no teste sorológico. Para identificar a associação

entre as variáveis epidemiológicas e o resultado do exame sorológico, aplicou-se análise univariada das variáveis de interesse pelo teste Exato de Fisher e foram submetidas a uma análise multivariada pelo modelo regressão logística. Para análise dos dados utilizou-se o *software* Epi Info, versão 7.1.1.0 - *Centers for Disease Control and Prevention (CDC)*.

## RESULTADOS

A prevalência geral de anticorpos anti-*Leptospira* spp. foi de 5,19 % (8/154; I.C. 2,27 % - 9,98 %), na área urbana a prevalência foi de 5,68 % (5/88; I.C. 1,87 % - 12,76 %) e na área rural foi de 4,55 % (3/66; I.C. 0,95 % - 12,71 %).

Observou-se que a prevalência em relação ao sexo foi de 6,17 % (5/81) em trabalhadores do sexo masculino na área urbana e 14,29 % (2/14) na área rural. Para o sexo feminino observou-se prevalência de 1,82 % (1/52) na área rural e nenhum reagente na área urbana.

A frequência dos sorovares para *Leptospira* spp. e a distribuição por área urbana e rural estão descritas na Tabela 1.

**Tabela 1.** Distribuição da frequência dos sorovares das amostras reagentes dos trabalhadores urbanos e rurais do município de Garanhuns, Pernambuco

Sorovar	Titulação					
	100		200		400	
	Urbana	Rural	Urbana	Rural	Urbana	Rural
Australis	2	1	-	-	1	-
Autumnalis	1	-	-	-	-	-
Grippotyphosa	-	-	-	1	-	-
Wolffi	-	1	1	-	-	-
<b>Total</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>-</b>

A análise de associação entre as variáveis epidemiológicas e a sorologia para pesquisa de anticorpos anti-*Leptospira* spp. dos participantes da zona urbana encontra-se disposta na Tabela 2. Na área rural não foi identificada associação entre as variáveis analisadas:

acúmulo de lixo próximo a casa (p=1,000) e depósito de armazenamento de grãos (0,457).

Na regressão logística não foi identificada associação entre as variáveis analisadas para as áreas urbana e rural e infecção por *Leptospira* spp.

**Tabela 2.** Análise dos fatores de risco associados à infecção por *Leptospira* spp. em profissionais responsáveis pela limpeza urbana, coleta de material para reciclagem do município de Garanhuns do Estado de Pernambuco, Brasil

VARIÁVEL	N	SOROLOGIA	ANÁLISE	
			UNIVARIADA	P
		Reagente	OR (I.C. 95 %)	
<b>Tempo da ocupação</b>				
Menos que 5 anos	60	4 (6,6 %)	1,92 (0,20 - 18,09)	1,0000
Mais que 5 anos	28	1 (3,5 %)		
<b>Qual o horário de trabalho?</b>				
Diurno	61	2 (3,2 %)	-	0,0233*
Noturno	7	2 (28,5 %)	11,80 (1,35 - 102,54)	
Ambos	20	1 (5,0 %)	1,55 (0,13 - 18,09)	
<b>Trabalha em terrenos baldios?<sup>1</sup></b>				
Sim	62	2 (3,2 %)	0,23 (0,03 - 1,49)	0,1300
Não	24	3 (12,5 %)		
<b>Trabalha em áreas de esgoto a céu aberto?<sup>1</sup></b>				
Sim	67	3 (4,4 %)	0,32 (0,05 - 2,15)	0,2449
Não	16	2 (12,5 %)		
<b>Trabalha em lugares como valas, galerias e esgotos?<sup>1</sup></b>				
Sim	38	1 (2,6 %)	0,29 (0,03 - 2,77)	0,3776
Não	48	4 (8,3 %)		
<b>Observa roedor no local de trabalho?<sup>2</sup></b>				
Sim	66	2 (3,0 %)	0,18 (0,03 - 1,21)	0,0884
Não	21	3 (14,2 %)		
<b>Utiliza proteção no trabalho?<sup>3</sup></b>				
Sim	75	4 (5,3 %)	0,50 (0,50 - 5,04)	0,4738
Não	10	1 (10,0 %)		
<b>Participou de treinamento para iniciar no trabalho?<sup>2</sup></b>				
Sim	21	1 (4,76 %)	0,77 (0,08 - 7,34)	1,0000
Não	66	4 (6,06 %)		
<b>Qual a fonte de fornecimento de água na residência?</b>				
Água encanada	81	3 (3,7 %)	0,09 (0,01 - 0,71)	0,0487*
Outras	7	2 (28,57 %)		
<b>A casa alaga quando chove?</b>				
Sim	8	1 (12,5 %)	2,71 (0,26 - 27,73)	0,3863
Não	80	4 (5,0 %)		

N - Total de amostras; OR - *Odds Ratio* (Razão de Chance); IC - Intervalo de Confiança; \* Associação significativa (P<0,05); <sup>1</sup> Base utilizada (86); <sup>2</sup> Base utilizada (87); <sup>3</sup> Base utilizada (85)

## DISCUSSÃO

A baixa prevalência encontrada neste estudo confere com os dados registrados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), no qual onde se constatou a ocorrência de três casos de leptospirose no município de Garanhuns/PE, no período de 2007 a 2012.

Ao analisar os sorovares, observou-se neste estudo a ocorrência de Australis, Autumnalis, Grippotyphosa e Wolffi. De modo semelhante, outros autores também relataram os sorovares Autumnalis<sup>12</sup>, Australis<sup>9</sup>, Grippotyphosa<sup>5,7</sup> e Wolffi<sup>10</sup> como os mais prevalentes.

O sorovar mais prevalente neste estudo foi Australis. Este sorovar é relatado na literatura como responsável pela infecção em ovinos<sup>20,21</sup>, sendo estes uma possível fonte de infecção para os reagentes nesta pesquisa, visto que é comum na periferia da cidade a criação de animais de produção. O sorovar Autumnalis é descrito em estudos de prevalência em cães<sup>22,23</sup>, bovinos<sup>24</sup> e ovinos<sup>20,21,25</sup>. Enquanto que sorovar Grippotyphosa é comumente associado a marsupiais<sup>26,27</sup>. Observou-se neste estudo que o reagente afirmou ter contato com cães e residia em um bairro na periferia.

Estes dois sorovares, Australis e Autumnalis, foram identificados em dois casos de leptospirose aguda humana no município de Pelotas (RS)<sup>28</sup>, o que demonstra a importância de conhecer os sorovares presentes nas diferentes áreas, pois, a depender do sorovar identificado na região de estudo, medidas de controle e prevenção deverão ser específicas, observando as particularidades da cadeia de transmissão deste agente.

Em relação ao sorovar Wolffi identificado neste estudo, observou-se que um dos reagentes possuía o hábito de tomar banho em locais com água parada (açudes) e com acesso a animais de produção, o que provavelmente proporcionou o contato com o sorovar encontrado, visto que este é relatado principalmente em bovinos, considerados hospedeiros de manutenção<sup>29</sup>.

De acordo com Waitkins<sup>4</sup>, os animais domésticos podem servir como hospedeiros de manutenção da *Leptospira* spp. adaptadas a suas espécies, como, por exemplo, o cão infectado com o sorovar Canicola. Existem adaptações de determinados sorovares a certas espécies de animais, que se comportam como portadores adaptados que mantêm a bactéria e contribuem para a

manutenção do agente em um determinado lugar, mas a associação não é absoluta e a especificidade dessa manutenção não é conhecida<sup>2</sup>.

Ao observar a análise de associação entre as variáveis analisadas e a sorologia não foi identificado nenhum fator de risco. Entretanto, observou-se maior prevalência em indivíduos do sexo masculino, que foi maior na zona rural, pode estar relacionada ao risco ocupacional, já que geralmente as atividades de limpeza urbana são realizadas principalmente por homens. E na zona rural onde residiam os participantes deste estudo, foi observado que a atividade econômica predominante é o cultivo de grãos e o armazenamento destes alimentos pode favorecer a infestação de roedores. Outros estudos de casos com leptospirose também indicam uma maior ocorrência da infecção em pacientes do sexo masculino<sup>15,30-34</sup>.

Em relação ao fornecimento de água, observou-se maior prevalência nos trabalhadores que não possuíam em suas residências água encanada, observando associação significativa na análise univariada ( $p=0,048$ ). Constatou-se maior prevalência em trabalhadores que residiam em casas que alagavam durante as chuvas (12,5 %). Essas duas variáveis estão diretamente relacionadas com a epidemiologia da doença, visto que a água quando não tratada pode veicular diversos patógenos para o homem, inclusive a *Leptospira* spp., e que a leptospirose está diretamente relacionada com o contato com água contaminada com urina dos roedores e de animais infectados durante as enchentes. De acordo com Waitkins<sup>4</sup>, os homens são hospedeiros acidentais, e tanto o homem, quanto os animais infectam-se de forma direta quando entram em contato com urina do reservatório contaminada, ou indireta por meio do contato com água, solo lamacento ou alimentos contaminados.

Não foi possível identificar neste estudo associação entre as variáveis: presença de roedor, trabalho em áreas de esgoto a céu aberto, valas, galerias e esgotos. Segundo Adler e Moctezuma<sup>2</sup>, a associação com o risco ocupacional é relatada principalmente nos países com atividades de agricultura e pecuária e o risco de infecção mediada por roedores infectados nos países tropicais, onde muitos sorovares podem estar presentes. Nas áreas urbanas, os profissionais mais expostos ao risco de infecção são os limpadores de caixas de água, fossas e valas<sup>34</sup>, enquanto na área rural os que lidam com o gado, como, por exemplo, vaqueiros, veterinários,

trabalhadores de matadouro, estão mais expostos ao risco de infecção<sup>4</sup>.

Nos países em desenvolvimento, onde a leptospirose ocorre de maneira endêmica e epidêmica, os fatores de risco não estão relacionados apenas ao risco ocupacional ou lazer, mas para a população como um todo. Já nos países onde ocorre aumento da população de forma desordenada com crescente densidade demográfica, o homem é responsável por modificar a área urbana e favorecer a ocorrência das formas endêmicas e epidêmicas da leptospirose<sup>35</sup>.

Alguns fatores como mudanças climáticas, resultante da atividade humana e práticas de construção (como pavimentação, por exemplo) podem favorecer a ocorrência de inundações, o que facilita a dispersão de micro-organismos infecciosos a partir do solo ou de esgotos para as águas superficiais<sup>36</sup>. As condições ambientais favorecem a transmissão do agente, possibilitando modificações da biologia da população, comportamento ou ecologia de espiroquetas e seus hospedeiros no local<sup>27</sup>.

No Brasil, alguns fatores como êxodo rural e a ocupação desordenada das cidades, principalmente em lugares próximos a córregos e riachos, além da falta de organização das redes de saneamento básico, aliados a grande aglomeração populacional de baixa renda e infestações de roedores propiciam o aumento de casos no meio urbano e periurbano<sup>15</sup>.

Para controlar e prevenir esta enfermidade é necessário que se adotem medidas como educação em saúde, saneamento ambiental, adoção de medidas higiênico-sanitárias e tratamento precoce dos casos detectados, visto que não é possível realizar a eliminação do principal reservatório desse agente<sup>37</sup>.

## CONCLUSÃO

Este foi o primeiro estudo a relatar a presença de anticorpos anti-*Leptospira* spp. em trabalhadores urbanos e rurais do município de Garanhuns, Pernambuco. Apesar de não terem sido identificados fatores de risco associados à infecção, os resultados deste estudo alertam para a atenção e realização de pesquisas em áreas de baixa prevalência ou até mesmo áreas silenciosas para leptospirose, pois desta forma medidas de controle e prevenção poderão ser implementadas com o intuito de garantir a saúde da população exposta.

## AGRADECIMENTO

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco – FACEPE, pela concessão da bolsa.

## REFERÊNCIAS

1. Horsch F. Leptospirese. *In*: Beer J. Doenças infecciosas em animais domésticos. São Paulo: Roca; 1988. p.305-24.
2. Adler B, Moctezuma ALP. *Leptospira* and leptospirosis. *Vet Microbiol*. 2010;140:287-96.
3. Levett PN. Leptospirosis. *Clin Microbiol Rev*. 2001;14(2):296-326.
4. Waitkins SA. Leptospirosis as an occupational disease. *Br J Ind Med*. 1986;43:721-5.
5. Sakhaee E, Pour GRA. Detection of leptospiral antibodies by microscopic agglutination test in north-east of Iran. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2011;1(3):227-9.
6. Sergio ADM, Figueroa EG, Saadia VGM, Elizabeth SH, Beatriz RS, Victor MAA, et al. Leptospirosis prevalence in patients with initial diagnosis of dengue. *J Trop Med*. 2012;1-5.
7. Romero MH, Astudillo M, Sánchez JÁ, González LM, Varela N. Anticuerpos contra *Leptospira* sp. en primates neotropicales y trabajadores de un zoológico colombiano. *Rev. Salud Publica*. 2011;13(5):814-23.
8. Pereira MM, Andrade J. Human leptospirosis in a slum area in the city of Rio de Janeiro, Brazil – A serological and epidemiological study. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1990;85 (1): 47-52.
9. Almeida LP, Martins LFS, Brod CS, Germano PML. Levantamento soroepidemiológico de leptospirose em trabalhadores do serviço de saneamento ambiental em localidade urbana na região Sul do Brasil. *Rev Saude Publica*. 1994;1(28):76-81.
10. Gonçalves DD, Teles PS, Reis CR, Lopes FMR, Freira RL, Navarro IT, et al. Seroepidemiology and occupational and environmental variables for leptospirosis, brucellosis and toxoplasmosis in slaughterhouse workers in the Paraná state, Brazil. *Rev Inst Med Trop*. 2006;48 (2):135-40.
11. Aguiar DM, Cavalcante GT, Camargo LMA, Labruna MB, Vasconcellos AS, Souza GO, et al. Anti-*Leptospira* spp. and anti-*Brucella* spp. antibodies in humans from rural area of Monte Negro municipality, state of Rondônia, Brazilian western Amazon. *Braz J Microbiol*. 2007;38:93-6.
12. Langoni H, Souza LC, Silva AV, Cunha ELP, Silva RC. Epidemiological aspects in leptospirosis. Research of anti-*Leptospira* spp. antibodies, isolation and biomolecular research in bovines, rodents and workers in rural properties from Botucatu, SP, Brazil. *Braz J Vet Res Anim Sci*. 2008;45(3):190-9.
13. Langoni, H, Hage SSE, Peruca LCB, Lucheis SB, Deffune E. Aglutininas anti-*Leptospiras* em doadores de sangue. *Vet Zoot*. 2010;17(1):79-84.
14. Gonçalves DD, Benitez A, Lopes-Mori FMR, Alves LA, Freire RL, Navarro IT, et al. Zoonoses in humans from small rural properties in Jataizinho, Parana, Brazil. *Braz J Microbiol*. 2013;44(1):125-31.

15. Vasconcelos CH, Fonseca FR, Lise MLZ, Arsky MLNS. Fatores ambientais e socioeconômicos relacionados à distribuição de casos de leptospirose no Estado de Pernambuco, Brasil, 2001-2009. *Cad Saude Colet*. 2012;20(1):49-56.
16. Thrusfield, M. *Epidemiologia Veterinária*. 2ª ed. São Paulo: Roca; 2004. p.556.
17. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução CNS nº 466, de 12 de dezembro de 2012. Incorpora, sob a ótica do indivíduo e das coletividades, referenciais da bioética, tais como, autonomia, não maleficência, beneficência, justiça e equidade, dentre outros, e visa a assegurar os direitos e deveres que dizem respeito aos participantes da pesquisa, à comunidade científica e ao Estado. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 13 ago. 2013. Seção 1, p.59. Disponível em: [http://conselho.saude.gov.br/resolucoes/2012/Reso466.pdf]. Acesso em: 17 Nov 2013.
18. Ministério da Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica. Série A. Normas e Manuais Técnicos. 7ª ed. Brasília: Ministério da saúde; 2009.
19. Brasil. Fundação Nacional de Saúde. Manual de leptospirose. 2ª ed. Brasília: Ministério da Saúde; 1995.
20. Aguiar DM, Cavalcante GT, Vasconcelos AS, Souza GO, Labruna MB, Camargo LMA, et al. Anticorpos anti-*Leptospira* spp. em ovinos do município de Monte Negro, Estado de Rondônia. *Arq Inst Biol*. 2010;77 (3):529-32.
21. Salaberry SRS, Castro V, Nassar AFC, Castro JR, Guimarães EC, Lima-Ribeiro MC. Seroprevalence and risk factors of antibodies against *Leptospira* spp. in ovinos from Uberlândia municipality, Minas Gerais State, Brazil. *Braz J Microbiol*. 2011;42:1427-33.
22. Aguiar DM, Cavalcante GT, Marvulo MFV, Silva JCR, Pinter A, Vasconcelos AS, et al. Fatores de risco associados à ocorrência de anticorpos anti-*Leptospira* spp. em cães do município de Monte Negro, Rondônia, Amazônia Ocidental Brasileira. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2007; 59(1):70-6.
23. Batista CSA, Alves CJ, Azevedo SS, Vasconcelos AS, Morais ZM, Clementino IJ, et al. Soroprevalência e fatores de risco para a leptospirose em cães de Campina Grande, Paraíba. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2005;57:179-85.
24. Ratnam S, Sundararaj T, Subramanian S. Serological evidence of leptospirosis in a human population following an outbreak of the disease in cattle. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1983;77(1):94-8.
25. Silva EF, Brod CS, Cerqueira GM, Bourscheidt D, Seyffert N, Queiroz A, et al. Isolation of *Leptospira noguchii* from sheep. *Vet Microbiol* 2007;121:144-9.
26. Faine S, Adler B, Bolin C, Perolat P. *Leptospira* and leptospirosis. CRC Press, 2th. ed. MedSci, Melbourne, 1999.
27. Bharti AR. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *The Lancet*. 2003; 3:757-71.
28. Silva EF, Cerqueira GM, Seyffert N, Seixas FK, Hartwig, Athanazio DA, et al. *Leptospira noguchii* and human and animal Leptospirosis, Southern Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2009;15(4):621-3.
29. Langoni H, Meireles LR, Gotschalk S, Cabral KG, Silva AV. Perfil sorológico da leptospirose bovina em regiões do Estado de São Paulo. *Arq Inst Biol* 2000; 67; (1): 37- 41.
30. Andrade J, Brandão, AP. Contribuição ao conhecimento da epidemiologia da Leptospirose humana, com especial referência ao Grande Rio, Brasil, no período de 1970 a 1982. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1987;82 (1): 91-100.
31. Costa E, Costa YA, Lopes AA, Sacramento E, Bina JC. Formas graves de leptospirose: aspectos clínicos, demográficos e ambientais. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2001;34(3):261-7.
32. Figueiredo CM, Mourão AC, Oliveira MAA, Alves WR, Ooteman MC, Chamone, et al. Leptospirose humana no município de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil: uma abordagem geográfica. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2001;34(4):331-8.
33. Soares TSM, Oliveira Latorre MRD, Laporta GZ, Buzzar MR. Análise espacial e sazonal da leptospirose no município de São Paulo, SP, 1998 a 2006. *Rev Saude Publica*. 2010;44 (2):283-91.
34. Jesus M S, Silva LA, Lima K M S, Fernandes OCC. Cases distribution of leptospirosis in city of Manaus, state of Amazonas, Brazil, 2000-2010. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2012;45(6):713-6.
35. Ávila-Pires FD. Leptospirose e enchentes: uma falsa correlação? *Rev Patol Trop*. 2006;35(3):199-204.
36. Plank R, Dean D. Overview of the epidemiology, microbiology, and pathogenesis of *Leptospira* spp. in humans. *Microbes Infect*. 2000;2:1265-76.
37. Oliveira DSC, Guimarães MJB, Medeiros Z. Modelo produtivo para leptospirose. *Rev Patol Trop*. 2009;38(1):17-26.

## Avaliação das informações referentes à presença ou não de glúten em alguns alimentos industrializados

### Evaluation of the information regarding to the presence or absence of gluten in some processed foods

RIALA6/1613

Christina Maria Queiroz de Jesus MORAIS<sup>1</sup>, Bruna Kely Barbosa GODOI<sup>2</sup>, Robson Alves LUIZ<sup>1</sup>, Juliana Machado dos SANTOS<sup>1</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Laboratório de Alimentos, Núcleo de Alimentos, Microscopia e Métodos Rápidos, Departamento de Química, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Av. Brasil, 4365, CEP 21040-900, Rio de Janeiro, RJ. E-mail: christina.morais@incqs.fiocruz.br

<sup>2</sup>Colégio Redes de Desenvolvimento da Maré

Recebido: 24.09.2013 - Aceito para publicação: 25.08.2014

#### RESUMO

A doença celíaca (DC) é uma doença autoimune causada pela intolerância permanente ao glúten e provoca lesões na mucosa do intestino delgado, que reduzem a absorção dos nutrientes essenciais para o bom funcionamento do organismo. O único tratamento da doença celíaca é a retirada total do glúten da dieta dos pacientes. O objetivo deste trabalho foi avaliar a veracidade dos rótulos dos alimentos processados por meio de teste imunoenzimático (ELISA). A contaminação por glúten foi analisada em seis produtos rotulados como “não contém glúten” (NCG) e cinco rotulados como “contém glúten” (CG). Dos seis alimentos rotulados NCG, um apresentou resultado discordante com os dizeres do rótulo; e este fato pode levar o celíaco à recorrência dos sintomas por consumir esse produto inadvertidamente. Quanto ao 2º grupo de produtos, apenas uma das cinco amostras apresentou o rótulo correto. Estes dados demonstram que é necessário efetuar a implementação de ações corretivas por parte da Vigilância Sanitária para que os portadores da DC tenham acesso à alimentação segura, variada e, principalmente, que possam confiar nos dizeres contidos nos rótulos das embalagens dos alimentos.

**Palavras-chave.** análise de alimentos, alimentos para fins especiais, legislação, contaminação de alimentos.

#### ABSTRACT

Celiac disease (CD) is an autoimmune disease, caused by the permanent intolerance to gluten and it induces a damage to the lining of the small intestine, which produces a reduction in the absorption of essential nutrients for the proper functioning of the organism. The treatment for celiac disease is the complete withdrawal of gluten from the diet of patients. The present study evaluated the veracity of labels of the processed foods through enzyme immunoassay (ELISA). The analysis of gluten contamination was performed in six products labeled as “gluten-free product” (GFP) and five products labeled as “gluten-containing product” (GCP). One of six foods labeled as GFP showed discordant results when compared with the respective label wordings. This event might lead to the recurrence of CD symptoms by the patients who consume this product inadvertently. As to the second food group, only one of five samples had the correct label. These findings evidence that the implementation of corrective actions by the Health Surveillance is in urgent need for the CD carriers patients to give a guarantee on having access to a safe and varied diet, and mainly to the trusty wordings in labels on the food packages.

**Keywords.** analysis of foods, food for special purposes, legislation, food contamination.

## INTRODUÇÃO

A doença celíaca (DC), ainda desconhecida pela grande maioria da população, se caracteriza pela intolerância ao glúten, uma proteína presente em cereais como o trigo, o centeio, a cevada, a aveia e seus derivados, como farinha (a de trigo é a mais rica neste composto), massas, pizzas, bolos, pães, biscoitos, cerveja, uísque, vodca e alguns doces, que provoca dificuldade do organismo de absorver os nutrientes dos alimentos, vitaminas, sais minerais e água<sup>1</sup>.

O glúten é composto por dois grupos de proteínas: as gliadinas e as gluteninas. As primeiras são prolaminas responsáveis pela extensibilidade do alimento, mas que são nocivas para indivíduos que sofrem intolerância ao glúten.

Entende-se por DC uma intolerância permanente ao glúten, cuja forma clássica da doença inicia-se nos primeiros anos de vida, com diarreia crônica, vômitos, irritabilidade, anorexia, déficit de crescimento, distensão abdominal, diminuição do tecido celular subcutâneo e atrofia da musculatura glútea<sup>2</sup>. O tratamento consiste na exclusão total do glúten da dieta, sendo, portanto necessário que as indústrias analisem seus produtos quanto à presença ou não desse componente, de forma que a rotulagem apresente a veracidade sobre sua composição e permita uma maior variedade de alimentos para os celíacos<sup>3</sup>. Estes alimentos devem passar por uma análise de detecção e quantificação de glúten, realizada por laboratórios credenciados para este fim, e que sejam verificados se são adequados para celíacos e não representam um risco para a saúde.

Uma das bases do Código de Defesa do Consumidor<sup>4</sup> é o direito à informação. Tais informações destinam-se a identificar a origem, a composição e as características nutricionais dos produtos, permitindo o rastreamento dos mesmos, e constituindo-se, portanto, em elemento fundamental para a saúde pública<sup>5</sup>.

A Lei nº 10.674, de 16 de maio de 2003<sup>6</sup>, obrigou os fornecedores de alimentos industrializados a apresentarem, em seus rótulos e embalagens, a expressão “contém glúten” (CG) ou “não contém glúten” (NCG). Essa lei, porém, não exige a comprovação laboratorial quanto à eventual presença de glúten<sup>7</sup>. Segundo a comissão do *Codex Alimentarius* da Organização Mundial de Saúde e Organização de Alimento e Agricultura (WHO/FAO), a quantidade máxima permitida para os alimentos serem considerados isentos ou “livres” de glúten, é de 20 mg de

glúten/kg de alimento; podendo este alimento ter sido produzido sem a adição de trigo, centeio, cevada e aveia ou ter sido especialmente tratado para reduzir o teor de glúten a quantidades inferiores a 20 mg.kg<sup>-1</sup> de alimento<sup>8</sup>.

O objetivo deste trabalho foi quantificar os teores de glúten em 11 alimentos industrializados e verificar se a rotulagem referente à presença ou não de glúten está correta com vistas à avaliação da disponibilidade de alimentos para fins especiais com qualidade, assegurando o direito humano à alimentação adequada<sup>9</sup>, incluindo-se grupos populacionais específicos como os celíacos.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Amostras

Os alimentos foram adquiridos em supermercados varejistas da cidade do Rio de Janeiro seguindo como critério de escolha: o uso rotineiro na dieta e produtos de interesse para os celíacos. Os produtos rotulados com “não contém glúten” foram batata frita ondulada, polvilho doce, creme de arroz, fécula de batata, farofa de soja e fubá de milho. Os produtos rotulados com “contém glúten” foram farinha de milho fina, sopa de cebola, farinha de milho temperada, fubá e farinha de milho flocada.

### Método ELISA

A técnica utilizada para a detecção da gliadina nas amostras foi o teste ELISA através do kit RIDASCREEN® Gliadin (R-Biopharm AG)<sup>10</sup>, método validado e certificado pela AOAC<sup>11</sup> (Association of Official Analytical Chemists) sob a licença nº 120601 e método oficial do *Codex Alimentarius*. O limite de detecção do kit é de 1,5 ng de gliadina.mL<sup>-1</sup> ou 3,0 ng de glúten.mL<sup>-1</sup>. As análises foram realizadas conforme as instruções do fabricante do kit. O teste baseia-se na reação antígeno-anticorpo. Conjugado enzima ligada converte o cromógeno incolor num produto azul. A adição do reagente de parada conduz a uma mudança de cor de azul para amarelo. A medição é feita por espectrofotometria a 450 nm.

A concentração de gliadina, em µg.kg<sup>-1</sup>, é determinada por meio da equação obtida a partir de uma curva de calibração. Os padrões e amostras foram analisados em triplicata e as concentrações de glúten das amostras foram determinadas por interpolação da média das absorvâncias obtidas através da curva padrão pré-estabelecida com os padrões de gliadina do kit.

### Identificação de amido pela técnica de microscopia

O teste é baseado na identificação dos amidos característicos do produto após a análise do alimento preparado sob lâmina e lamínula em microscópio óptico utilizando a solução de lugol como meio de montagem<sup>12</sup>.

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1, observa-se que dentre os seis alimentos rotulados “não contém glúten”, a fécula de batata apresentou concentração de glúten acima da quantidade máxima permitida, podendo levar os celíacos ao retorno da sintomatologia da DC, involuntariamente. Nesse caso, o fabricante deverá rever o processo de

fabricação (manuseio, transporte e estocagem) para detectar a contaminação por glúten<sup>13</sup>. Este é um fato preocupante devido à escassez de produtos próprios, o elevado valor de mercado desses alimentos e a própria restrição alimentar gerada pelo tratamento da população celíaca<sup>14,15</sup>, que segundo a Carta de Fortaleza<sup>16</sup> redigida no IV Congresso Nacional de Doença Celíaca (FENACELBRA), estima-se que 1 % a 3 % da população brasileira seja acometida pela DC.

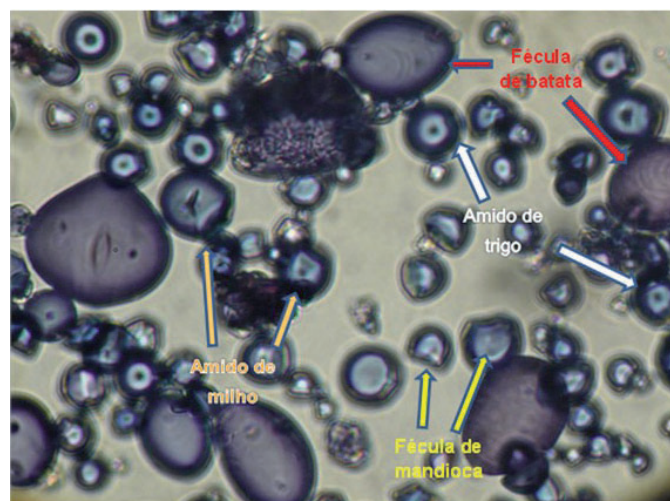
Para a confirmação desse resultado, a amostra de fécula de batata foi analisada em microscópio óptico para identificação dos possíveis amidos de trigo e de outros cereais e fécula de batata. Através dessa análise foi confirmada a presença de amido de trigo juntamente à fécula de batata, conforme identificado na Figura 1.

**Tabela 1.** Resultado do ELISA para a presença de glúten em seis alimentos industrializados com a inscrição “Não contém Glúten” e cinco com a inscrição “Contém Glúten” comercializados no município do Rio de Janeiro

Tipo de amostra	Marca	Ingredientes	Rótulo	Teor de glúten detectado (mg.kg <sup>-1</sup> )	Resultado segundo a legislação brasileira
Batata frita ondulada	1	Batata, óleo vegetal de palma e sal		7,40	Não contém Glúten
Polvilho Doce	2	Fécula de mandioca		7,85	Não contém Glúten
Creme de arroz	3	Amido de arroz		11,50	Não contém Glúten
Fécula de batata	4	Batata	Não contém Glúten	35,73	Contém Glúten
Farofa de soja	5	Farinha de mandioca, proteína texturizada de soja, óleo vegetal, alho, sal, cebola e condimentos diversos	(NCG)	5,71	Não contém Glúten
Fubá de milho degerminado	6	Farinha de milho		6,37	Não contém Glúten
Farinha de milho fina	7	Farinha de milho		8,86	Não contém Glúten
Sopa de cebola	8	Fécula de mandioca, farinha de trigo, proteína vegetal, gordura vegetal, cebola, sal e especiarias	Contém Glúten	262,70	Contém Glúten
fubá	9	Farinha de milho	(CG)	6,59	Não contém Glúten
Farinha de milho temperada	10	Farinha de milho, óleo vegetal, alho, sal, cebola e pimentas diversas		7,62	Não contém Glúten
Farinha de milho flocada	11	Farinha de milho		6,07	Não contém Glúten

Limite de detecção do kit: 3 µg de glúten.kg<sup>-1</sup>





**Figura 1.** Identificação da fécula de batata, amido de trigo e de milho e fécula de mandioca em amostra de fécula de batata (aumento 400 vezes)  
Elaborado por Juliana Machado dos Santos

Segundo os dados constantes na Tabela 1, pode-se notar que na lista de ingredientes do grupo de alimentos com a inscrição “contém glúten”, somente no rótulo da sopa de cebola consta uma fonte de glúten (farinha de trigo), confirmando o resultado obtido no teste ELISA; contudo, as demais amostras apresentaram resultados negativos contrariando o disposto no rótulo, resultado semelhante ao encontrado por Felinto<sup>3</sup>, que ao analisar oito marcas de chocolate branco e ao leite com a inscrição “contém glúten”, concluiu que os fabricantes procediam dessa forma preventiva por não analisarem a presença ou não desse componente, diminuindo as opções de consumo dos pacientes celíacos.

Silva<sup>13</sup>, ao analisar através do kit ELISA R5 doze amostras rotuladas “contém glúten”, verificou que somente duas apresentaram realmente contaminação por glúten acima de 20 mg.kg<sup>-1</sup>, semelhante ao nosso trabalho, que de 5 amostras do grupo CG, apenas uma apresentou conteúdo de glúten acima de 20 mg.kg<sup>-1</sup>. Nos rótulos das outras quatro amostras do grupo com a inscrição “contém glúten”, não foi mencionado qualquer ingrediente com glúten, porém continha a advertência “Produto naturalmente sem glúten e produzido em local onde são processados alimentos com glúten”. O que nos leva a concluir que devido ao não monitoramento do conteúdo de glúten nos alimentos industrializados por parte dos órgãos competentes do governo, os fabricantes rotulam seus produtos com a inscrição “contém glúten” como uma forma preventiva, caso ocorra alguma contaminação durante a fabricação de seus produtos.

Para a confiabilidade nos rótulos de diversos produtos alimentícios industrializados com as inscrições “não contém glúten” e “contém glúten”, essa informação deve ser clara e correta para que os consumidores possam planejar adequadamente sua dieta. Diversos estudos constataram que variados grupos de alimentos onde os rótulos continham a inscrição “não contém glúten” ou “naturalmente sem glúten” apresentaram contaminação por glúten e os produtos com a inscrição “contém glúten” os teores de glúten estavam em quantidades inferiores à estipulada pela legislação vigente no Brasil, demonstrando que a informação nutricional não estava correta<sup>3,13,17</sup>, dificultando o acesso dos indivíduos portadores da DC à uma alimentação segura, variada e saudável.

Analisando os resultados obtidos nesse trabalho, com objetivo de avaliar a veracidade das informações contidas nos rótulos quanto à presença de glúten, dos 11 produtos analisados, cinco (45,4 %) apresentaram informações incorretas nos seus rótulos, em desacordo com o Código de Defesa do Consumidor<sup>4</sup>, restringindo assim o cardápio de escolhas alimentares saudáveis para essa população devido a produtos naturalmente sem glúten anunciarem no rótulo “contém glúten” e, o mais preocupante, o produto que não deveria conter glúten estar contaminado. Demonstrando que a contaminação se deu durante a produção.

Dentre os diversos estudos relativos à rotulagem de alimentos e considerações sobre a legislação<sup>2,5,17,18</sup> e métodos de detecção de glúten em alimentos<sup>2,13,19-21</sup> verificou-se que se faz necessário definir políticas que visem a educação dos consumidores quanto às informações contidas nos rótulos dos alimentos, incentivar a produção de alimentos livres de glúten para a população celíaca, como também a avaliação laboratorial do teor de glúten por parte dos fabricantes para atendimento aos portadores da DC e principalmente para que amplie a oferta de alimentos na dieta desse grupo, levando à melhoria da qualidade de vida<sup>7</sup>.

## CONCLUSÃO

No presente trabalho, aproximadamente 50 % dos alimentos analisados continham as informações incorretas quanto à presença de glúten no alimento, contrariando a regra geral de que o rótulo de alimento deve conter informações claras, precisas e legíveis sobre todos os seus componentes para que o consumidor possa fazer sua opção de compra de acordo com suas

necessidades e peculiaridades.

No tocante à população celíaca, será necessária uma mobilização por parte dos fabricantes de alimentos, cujo rótulo consta a inscrição "não contém glúten", para que possam garantir a qualidade do seu produto de acordo com as informações disponíveis no rótulo. Quanto à Vigilância Sanitária, se faz necessário definir uma política de fiscalização, através de monitoramento, desse grupo de alimentos que atenda aos portadores de DC.

## REFERÊNCIAS

1. Doença celíaca merece atenção do CNS. Conselho Nacional de Saúde, Brasília, 5 jun. 2012. [Acesso 2012 jun 18]. Disponível em: [http://conselho.saude.gov.br/ultimas\_noticias/2012/05\_jun\_doenca\_celiaca.html].
2. Sdepanian VL, Morais MB, Fagundes-Neto U. Doença celíaca: características clínicas e métodos utilizados no diagnóstico de pacientes cadastrados na Associação dos Celíacos do Brasil. *J Ped.*2001;77(2):131-8.
3. Felinto VT. Análise da rotulagem quanto à presença de glúten em chocolates [monografia de especialização]. Brasília (DF): Universidade Federal de Brasília; 2008.
4. Brasil. Ministério da Justiça. Lei nº 8078, de 11 de setembro de 1990. Código de Defesa do Consumidor. Dispõe sobre a Proteção do Consumidor e dá outras Providências. Diário Oficial [da] União, Brasília, DF, 12 de set. 1990.
5. Câmara MCC, Marinho CLC, Guilam MC, Braga AMCB. A produção acadêmica sobre a rotulagem de alimentos no Brasil. *Rev Panam Salud Publica.*2008;23(1):52-8.
6. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Lei nº 10674, de 16 de maio de 2003. Obriga a que os produtos alimentícios comercializados informem sobre a presença de glúten, como medida preventiva e de controle da doença celíaca. Diário Oficial [da] União; Brasília, DF, 19 de mai. 2003.
7. Laureano AM. Análise da presença de glúten em alimentos rotulados como livres de glúten através de ensaios imunoenzimático e de fitas imunocromatográficas [dissertação de mestrado]. Porto Alegre (RS): Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2010.
8. Codex Alimentarius Commission. CODEX STAN 118-1979: Codex Standard for Foods for Special Dietary Use for Persons Intolerant to Gluten. Roma; revised 2008.
9. Brasil. Presidência da República. Lei nº11346, de 15 de setembro de 2006. Lei Orgânica de Segurança Alimentar e Nutricional (LOSAN). Estabelece as definições, princípios, diretrizes, objetivos e composição do Sistema Nacional de Segurança Alimentar e Nutricional- SISAN, por meio do qual o poder público, com a participação da sociedade civil organizada, formulará e implementará políticas, planos, programas e ações com vistas em assegurar o direito humano à alimentação adequada. Diário Oficial [da] União, Brasília, DF, 18 de set. 2006.
10. Manual Test RIDASCREEN® GLIADIN R-Biopharm AG. Revisão: 10-05-10.
11. Association of Official Analytical Chemists - AOAC. Official methods of analysis of AOAC International. 18ª ed. Washington, D.C; 2005.
12. Rodrigues RMMS, Atui MB, Correia M. (Coord.). Métodos de análise microscópica de alimentos. São Paulo: Letras & Letras, 1999.
13. Silva RP. Detecção e quantificação de glúten em alimentos industrializados por técnica de ELISA [dissertação de mestrado]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo; 2010.
14. Araújo HMC, Araújo WMC, Botelho RBA, Zandonadi RP. Doença celíaca, hábitos e práticas alimentares e qualidade de vida. *Rev Nutr.*2010;23(3):467-74.
15. Pires BAD. Análise qualitativa de glúten em alimentos: Métodos Imunoquímicos e Moleculares [dissertação de mestrado]. Rio de Janeiro (RJ): INCQS/Fiocruz; 2013.
16. Carta de Fortaleza. FENACELBRA- Federação Nacional das Associações de Celíacos do Brasil, Fortaleza, 5 mai. 2012. [acesso 2013 fev 27]. Disponível em: [http://www.doencaceliaca.com.br/].
17. Stringheta PC, Vilela MAP, Amaral MPH, Vilela FMP, Bertges FS. A propaganda de alimentos e a proteção da saúde dos portadores de doença celíaca. *HU Rev.*2006; 32(2):43-6.
18. Santos e Silva AM, Fernandes PM. Legislação Brasileira sobre glúten e o entendimento do Superior Tribunal de Justiça. 7ª Mostra de Produção Científica da Pós-Graduação *Lato sensu* da PUC Goiás; outubro de 2012; Goiânia. [acesso 2013 fev 19] Disponível em: [http://www.cpgls.ucg.br/7mostra/Artigos1c.html].
19. Abreu RW, Barbosa SFC, Della Torre JCM, Lichtig J, Zenebon O. Detecção de glúten em alimentos por meio de ELISA. *Rev Inst Adolfo Lutz.*2006;65(3):176-80.
20. Bicudo MOP. Avaliação da presença de glúten em produtos panificados para celíacos- estudo de caso [dissertação de mestrado]. Curitiba (PR): Universidade Federal do Paraná; 2010.
21. Laureano AM, Silveira TR. Assessment of the gluten content in gluten-free labeled foods: comparison of two gluten detection methods. *Seg Alim Nutr.*2010; 17(2):70-7.

## Caracterização antibacteriana e fitoquímica de flores de *Hibiscus rosa-sinensis* L. (mimo-de-vênus) e *Hibiscus syriacus* L. (hibisco-da-síria)

### Antibacterial and phytochemical characterization of flowers of *Hibiscus rosa-sinensis* L. (treat-of-venus) and *Hibiscus syriacus* L. (hibiscus-the-syrian)

RIALA6/1614

Analu' Barbosa da SILVA<sup>1</sup>, José Maria WIEST<sup>1</sup>, Marcelo Pinto PAIM<sup>2</sup>, Giovani GIROLOMETTO<sup>2</sup>.

\*Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Domience Silva, 61, CEP 91780-630, Porto Alegre, RS, Brasil. E-mail: absnutri@hotmail.com

<sup>2</sup>Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV/UFRGS).

Recebido: 26.05.2014 - Aceito para publicação: 25.09.2014

#### RESUMO

*Hibiscus rosa-sinensis* e o *Hibiscus syriacus* são considerados flores comestíveis e estudos demonstram seu potencial antibacteriano frente a diversos micro-organismos. Este trabalho teve por objetivo analisar a Intensidade de Atividade de Inibição (IINIB) e a Inativação Bacteriana (IINAB) *in vitro* dos extratos alcoólicos das flores dos hibiscos e a relação com os polifenóis e antocianinas revelados. Avaliou-se a ação antibacteriana frente às bactérias de interesse alimentar, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* Enteritidis resultando em diferenças significativas entre as médias de IINIB/IINAB, sendo *S. aureus* a cepa mais resistente para o *H. syriacus* e *S. Enteritidis* a mais sensível em ambos os experimentos. Com relação ao *H. rosa-sinensis*, este foi eficaz para ambas as bactérias. O teor dos compostos fitoquímicos presentes nas plantas constatou que há uma forte correlação positiva com a atividade antibacteriana ( $r = 0,88$ ), sendo que o *H. rosa-sinensis* obteve poder antibacteriano maior do que o *H. syriacus*, presumindo estar relacionado à maior quantidade de polifenóis e antocianinas detectadas no primeiro. Conclui-se que as plantas estudadas têm poder bactericida e bacteriostático podendo agir contra a contaminação bacteriana. **Palavras chave.** *Hibiscus rosa-sinensis* L., *Hibiscus syriacus* L., atividade antibacteriana, fitoquímicos.

#### ABSTRACT

*Hibiscus rosa-sinensis* *Hibiscus syriacus* and edible flowers are considered and studies demonstrate the potential antibacterial against various microorganisms. This study aimed to analyze the Inhibition of Activity Intensity (IINIB) and the Bacterial Inactivation (IINAB) *in vitro* of alcoholic extracts of flowers of hibiscus and the relationship with the revealed polyphenols and anthocyanins. We evaluated the front antibacterial action of food interest bacteria, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* Enteritidis resulting in significant differences between the mean IINIB/IINAB, *S. aureus* being the most resistant microorganism strain to *H. syriacus* and *S. Enteritidis* was the most sensitive bacteria in both experiments. Concerning the *H. rosa-sinensis* was effective for both bacteria. The content of phytochemicals compounds found in plants there is a strong positive correlation with the antibacterial activity ( $r = 0.88$ ), and *H. rosa-sinensis* obtained antibacterial power greater than *H. syriacus*, assuming be related to increased amount of polyphenols and anthocyanins detected at first. We conclude that the plants have bactericidal and bacteriostatic studied power may act against bacterial contamination.

**Keywords.** *Hibiscus rosa-sinensis* L., *Hibiscus syriacus* L., antibacterial activity, phytochemicals.

## INTRODUÇÃO

Desde a antiguidade, as flores vêm sendo utilizadas para fins comestíveis e medicinais de forma muito específica<sup>1</sup>.

Segundo Felipe e Tomasi<sup>2</sup>, ainda hoje poucos dados comprovam a comestibilidade de flores quando relacionada a compostos de interesse nutricional, pois não há tradição do uso destas na alimentação brasileira, além de pouca pesquisa sobre sua toxicidade. Porém, as flores podem ser ingeridas na forma de infusão, geléias, licores, etc, conforme mencionadas em livros que tratam de plantas medicinais ou mesmo de culinária.

As substâncias naturais de origem vegetal tornam o alimento mais atrativo ao consumidor, além de aumentar a vida útil devido à capacidade bacteriostática e bactericida, que retardam a deterioração e a multiplicação de micro-organismos indesejáveis<sup>3</sup>.

A pressão por parte dos consumidores se volta para uma produção maior de alimentos frescos, com conservantes naturais e uma maior garantia de segurança. Em contraponto, alguns alimentos industrializados contendo altos níveis de conservantes sintéticos são utilizados para redução da carga microbiana, podendo acarretar riscos à saúde dos consumidores<sup>4</sup>.

Conforme Lorenzi et al<sup>5</sup>, os dados botânicos do *Hibiscus rosa-sinensis* L., popularmente conhecido como mimo-de-vênus ou hibisco-da-china, são de arbusto pouco ramificado ou simples e lenhoso da Ásia Tropical, que chega a medir cerca de 3 a 5 metros de altura e com grande número de variedades e formas cultivadas nestes países. Seu caule é redondo quase aveludado, com pêlos glandulosos; as folhas são pecioladas, lobadas, alternas, densamente pilosas ao longo das nervuras, com granulações estreladas na face superior; as estípulas são agudas, pubescentes; e os pedúnculos são arqueados, arredondados, pubescente-aveludados. As flores são grandes e solitárias, geralmente brancas de manhã e rosas ou vermelhas à tarde formadas no decorrer de quase o ano todo; suas pétalas são ciliadas na margem, com fruto do tipo capsular com cinco lóculos; e a cápsula é aveludada, com pêlos estrelados e glandulíferos. Segundo Lorenzi e Souza<sup>6</sup>, o *Hibiscus syriacus* L. possui nomes populares de hibisco-da-síria e rosa-de-sharão. Neste estudo foi utilizado o cultivar “Totus Albus”, que corresponde a variedade muito elegante de flores de cor branca pura, medindo de 7 a 9 cm de diâmetro, às vezes com pétalas

rendadas no centro. Arbusto lenhoso ereto e ramificado originado da Ásia, que pode medir de 2 a 3m de altura e 2 m de diâmetro, com folhagem ornamental e ramos colunares. Suas folhas são ovaladas com alguns recortes irregulares, alternas, mucilaginosas, brilhantes, tem margens recortadas e coloração verde-escura. As flores podem ser simples ou dobradas e formam-se durante o ano todo, mas mais abundantes na primavera e verão<sup>\*1</sup>.

O cultivo destas duas variedades se dá a pleno sol como planta isolada, em renques como cerca viva, muros e cercas ou em conjuntos; multiplica-se por estacas e alporques no final do inverno<sup>7</sup>.

As pesquisas sobre o poder antibacteriano de *Hibiscus rosa-sinensis* foram caracterizadas frente a diversos micro-organismos com resultados satisfatórios, desde 1992 por Andrade et al<sup>8</sup>, Nair et al<sup>9</sup>, Seyyadnejad<sup>10</sup> e Ruban e Gajalakshmi<sup>11</sup>.

Em levantamento realizado por Gautam et al<sup>12</sup> de espécies vegetais com ação antibacteriana promissora, verificou-se que o extrato aquoso de *Hibiscus syriacus* demonstrou efetiva atividade antibacteriana contra *Mycobacterium tuberculosis*.

Os compostos fitoquímicos são sintetizados por plantas e eficazes contra uma ampla variedade de micro-organismos, provavelmente devido à capacidade de formar complexos com proteínas solúveis que se ligam à parede celular bacteriana<sup>13</sup>.

O objetivo desse estudo foi avaliar a Intensidade de Atividade de Inibição Bacteriana (IINIB) e de Inativação Bacteriana (IINAB) *in vitro* de extratos alcoólicos obtidos das flores de *Hibiscus rosa-sinensis* L. e *Hibiscus syriacus* L., frente a *Salmonella* Enteritidis e *Staphylococcus aureus*, relacionando estes resultados à presença de polifenóis totais e antocianinas.

## MATERIAL E MÉTODOS

O material vegetal utilizado para as análises foi a estrutura reprodutiva dos arbustos de *Hibiscus rosa-sinensis* L. e *Hibiscus syriacus* L. “Totus Albus”, denominados neste estudo como hibisco vermelho e hibisco branco, respectivamente. As amostras foram coletadas no período de janeiro a julho de 2013, em uma propriedade agroecológica em Porto Alegre/RS (coordenadas 30° 14' S e 51° 06' O) e identificada por semelhança segundo Lorenzi et al<sup>5</sup> para o mimo-de-

\*1 Conteúdo extraído de <[http://www.havlis.cz/karta\\_en.php?kytkaid=441](http://www.havlis.cz/karta_en.php?kytkaid=441)> acesso em 16 julho de 2013.

vênus, e por Lorenzi e Souza<sup>6</sup> para o hibisco-da-síria.

As pesquisas da atividade antibacteriana e fitoquímica foram desenvolvidas no Laboratório de Higiene do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos (ICTA), da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre/RS.

### Atividade antibacteriana

Os experimentos foram realizados em extratos obtidos por processo de extração alcoólica (alcoholatura dos componentes *in natura*) de flores dos hibiscos, na proporção de 400 g de flores frescas para 1000 mL de álcool etílico de cereais a 96 °GL (Farmaquímica®, Porto Alegre/RS/Brasil), que permaneceram por no mínimo 15 dias em maceração. Após este período, a alcoholatura foi filtrada em papel filtro, e posteriormente submetida à destilação fracionada sob pressão reduzida em rotaevaporador, desprezando-se a porção alcoólica, para a obtenção do extrato vegetal<sup>14</sup>. Nos extratos obtidos de *Hibiscus rosa-sinensis* L. trabalhou-se com as concentrações de 50, 25 e 12,5 % e para as flores de *Hibiscus syriacus* L. “Totus Albus”, somente na concentração de 50 %.

Foram desafiadas duas cepas-padrão de bactérias, sendo uma Gram-positiva *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e uma Gram-negativa *Salmonella* Enteritidis (ATCC 11076), mantidas na bacterioteca do Laboratório de Higiene (ICTA/UFRGS) em ágar nutriente (ACUMEDIA®), tendo sido reativadas em caldo infusão de cérebro e coração (BHI - Brain Heart Infusion Broth, Himedia®, Índia) incubado a 37 °C por 24 horas, até atingir no mínimo  $1,0 \times 10^8$  UFC/mL. O inóculo foi preparado, por diluição decimal seriada, em solução salina peptonada 1% tamponada (HIMEDIA®), de  $10^{-1}$  a  $10^{-8}$ : 1 mL do inóculo foi transferido para tubo contendo 9 mL da solução salina peptonada 1% tamponada (diluição  $10^{-1}$ ); 1 mL desta diluição foi transferida para novo tubo contendo 9 mL da solução salina peptonada 1% tamponada (diluição  $10^{-2}$ ) e assim sucessivamente até a diluição  $10^{-8}$ . O controle do inóculo foi realizado

pela técnica de semeadura de 0,1 mL das diluições  $10^{-6}$  e  $10^{-7}$ , em placas de Petri contendo ágar nutriente para contagem de colônias, seguido de incubação a 37 °C por 24 h. Para o estudo, somente foram utilizados inóculos que apresentaram população  $\geq 1,0 \times 10^8$  UFC/mL, sendo que a atividade antibacteriana dos extratos alcoólicos foi realizada segundo a técnica biométrica adaptada de Cavalli-Sforza<sup>15</sup>.

Utilizou-se a partir de dados do Teste de Diluição segundo DVG<sup>16</sup>, com base na técnica de sistema de tubos múltiplos modificada por Avancini<sup>17</sup> e revisada por Souza e Wiest<sup>18</sup>; Avancini e Wiest<sup>19</sup>; Maciel et al<sup>20</sup> e Cardoso<sup>21</sup>, neste último a confirmação para o confronto dos extratos com 8 diluições seriais logarítmicas ( $10^{-1}$  a  $10^{-8}$  UFC/mL) dos diferentes inóculos bacterianos. Os tubos de ensaio foram dispostos em duas linhas para cada bactéria. Na primeira linha (Sem Desinibidores), os tubos continham 1 mL da diluição do inóculo bacteriano, 4,5 mL de meio de cultura BHI duplamente concentrado e 4,5 mL do extrato vegetal. A segunda série (Com Desinibidores), os tubos continham os mesmos itens, porém acrescidos dos desinibidores bacterianos lecitina de soja (Delaware®, Porto Alegre/RS/Brasil), Tween 80 (Synth®, Diadema/SP/Brasil) e L-histidina (Synth®, Diadema/SP/Brasil), nas porcentagens de 0,6 %, 6 % e 0,2 %, respectivamente. Os tubos foram incubados a 37 °C por 24 horas e após esse período uma alçada de cada tubo foi semeada em ágar nutriente colocado em incubação aeróbia por 24, 48, 72 e 144 horas a fim de se verificar a presença de crescimento bacteriano.

A avaliação da atividade antibacteriana dos extratos alcoólicos foram interpretados como Intensidade de Atividade de Inibição Bacteriana (IINIB) e Intensidade de Atividade de Inativação Bacteriana (IINAB), representadas por variáveis ordinais arbitrarias de 9 a 0, sendo que o valor de 9 representou a atividade máxima e 0, a não atividade, conforme demonstrado no Quadro 1.

**Quadro 1.** Representação dos valores ordinais arbitrários de intensidade de atividade atribuídos às variáveis de Intensidade de Atividade de Inibição Bacteriana/bacteriostasia (IINIB) e Intensidade de Atividade de Inativação Bacteriana/bactericidia (IINAB), e suas correspondentes diluições e doses infectantes nos inóculos

9	8	7	6	5	4	3	2	1	0	Variáveis ordinárias de intensidade de atividade
$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$	$10^{-8}$	$10^{-9}$	n.a	UFC/mL – diluições de inóculo inibidas ou inativadas
$10^8$	$10^7$	$10^6$	$10^5$	$10^4$	$10^3$	$10^2$	$10^1$	1	n.a	UFC/mL – doses infectantes inibidas ou inativadas

n.a: ausência de atividade antibacteriana;

UFC/mL: Unidades Formadoras de Colônia por mililitro.

### Análise fitoquímica

A análise fitoquímica foi realizada em triplicata, utilizando as flores frescas, segundo metodologias específicas. A determinação dos níveis de polifenóis totais foi realizada pelo método Folin-Ciocalteu<sup>22</sup> e a curva padrão foi produzida com soluções de ácido gálico nas concentrações de 0, 25, 50, 75, 100, 125 e 150 µg/mL. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (UV Mini 1240, Shimadzu®, Japan) a 750 nm. Os resultados foram expressos em miligramas (mg) de equivalentes de ácido gálico (GAE) por 100 g de flor fresca dos hibiscos. As antocianinas totais foram determinadas pelo método de pH diferencial, conforme descrito por Giusti e Wrolstad<sup>23</sup>. Foram feitas as medidas de absorvâncias em espectrofotômetro em 540 nm para pH 1 e 700 nm para pH 4,5. O teor de pigmentos foi calculado considerando a absorvidade molar e os resultados expressos como miligramas (mg) de cianidina 3-glicosídeo/100 g de amostra.

### Análise estatística

Para a avaliação da atividade antibacteriana, foram utilizadas a análise descritiva e a análise de

variância (ANOVA), com complementação pelo Teste de Tukey ( $p < 0,0001$ )<sup>24</sup>. Estabeleceu-se nível de significância de 0,01 % para resultados considerados com diferença significativa entre as médias. Os programas estatísticos utilizados foram o “*Statistical Analysis System*” (SAS), versão 9.2 e o “*Statistical Package For The Social Sciences*” (SPSS/PASWSTAT), versão 18.

Para a avaliação fitoquímica, utilizaram-se as médias dos resultados encontrados de três repetições distintas e o desvio padrão, bem como teste-t com nível de significância ( $p < 0,05$ ).

Calculou-se a correlação de Pearson das análises fitoquímicas em relação com a atividade antibacteriana utilizando o programa Microsoft Office Excel® 2007 - Windows 7.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta os valores arbitrários obtidos para as diferentes concentrações do extrato do hibisco vermelho, o qual apresentou diferença significativa entre as médias de IINIB e IINAB para as duas bactérias, independente do tempo de exposição. Obtiveram-se

**Tabela 1.** Intensidade da atividade de inibição bacteriana (IINIB) e intensidade da atividade de inativação bacteriana (IINAB), produzidas pelo extrato de *Hibiscus rosa-sinensis* L (hibisco vermelho) nas concentrações de 50 % (A), 25 % (B) e 12,5 % (C), média de três repetições independentes, sobre 2 inóculos bacterianos padrões, em até 144 horas de incubação aeróbia à 37 °C

Tempo de exposição (hora)	Espécies bacterianas / Desinibidores											
	Salmonella Enteritidis (ATCC 11076)						Staphylococcus aureus (ATCC 25923)					
	IINIB*			IINAB*			IINIB*			IINAB*		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
24	9,00 <sup>aA</sup>	7,67 <sup>bC</sup>	4,33 <sup>cC</sup>	9,00 <sup>aA</sup>	7,67 <sup>bC</sup>	4,33 <sup>cC</sup>	8,33 <sup>aC</sup>	5,33 <sup>bD</sup>	1,00 <sup>cB</sup>	8,33 <sup>aC</sup>	5,33 <sup>bD</sup>	1,00 <sup>cB</sup>
48	9,00 <sup>aA</sup>	8,67 <sup>bB</sup>	6,33 <sup>cB</sup>	9,00 <sup>aA</sup>	8,67 <sup>bB</sup>	6,33 <sup>cB</sup>	8,67 <sup>aB</sup>	6,67 <sup>bC</sup>	1,00 <sup>cB</sup>	8,67 <sup>aB</sup>	6,67 <sup>bC</sup>	1,00 <sup>cB</sup>
72	9,00 <sup>aA</sup>	9,00 <sup>aA</sup>	8,67 <sup>bA</sup>	9,00 <sup>aA</sup>	9,00 <sup>aA</sup>	8,67 <sup>bA</sup>	9,00 <sup>aA</sup>	8,00 <sup>bB</sup>	1,00 <sup>cB</sup>	9,00 <sup>aA</sup>	8,00 <sup>bB</sup>	1,00 <sup>cB</sup>
144	9,00 <sup>aA</sup>	9,00 <sup>aA</sup>	8,67 <sup>bA</sup>	9,00 <sup>aA</sup>	9,00 <sup>aA</sup>	8,67 <sup>bA</sup>	9,00 <sup>aA</sup>	8,67 <sup>bA</sup>	9,00 <sup>aA</sup>	9,00 <sup>aA</sup>	8,67 <sup>bA</sup>	9,00 <sup>aA</sup>
Ma	8,19 <sup>a</sup>						6,30 <sup>b</sup>					

IINIB (sem desinibidor/bacteriostasia); IINAB (com desinibidor/bactericidia). Ma = média aritmética

\*9 a 1=valores arbitrários que representam a intensidade da atividade antibacteriana (média de três repetições) e 0=não atividade

Letras minúsculas diferentes sobescritas (a,b,c) na mesma linha para cada inoculo padrão, levando-se em consideração IINIB e IINAB, indicam diferenças significativas, para a análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey ( $p < 0,0001$ )

Letras maiúsculas diferentes sobescritas (A, B, C, D), na mesma coluna indicam diferença significativa entre o tempo de exposição para a análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey ( $p < 0,0001$ )

as médias aritméticas (Ma) dos valores arbitrários do confrontamento dos extratos nas concentrações de 50, 25 e 12,5 %, com as bactérias *Salmonella* Enteritidis, cuja média obtida foi 8,19 e para *Staphylococcus aureus* de 6,30, indicando que a dose infectante inibida ou inativada atingiu  $10^7$  UFC/mL e  $10^5$  UFC/mL, respectivamente, demonstrando maior sensibilidade da primeira em relação à segunda bactéria.

Constatou-se ainda, que a cepa de *S. Enteritidis* foi inativada/inibida na concentração de 50 % desde as primeiras 24 h de confrontamento, enquanto que a de *S. aureus* foi inativada/inibida somente após 72 h de exposição.

Nota-se que, à medida que as concentrações do extrato diminuem, os valores arbitrários acompanham este decréscimo, sendo menos eficaz a ação frente às bactérias em questão e, conseqüentemente, conforme aumenta o tempo de exposição aumenta a eficácia do extrato.

Estudando a variedade de hibisco branco (Tabela 2), demonstram-se as médias dos valores arbitrários de 8,00 para a cepa de *S. Enteritidis* e 3,00 para *S. aureus*, em que ocorre sensibilidade da primeira em relação à segunda bactéria devido à menor redução logarítmica de  $10^7$  para  $10^2$  UFC/mL. Assim houve diferença significativa entre as médias, independente do tempo de exposição e IINIB e IINAB entre os dois inóculos bacterianos confrontados ( $p < 0,0001$ ) e, o extrato alcoólico do hibisco branco obteve

**Tabela 2.** Intensidade da atividade de inibição bacteriana (IINIB) e intensidade da atividade de inativação bacteriana (IINAB), produzidas pelo extrato de *Hibiscus syriacus* L. (hibisco branco) na concentração de 50 %, média de três repetições independentes, sobre 2 inóculos bacterianos padrões, em até 144 horas de incubação aeróbia à 37 °C

Tempo de exposição (hora)	Espécies bacterianas / Desinibidores			
	<i>Salmonella</i> Enteritidis (ATCC 11076)		<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	
	IINIB	IINAB	IINIB	IINAB
24	6,67 <sup>aC</sup>	6,67 <sup>aC</sup>	1,00 <sup>bB</sup>	1,00 <sup>bB</sup>
48	7,33 <sup>aB</sup>	7,33 <sup>aB</sup>	1,00 <sup>bB</sup>	1,00 <sup>bB</sup>
72	9,00 <sup>aA</sup>	9,00 <sup>aA</sup>	1,00 <sup>bB</sup>	1,00 <sup>bB</sup>
144	9,00 <sup>aA</sup>	9,00 <sup>aA</sup>	9,00 <sup>aA</sup>	9,00 <sup>aA</sup>
Ma	8,00 <sup>a</sup>		3,00 <sup>b</sup>	

IINIB (sem desinibidor/bacteriostasia); IINAB (com desinibidor/bactericidia). Ma = média aritmética

\*9 a 1=valores arbitrários que representam a intensidade da atividade antibacteriana (média de três repetições) e 0=não atividade

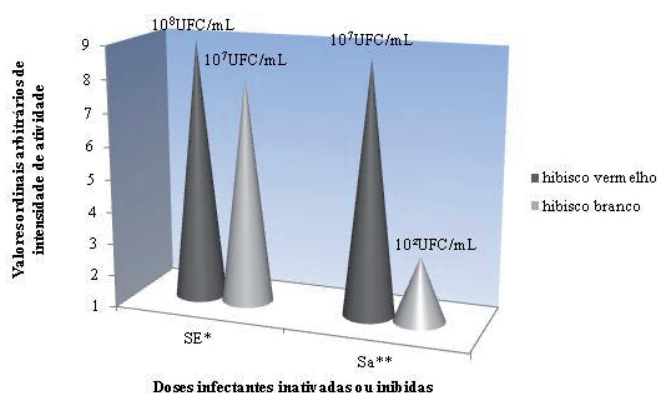
Letras minúsculas diferentes sobscritas (a,b) na mesma linha indicam diferenças significativas entre as espécies bacterianas para a análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey (<0,0001), independente da presença ou da ausência de desinibidores ou do tempo de exposição

Letras maiúsculas diferentes sobscritas (A, B, C) na mesma coluna indicam diferença significativa entre os valores de IINIB e IINAB pela Análise de Variância (ANOVA) e teste de Tukey (<0,0001), considerando-se as espécies bacterianas

ação máxima antibacteriana em 72 h para *S. Enteritidis* e em 144 h de exposição frente à *S. aureus*.

Constata-se que as médias dos valores arbitrários para as duas bactérias, tanto para IINIB quanto para IINAB, foram iguais, levando em consideração os tempos de exposição. Contudo os desestressantes/desinibidores incluídos na categoria IINAB garantem esta técnica, não havendo reparação das células bacterianas e evidenciando

que as plantas têm poder bactericida, portanto a ação do extrato foi suficiente para inativar as bactérias. Com a mesma metodologia, mas com plantas diferentes, Souza e Wiest<sup>18</sup> e Girolometto et al<sup>25</sup> encontraram resultados superiores para IINIB em relação ao IINAB. Em contraponto, Maciel et al<sup>20</sup> predominantemente encontraram valores arbitrários maiores de IINIB e IINAB de *Hibiscus sabdariffa* L. coletados em dois acessos.



**Figura 1.** Comparação dos resultados das médias dos valores ordinários de intensidade de atividade bacteriana e as doses infectantes inativadas ou inibidas pelos extratos dos hibiscos na concentração de 50% em confrontamento com as bactérias *Salmonella* Enteritidis (SE\*) e *Staphylococcus aureus* (SA\*\*).

Analisando a Figura 1, constatou-se que as doses infectantes inativadas ou inibidas das bactérias nos confrontamentos os extratos possuem efeitos bactericida e bacteriostático frente as bactérias de interesse alimentar, em que o *S. aureus* se mostrou a cepa mais resistente, pois foi observado uma redução de apenas 2 ciclos logarítmicos quando comparada com a redução de 7 ciclos logarítmicos de *S. Enteritidis* após a aplicação do extrato de hibisco branco. Já o extrato do hibisco vermelho foi eficaz para ambas as bactérias, atingindo uma dose infectante de inativação ou inibição de 10<sup>7</sup> e 10<sup>8</sup> UFC/mL dos inóculos de *S. aureus* e *S. Enteritidis*, respectivamente.

Perante as doses infectantes inativadas ou inibidas pelos extratos dos dois hibiscos analisados, presume-

se que estes poderiam servir como antibacterianos de interesse alimentar, considerando que segundo Forsythe<sup>4</sup>, a dose infecciosa de *Salmonella* capaz de provocar uma doença de origem alimentar, variando de acordo com a idade e saúde da vítima, com o alimento e com a linhagem, foram < 10<sup>6</sup> células, e que em *S. aureus* encontravam-se na faixa de 10<sup>5</sup> a 10<sup>8</sup> UFC/g ou mL.

Comparando os testes do atual trabalho aos resultados da atividade antibacteriana encontrados com outra técnica utilizada por Ruban e Gajalakshmi<sup>11</sup> que analisaram a atividade antibacteriana *in vitro* do extrato da flor de *Hibiscus rosa-sinensis* contra patógenos humanos, foram encontradas respostas semelhantes, demonstrando que a extração de etanol teve maior zona de inibição registrada para *Salmonella* sp. com outras bactérias como *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli*. O *Hibiscus rosa-sinensis* também inibiu o crescimento de *S. aureus*, *P. aeruginosas* e foi resistente para *E. coli*<sup>10</sup>, obtendo os mesmos resultados deste estudo para a primeira bactéria. Através de outras técnicas, no trabalho de Nair et al.<sup>9</sup> a atividade antibacteriana dos extratos aquoso e metanólico de *H. rosa-sinensis* foram testados perante as seis bactérias, resultando em inibição para cinco delas. Concorda-se neste contexto, o que foi verificado com o *Hibiscus syriacus*, em que os extratos aquosos deste demonstraram atividade antibacteriana considerável em ensaios de diluição em caldo contra o micro-organismo *Mycobacterium tuberculosis*<sup>12</sup>. Outros gêneros desta espécie de *Hibiscus*, como o *Hibiscus sabdariffa* e *Hibiscus tiliaceus* já demonstraram ação antibacteriana frente aos micro-organismos *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosas*, *Salmonella choleroesuis* e *Escherichia coli*<sup>26,27</sup>.

**Tabela 3.** Análise da correlação entre as diferentes espécies de hibisco, da quantidade de polifenóis e antocianinas com a atividade antibacteriana, independente dos fatores tempo de confrontação, espécie bacteriana e da presença ou ausência de dessessressores/desinibidores bacterianos dos extratos alcoólicos

Espécie vegetal	Polifenóis totais (mg GAE/100g)*	Antocianinas (mg/100g)*	Atividade Antibacteriana	Coefficiente de correlação de Pearson (r)**
Hibisco vermelho ( <i>Hibiscus rosa-sinensis</i> L.)	155,85 ± 0,95	85,71 ± 0,30	7,25	0,88
Hibisco branco ( <i>Hibiscus syriacus</i> L.)	84,68 ± 0,36	10,87 ± 0,42	5,5	
<i>p-value</i> ***	<i>p</i> <0,05	<i>p</i> <0,05	-	

\*média de 3 repetições distintas; \*\*correlação de Pearson em que há uma correlação positiva do coeficiente r (0<r<1); \*\*\* valores na mesma coluna indicam diferença significativa para o test-t (*p*<0,05) das médias de polifenóis totais e antocianinas entre as duas amostras de planta



Quanto à relação dos compostos bioativos detectados e a atividade antibacteriana dos dois hibiscos demonstram-se na sequência a Tabela 3 a correlação de Pearson, que resulta na intensidade da relação linear entre as duas variáveis estudadas.

Constata-se que houve diferença significativa entre as duas espécies de planta em relação aos compostos fitoquímicos (Tabela 3). Sobre as médias dos valores arbitrários apresentadas na atividade antibacteriana e as quantidades de bioativos presentes nas flores em questão, demonstra que a relação entre o teor de polifenóis e antocianinas é diretamente proporcional ao poder antibacteriano dos extratos, como relatado por Maciel et al<sup>20</sup>.

Na correlação de Pearson, indicou-se que há uma forte correlação positiva entre os compostos fitoquímicos e a atividade antibacteriana ( $r = 0,88$ ), ou seja, quanto maior ou menor a quantidade de compostos encontrados nas espécies vegetais, maior ou menor será sua atividade antibacteriana. Assim, o extrato alcoólico do hibisco vermelho obteve poder antibacteriano maior do que o extrato alcoólico do hibisco branco, relacionado à maior quantidade de polifenóis e antocianinas identificados no primeiro.

Para Torres et al<sup>28</sup>, considerando a riqueza dos constituintes presentes em plantas, igualmente a este estudo com resultado positivo da atividade antimicrobiana dos extratos das espécies vegetais testadas, pode ser devida à presença de compostos polifenólicos detectados, uma vez que estes compostos possuem uma ação inespecífica sobre o micro-organismo, rompendo a parede celular antimicrobiana e inibindo os sistemas enzimáticos para a formação da mesma.

Resultados semelhantes a presente pesquisa foram verificados por Chao e Yin<sup>29</sup>, em que utilizaram o extrato alcoólico e aquoso de hibisco contra bactérias de interesse alimentar, e concluíram que há uma possível relação entre os compostos fenólicos e o efeito antibacteriano. Na revisão de Ríos e Recio<sup>30</sup>, constatou-se que dos constituintes químicos presentes nas plantas, os compostos fenólicos foram predominantes e as bactérias Gram-positivas são sensíveis a este grupo de substâncias.

## CONCLUSÃO

Os resultados revelaram que os extratos alcoólicos dos dois hibiscos possuem igualmente atividade antibacteriana significativos, apresentando eficácia bactericida, de inativação bacteriana e bacteriostática, portanto de inibição do crescimento bacteriano e, sua

relação com os compostos fitoquímicos presentes nas plantas pode influenciar nesta ação.

Sugere-se, contudo, a utilização acerca dos extratos dos hibiscos em questão, como condimentos ou conservantes alimentares, oportunizando alimentos naturais, sensorialmente agradáveis, com vistas à segurança alimentar sustentável. Além da possibilidade destas plantas servirem para sistemas alimentares, prevenindo a contaminação bacteriana e/ou de sua utilização terapêutica.

## REFERÊNCIAS

1. Prata GGB. Compostos bioativos e atividade antioxidante de pétalas de rosas de corte [dissertação de mestrado]. João Pessoa (PB): Universidade Federal da Paraíba; 2009.
2. Felipe GM, Tomasi MC. Entre o jardim e a horta: as flores que vão para a mesa. 2ª ed. São Paulo: SENAC; 2004.
3. Pereira MC, Vilela GR, Costa LMAS, Silva RF, Fernandes AF, Fonseca EWN et al. Inibição do desenvolvimento fúngico através da utilização de óleos essenciais de condimentos. *Ciênc Agrotec*.2006; 30(4):731-8.
4. Forsythe SJ. Microbiologia da segurança dos alimentos. 2ª ed. Porto Alegre: Artmed Editora; 2013.
5. Lorenzi H, Souza HM, Torres MAV, Bacher LB. Árvores exóticas no Brasil: madeiras, ornamentais e aromáticas. São Paulo: Instituto Plantarum; 2008.
6. Lorenzi H, Souza HM. Plantas Ornamentais no Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras. Nova Odessa, SP: Editora Plantarum; 1995.
7. Di Stasi LC, Hiruma-Lima CA. Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica. 2ª ed. São Paulo: Editora UNESP; 2002.
8. Andrade FJL et al. Anais do XII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 1992.
9. Nair R, Kalariya T, Chanda S. Antibacterial activity of some selected Indian medicinal flora. *Turk J Biol*.2005;29:41-7.
10. Seyyednejad SM, Koochak H, Darabpour E, Motamedi H. A survey on *Hibiscus rosa-sinensis*, *Alcea rosea* L. and *Malva neglecta* Wallr as antibacterial agents. *Asian Pac J Trop Med*.2010;3(5):351-5.
11. Ruban P, Gajalakshmi K. Atividade antibacteriana *in vitro* de extrato de flor de *Hibiscus rosa-sinensis* contra patógenos humanos. *Asian Pac J Trop Biomed*.2012;2(5):399-403.
12. Gautam R, Saklani A, Jachak SM. Indian medicinal plants as a source of antimycobacterial agents. *J Ethnopharmacol*.2007;110:200-34.
13. Matias EFF, Santos KKA, Almeida TS, Costa JGM, Coutinho HDM. Atividade antibacteriana *in vitro* de *Croton campestris* A., *Ocimum gratissimum* L. e *Cordia verbenacea* DC. *Rev Bras Bioci*.2010;8(3):294-8.
14. Brasil. Farmacopéia Brasileira. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 5ª ed. Brasília: ANVISA; 2010.
15. Cavalli-Sforza L. Biometrie: Grundzüge biologisch-medizinische Statistik (Biometria: fundamentos de estatística viológica-médica). Stuttgart: Gustav Fisher V. 1974. p. 201-4.

16. DVG (Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft). Richtlinien zur Prüfung chemischer Desinfektionsmittel für die Veterinärmedizin. In: Schliesser T, Strauch D. Desinfektion in Tierhaltung, Fleisch – und Milchwirtschaft. Stuttgart: Enke V, 455p, 1981.
17. Avancini CAM. Saneamento aplicado em saúde e produção animal: etnografia, triagem da atividade antibacteriana de plantas nativas no sul do Brasil e testes de avaliação do decocto de *Hypericum caprifoliatum* Cham. E Sochlecht – Hypericaceae (Guttiferae) – (“escadinha”, “sinapismo”) para uso como desinfetante e antisséptico [tese de doutorado]. Porto Alegre: Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2002.
18. Souza AA, Wiest JM. Atividade antibacteriana de *Aloysia gratissima* (Gill et Hook) Tronc. (garupá, erva-santa) usada na medicina tradicional no Rio Grande do Sul-Brasil. *Rev Bras Plantas Med*.2007;9:23-9.
19. Avancini CAM, Wiest JM. Atividade desinfetante do decocto de *Hypericum caprifoliatum* Cham. E Sochlecht – Hypericaceae (Guttiferae) – (“escadinha”, “sinapismo”) frente a diferentes doses infectantes de *Staphylococcus aureus* (agente infeccioso em mastite bovina). *Rev Bras Plantas Med*.2008;10(1):64-9.
20. Maciel M J, Paim MP, Carvalho HHC, Wiest JM. Avaliação do extrato alcoólico de hibisco (*Hibiscus sabdariffa* L.) como fator antibacteriano e antioxidante. *Rev Inst Adolfo Lutz*.2012;71(3):462-70.
21. Cardoso PS. Análise fitoquímica e antibacteriana da planta *Hibiscus acetosella* WeLw ex Hiern [trabalho de conclusão de curso]. Criciúma (SC): Universidade do Extremo Sul Catarinense; 2011.
22. Moyer RA, Hummer KE, Finn CE, Frei B, Wrolstad RE. Anthocyanins, phenolics, and antioxidants capacity in diverse small fruits: Vaccinium, Rubus, and Ribes. *J Agric Food Chem*.2002;50:519-25.
23. Giusti MM, Wrolstad RE. Antocyanins: characterization and measurement with uv-visible spectrosopy. In: Wrolstad RE (Ed.). *Currente protocols in food analytical chemistry*. New York: John Wiley & Sons, 2001. Unit F1.2.1-13.
24. Callegari-Jaques LM. Bioestatística: princípios e aplicações. Porto Alegre: Artmed; 2004. 255p.
25. Girolometto G, Avancini CAM, Carvalho HHC, Wiest JM. Atividade Antibacteriana de extratos de erva mate (*Ilex paraguariensis* A. St.Hill). *Rev Bras Plantas Med*.2009;11(1):49-55.
26. Wong SK, Lim YY, Chan EWC. Evaluation of Antioxidant, Anti-tyrosinase and Antibacterial Activities of Selected *Hibiscus* Species. *Ethnobot Leaflets*.2010;14:781-96.
27. Siqueira CFQ, Cabral DLV, Sobrinho TJSP, Amorim ELC, Melo JG, Araujo TAS et al. Levels of Tannins and Flavonoids in Medicinal Plants: Evaluating Bioprospecting Strategies. *J Evid Based Complem Altern Med*.2012; 7p.
28. Torres EC, Ribeiro A, Soares MA. Abordagem fitoquímica e prospecção do potencial antimicrobiano *in vitro* das partes aéreas de três espécies vegetais pertencentes à família Lamiaceae. 2008. Disponível em: [[http://www.diaadiaeducacao.pr.gov.br/diaadia/diaadia/arquivos/File/conteudo/artigos\\_teses/Biologia/Artigos/abordagem-fitoquimica.pdf](http://www.diaadiaeducacao.pr.gov.br/diaadia/diaadia/arquivos/File/conteudo/artigos_teses/Biologia/Artigos/abordagem-fitoquimica.pdf).] Acessado em: 07/01/2015.
29. Chao CY, Yin MC. Antibacterial Effects of Roselle Calyx Extracts and Protocatechuic Acid in Ground Beef and Apple Juice. *Foodborne Pathog Dis*.2009;6(2):201-6.
30. Ríos JL, Recio MC. Medicinal plants and antimicrobial activity. *J Ethnopharmacol*.2005;100:80–4.

## Uso de PCR Duplex para detecção dos genes *femA* e *mecA* e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) em *Staphylococcus aureus* isolados de leite cru

Detection of *femA* and *mecA* genes in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine raw milk using duplex PCR and determination of the minimum inhibitory concentration of the isolates

RIALA6/1615

Junia Pacheco TEIXEIRA<sup>1\*</sup>, Nivaldo da SILVA<sup>1</sup>, Leorges Moraes da FONSECA<sup>2</sup>, Geraldo Marcio da COSTA<sup>3</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Laboratório de Pesquisa e Diagnóstico em Doenças Infecciosas (LPDDI), Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP), Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Av. Presidente Antônio Carlos 6627, CEP 30161-970, Pampulha, Belo Horizonte, MG. E-mail: junia\_pacheco@yahoo.com.br

<sup>2</sup>Laboratório de Análise da Qualidade do Leite (LabUFMG), Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais

<sup>3</sup>Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras (UFV)

Recebido: 09.07.2014 - Aceito para publicação: 30.09.2014

### RESUMO

O objetivo deste trabalho foi de identificar *Staphylococcus aureus* e as linhagens resistentes à meticilina (MRSA) em amostras de leite cru bovino, por meio de métodos moleculares, e de determinar a concentração inibitória mínima (CIM) dos isolados. *S. aureus* pode apresentar linhagens resistentes à meticilina e a outros antimicrobianos utilizados na prática médico-veterinária. Foram analisadas 251 amostras de leite cru de tanques de expansão, procedentes de cinco mesorregiões produtoras de leite de Minas Gerais – Brasil. Por meio de PCR foi identificada a presença do gene *femA* em 278 isolados de *S. aureus*; e as linhagens MRSA foram determinadas pela presença do gene *mecA*. Os ensaios de PCR foram positivos para gene *femA* em 100 % dos isolados testados; e entre essas amostras 11 (3,95 %) apresentaram produto amplificado de 533 pb correspondente ao gene *mecA*. Para analisar a susceptibilidade dos isolados foi realizado o teste de CIM para nove substâncias antimicrobianas. Foram identificados 149 isolados de *S. aureus* que apresentaram CIM ≤ 4 µg/mL para enrofloxacin, com 92,54 % de susceptibilidade, e 55 isolados testados para sulfametoxazol+trimetoprima, apresentaram CIM ≤ 2 µg/mL com 83,33 % de susceptibilidade. Estes antimicrobianos foram considerados os mais eficazes.

**Palavras-chave.** concentração inibitória mínima, *femA*, *mecA*, *Staphylococcus aureus*, resistência à meticilina.

### ABSTRACT

This study identified *Staphylococcus aureus* and the methicillin-resistant (MRSA) strains in raw milk samples using molecular methods, and their minimum inhibitory concentrations (MIC) were evaluated. Two hundred fifty-one samples of raw milk samples from bulk tanks, collected in the state of Minas Gerais, Brazil were analyzed using polymerase chain reaction (PCR) to investigate the presence of *femA* gene in 278 *S. aureus* isolates. Furthermore, MRSA strains were investigated for detecting *mecA* gene. All of 278 isolates contained the *femA* gene (132 bp), and in 11 samples (3.95 %) the *mecA* gene (533 bp) was identified. The minimum inhibitory concentration against *S. aureus* was determined using enrofloxacin, trimethoprim-sulfamethoxazole, gentamicin, azithromycin, tetracycline, cephalothin, amoxicillin, penicillin G and lincomycin. Enrofloxacin and trimethoprim-sulfamethoxazole showed to be the most effective inhibitors, as this study identified 149 of 161 isolates (92.5 % of susceptibility) with MIC ≤ 4 mg/mL, and 55 of 66 isolates (83.3 % of susceptibility) with MIC ≤ 2 mg/mL, for the first antimicrobial drug and the second one, respectively.

**Keywords.** minimum inhibitory concentration, *femA*, *mecA*, *Staphylococcus aureus*, methicillin resistance.

## INTRODUÇÃO

*Staphylococcus aureus* destaca-se como um dos agentes etiológicos mais frequentemente associados à mastite bovina, fato que representa sério risco para a saúde pública. Além disso, a inflamação da glândula mamária bovina ocasiona problemas de sabor e aroma no leite e seus derivados, menor rendimento na fabricação de queijos e perda de gordura e caseína no soro<sup>1,2</sup>. Existe ainda, o risco de a bactéria chegar aos alimentos já processados, seja por contaminação cruzada, que pode ser de origem animal, principalmente o gado leiteiro, ou pela ação dos manipuladores, na maioria, portadores assintomáticos. Um ponto crítico de controle que deve ser observado é a produção de enterotoxinas (SEs) que, por serem termotolerantes, podem permanecer no produto final após o processamento térmico<sup>3,4</sup>.

A rotina de diagnóstico microbiológico para o *S. aureus* está baseada em culturas bacteriológicas, nas características fenotípicas e morfotintoriais, bem como na sua identificação por técnicas bioquímicas. Estes métodos, porém, possuem baixa sensibilidade, sendo necessária a aplicação de testes mais sensíveis e que tenham maior especificidade e rapidez, como a reação em cadeia da polimerase-PCR, realizada diretamente em isolados bacteriológicos e em materiais clínicos, como o leite<sup>5,6</sup>.

A identificação de *S. aureus* por PCR pode ser feita pela detecção do gene *femA*, que tem como produto uma proteína de 48-50kDa, reconhecida como um fator específico e codificada cromossomicamente neste patógeno, sendo envolvido na estrutura da parede celular bacteriana<sup>2-11</sup>.

Amostras de *S. aureus* resistentes a metilicilina (MRSA) são reconhecidamente um dos principais problemas de infecção hospitalar no homem e em animais. Nos últimos anos, o aumento de estirpes resistentes à metilicilina tornou-se um sério problema clínico e epidemiológico. Mais uma vez, com a utilização da PCR é possível identificar isolados MRSA utilizando a detecção do gene *mecA*<sup>5,10,12</sup>. Considerado padrão ouro para diagnóstico, o gene *mecA* pode ser utilizado como um indicador de virulência dos isolados, uma vez que estirpes MRSA são frequentemente resistentes à maioria dos agentes antimicrobianos, incluindo aminoglicosídeos, macrolídeos, cloranfenicol, tetraciclina e fluorquinolonas<sup>13</sup>. O tipo de resistência dos MRSA é intrínseca, não sendo devida à destruição do antibiótico por lactamases, e sim, por modificações na estrutura-alvo do antimicrobiano.

A utilização de antimicrobianos é um componente importante dos programas de controle da mastite bovina. Assim, a seleção do antimicrobiano apropriado é essencial, tanto do ponto de vista da saúde do animal, quanto da produtividade da glândula mamária; os resultados dos testes de susceptibilidade a antimicrobianos ajudam o médico veterinário clínico na escolha dos medicamentos apropriados<sup>7,14,15</sup>. No caso das infecções estafilocócicas da glândula mamária, porém, a eficiência destes tratamentos é variável (3,6 % a 92 %), segundo Owens et al<sup>16</sup>. Nestes casos, para aumentar a eficiência dos tratamentos destas infecções, a alternativa é a utilização de dosagens maiores que as encontradas nos produtos comerciais. Isto pode ser avaliado, “in vitro”, por meio da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) considerada uma importante ferramenta para o controle das infecções estafilocócicas<sup>17,18</sup>. Este método está padronizado, possui detalhamento técnico bem definido e apresenta a vantagem de fornecer dados quantitativos que podem ser interpretados considerando as características farmacológicas e farmacocinéticas dos antimicrobianos e a concentração mínima a ser alcançada no úbere bovino<sup>15,19-21</sup>.

Este trabalho teve por objetivo identificar por métodos moleculares amostras de *S. aureus* e de MRSA isoladas de leite cru e determinar a concentração inibitória mínima (CIM) como uma contribuição aos estudos das infecções causadas por este micro-organismo.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Amostras de leite

As amostras de leite, de tanques de resfriamento, foram obtidas do Laboratório de Qualidade de Leite-LabUFMG, na Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (EV-UFMG)/Brasil. Foram obtidas 251 amostras de leite cru, procedentes de cinco microrregiões produtoras de leite de Minas Gerais (Central Mineira, Noroeste de Minas, Vale do Mucuri, Região Metropolitana, Vale do Rio Doce). Uma alíquota de 10µl de leite<sup>7</sup> foi plaqueada em placas de ágar seletivo Baird-Parker (BP) (M043 HIMEDIA Laboratories, Índia) suplementado com gema de ovo e de telurito de potássio (LaborClin®). Após este procedimento, as placas foram incubadas a 37 °C durante 24 horas. Após observação de colônias típicas e atípicas para *S. aureus* foi realizada identificação fenotípica com coloração de Gram, teste de coagulase em tubo, hidrólise da uréia e fermentação dos açúcares manitol, trealose, e sacarose<sup>22</sup>. No total de 278

colônias de *S. aureus* foram isoladas com confirmação posterior por teste de genotipagem pela amplificação do gene *femA* em PCR. Os isolados foram inoculados em caldo infusão de cérebro e coração (BHI), com 20 % de glicerol (v/v) e congelados a -20 °C, em tubos eppendorf, em triplicata, para utilização posterior.

### Extração de DNA para amplificação

Os isolados de *S. aureus* obtidos de amostras de leite foram submetidos à extração de DNA pelo método de lavagem alcalina<sup>6,9,23</sup>. O DNA foi quantificado por densidade óptica em espectrofotômetro (NanoDrop® ND-1000 UV-Vis) e mantidos a -20 °C, até utilização. Foram utilizadas amostras de *S. aureus* ATCC 25923 como controle positivo.

### Detecção dos genes *femA* e *mecA* pela PCR Duplex

Segundo Dias<sup>9</sup>, os iniciadores utilizados para a amplificação de fragmento de 132 pb (pares de bases) do gene *femA* foram: fem-A1 5' AAAAAAGCACATAACAAGCG 3' e fem-A2 5' GATAAAGAAGAAACCAGCAG 3'. Para o gene *mecA* foram amplificados fragmentos de 533 pb, usando os iniciadores mec-A1 (5' AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC 3') e mec-A2 (5' AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC 3'). De acordo com metodologia adaptada<sup>9,24</sup> o volume final da reação da PCR duplex foi de 50 µL. Foram utilizados 2,5 µL de tampão 10X (Phoneutria®), 10 µL de dNTP (0,2 mM), 0,25 µL de cada iniciador (25 pmol / L), 2,0 U de Taq polimerase (Phoneutria®) e 5 µL de DNA molde (50-100 ng). A amplificação foi realizada em um termociclador (Mini Cyler, MJ Research), com os seguintes ciclos: desnaturação inicial a 94 °C durante 5 minutos, seguido por 35 ciclos de amplificação (desnaturação a 94 °C durante 1 minuto, hibridação a 57 °C durante 2 minutos e extensão a 72 °C, durante 2 minutos), terminando com a extensão final a 72 °C durante 10 minutos. O tampão de corrida utilizado foi o Tris-borato-EDTA gel (TBE) a 0,5X em gel de agarose a 2 % a correr a 100 volts durante 90 minutos. Como marcador molecular foi utilizado 100 bp DNA Ladder Promega®. O gel de eletroforese foi fotografado usando o programa Image LPix através do aparelho de Biotecnologia Loccus L.Pix® Imagem Molecular.

### Testes de Susceptibilidade aos Antimicrobianos

Foram testados todos os isolados de *S. aureus*, segundo o método de difusão em disco interpretados

segundo CLSI<sup>25</sup>. Foram utilizados os seguintes antimicrobianos (Cecon®): amoxicilina - 10 µg (AMOX), azitromicina - 15 µg (AZIT), cefalotina - 30 µg (CFL), enrofloxacin - 5 µg (ENO), gentamicina - 10 µg (GEN), lincomicina - 2 µg (LIN), penicilina G - 10 UI (PEN), sulfametoxazol + trimetoprima -25 µg (SUT) e tetraciclina - 30 µg (TET).

### Testes CIM - Concentração Inibitória Mínima

Para a determinação da CIM foram adquiridos os mesmos antimicrobianos em pó (Sigma-Aldrich® - E.U.A). Tanto as suspensões, como placas de ágar de Muller-Hinton (HIMEDIA Lab., India), contendo estes antimicrobianos, foram preparadas de acordo com as instruções do CLSI<sup>26</sup>. As concentrações variaram de 0,125 a 256 µg de cada antimicrobiano. Em todos os testes foram utilizadas amostras controle American Type Culture Collection (ATCC): *S. aureus* ATCC 25923, *S. epidermidis* ATCC 12228. Placas sem antimicrobianos foram usadas como controle de crescimento bacteriano.

Os isolados de *S. aureus* foram plaqueados em ágar Baird Parker (HIMEDIA Lab., India) e mantidos a 37 °C por 18-24 horas. Após crescimento 3-5 colônias foram homogeneizadas em 2 mL de PBS estéril (pH 7,2) até turbidez equivalente a padrão 0,5 da escala de McFarland de acordo com CLSI<sup>26</sup>. Cada cultura em suspensão foi transferida para o replicador de Steer<sup>27</sup> e as placas foram inoculadas com 1 µL da suspensão bacteriana, não excedendo em 20 minutos o tempo entre a preparação do inóculo e a incubação por 24 h/37 °C.

A interpretação dos resultados foi de acordo com CLSI<sup>28</sup>. O CIM dos isolados de *S. aureus* foi definido como a concentração mais baixa à qual não foi observado nenhum crescimento bacteriano visível a olho nu. Além disso, as concentrações capazes de inibir 50 % e 90 % dos isolados, designados CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub>, respectivamente, foram determinadas conforme CLSI<sup>28</sup>. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

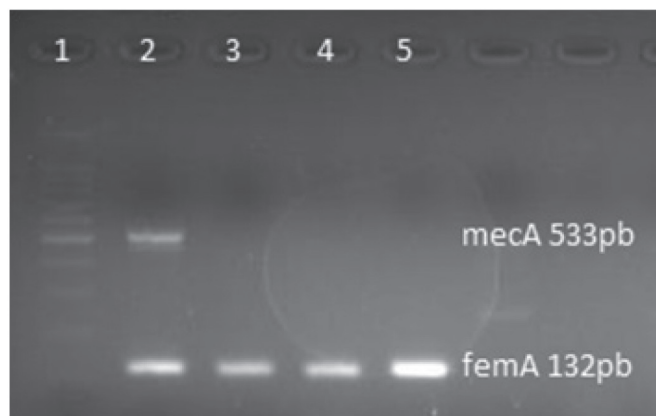
### ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados de susceptibilidade obtidos dos testes de difusão em ágar foram tabulados de acordo com CLSI<sup>25</sup> e correlacionados pelo qui-quadrado ( $\chi^2$ ) e teste de Fisher através do programa Graph Pad versão 3.06,32-2003. Comparações com valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos. Os testes de MIC para susceptibilidade do *S. aureus* aos antimicrobianos testados foram avaliados de acordo com CLSI<sup>19,28</sup>.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Detecção dos genes *femA* e *mecA*

Das 251 amostras de leite cru foram obtidas 278 colônias isoladas de *S. aureus* identificadas por métodos fenotípicos e microbiológicos<sup>22</sup>. Todas as 278 colônias (100 %) foram positivas para a presença do gene *femA* por apresentarem um produto amplificado de 132 pb (Figura 1). Destes, foram encontradas por PCR 11 amostras (3,95 %) que apresentaram um produto amplificado de 533 pb correspondente ao gene *mecA*. Deste total, sete isolados foram obtidos a partir da região metropolitana de Belo Horizonte/MG, um isolado a partir da região Central Mineira/MG, um isolado da região do Vale do Rio Doce/MG, um isolado da Região Noroeste/MG e um isolado do Vale do Mucuri/MG. Pela pesquisa do gene *mecA*, estas amostras foram consideradas resistentes à meticilina ou MRSA.



**Figura 1.** Reação em cadeia pela polimerase-PCR - para detecção dos genes *femA* e *mecA*

Canaleta 1- PAD-padrão de peso molecular 100 pb; Canaleta 2-gene *mecA* 533pb + *femA* 132pb; Canaletas 3, 4 e 5- apenas gene *femA* (*Staphylococcus aureus*). Testes visualizados sob luz U.V. em gel de agarose 2 %, corados com brometo de etídio (1mg/mL). Gel fotografado com a utilização do programa LPix Image através do aparelho L.Pix Molecular Imaging Loccus Biotecnology®

O trabalho de Mehrotra et al<sup>29</sup> mostrou uma correlação de 100 % entre a presença do gene *femA* e os isolados de *S. aureus* MRSA, semelhantes a este trabalho uma vez que, o gene *femA* é reconhecido como um fator naturalmente codificado no cromossomo do *S. aureus*, tem como produto uma proteína de 48 kDa, está relacionada com o metabolismo da parede celular bacteriana e pode ser encontrado em culturas

de crescimento ativo. Dias et al<sup>10</sup> após analisarem 200 amostras obtidas de leite de outras regiões leiteiras de Minas Gerais para detecção do gene *femA* por PCR diretamente do leite cru, encontraram 145 (72,5 %) amostras positivas para a presença de *S. aureus*.

MRSA estão presentes em diversas propriedades produtoras de leite, distribuídas em diferentes regiões, com diferentes percentuais<sup>31</sup> e a presença do gene *mecA* é considerada um pré-requisito para a identificação de *S. aureus* MRSA de acordo com Mehrotra et al<sup>29</sup> que ao examinaram 19 linhagens obtidas de amostras de MRSA conhecidas, encontraram 18 (94,73 %) eram positivas para a presença do gene *mecA*, responsável pela resistência à meticilina.

No presente trabalho, 11 amostras de *S. aureus* (3,95 %), apresentaram um produto amplificado de 533 pb correspondente ao gene *mecA* e foram consideradas resistentes à meticilina ou MRSA, resultados semelhantes segundo segundo Moon et al<sup>32</sup> que, ao avaliarem 140 propriedades produtoras de leite na Korea, identificaram 696 amostras de *S. aureus* e destes, 19 (2,7 %) foram resistentes à meticilina. Por outro lado, em Minas Gerais, Dias et al<sup>10</sup> encontraram 18 amostras de leite (11,0 %) 200 isolados de *S. aureus* como portadoras do gene *mecA*. Na obra de Huletsky et al<sup>33</sup>, testes feitos com uma variedade de estirpes de *Staphylococcus* spp. e *S. aureus*, pelo método de PCR multiplex, detectaram que em 1.657 estirpes testadas, 1636 (98,7 %) foram identificados como MRSA.

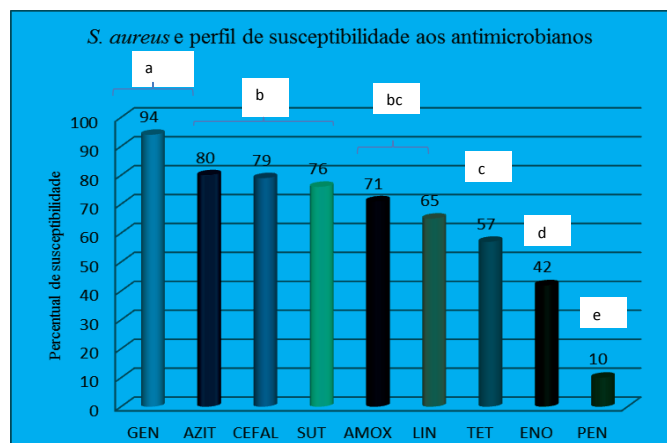
A resistência dos *Staphylococcus* spp. à meticilina pode ser mediada por um determinante que transporta o gene *mecA* estrutural, que por sua vez, codifica uma proteína de ligação à penicilina (PBP) ligada à afinidade da PBP para beta-lactâmicos<sup>33,34</sup>. O provável uso indiscriminado dos antimicrobianos disponíveis no mercado e a alta capacidade adaptativa dos *S. aureus* podem possibilitar a seleção de linhagens resistentes a diversos antimicrobianos<sup>14</sup>, o que justifica os diferentes percentuais de amostras de MRSA positivos encontrados. Da mesma forma, amostras clínicas de *S. aureus* ou estafilococos coagulase negativos (SCN) também podem transportar o gene *mecA*, muitas vezes sem expressá-lo<sup>34</sup>.

### Teste de Concentração Inibitória Mínima-CIM

Inicialmente foram realizados testes de difusão em ágar de acordo com CLSI<sup>25,26</sup> em todas as amostras de *S. aureus* isoladas de leite cru para conhecer o nível de susceptibilidade aos diferentes antimicrobianos.

Das 278 colônias de *S. aureus* isoladas, foram

encontradas 263 amostras (94,0 %) susceptíveis a gentamicina; 222 (80,0 %) a azitromicina; 220 (79,0 %) a cefalotina; 212 (76,0 %) a sulfametoxazol-trimetoprima (SUT); 197 (71,0 %) a amoxicilina; 181 (65,0 %) a lincomicina; 159 (57,0 %) a tetraciclina; 117 (42,0 %) a enrofloxacina e 29 amostras (10,0 %) susceptíveis a penicilina (Figura 2).



**Figura 2.** Perfil de susceptibilidade (método de difusão em ágar) frente aos antimicrobianos testados das colônias de *S. aureus* isoladas a partir de leite de cinco microrregiões do estado de Minas Gerais. a; b; c; d; e; com  $p < 0,0001$ ;

Assim as provas de concentração inibitória mínima foram realizadas nos isolados resistentes onde CIM foi definida como a menor concentração em que não foi observado nenhum crescimento bacteriano visível a olho nu<sup>25</sup>. Este teste apresenta a vantagem de fornecer dados quantitativos<sup>19</sup> sendo que CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub> indicam a menor concentração capaz de inibir o crescimento de 50 % e 90 % dos isolados, respectivamente (Tabela 1).

Para analisar o perfil de susceptibilidade das amostras, pelo método CIM, os dados foram confrontados com parâmetros de CLSI<sup>28</sup>. Somente com a utilização deste foi possível fazer a caracterização das amostras como sensível (S) ou resistente (R) frente ao antimicrobiano testado.

Portanto, os parâmetros para avaliar a resposta das amostras às diferentes concentrações, pelo método CIM, foram: para amoxicilina,  $\leq 0,25$  (S) a  $\geq 0,5$   $\mu\text{g/mL}$  (R); azitromicina,  $\leq 2,0$  (S) a  $\geq 8$   $\mu\text{g/mL}$  (R); cefalotina,  $\leq 8,0$  (S) a  $\geq 32$   $\mu\text{g/mL}$  (R); enrofloxacina,  $\leq 4,0$  (S) a  $\geq 16$   $\mu\text{g/mL}$  (R); gentamicina,  $\leq 4,0$  (S) a  $\geq 16$   $\mu\text{g/mL}$  (R); lincomicina,  $\leq 0,5$  (S) a  $\geq 4$   $\mu\text{g/mL}$  (R); penicilina G,  $\leq 0,12$  (S) a  $\geq 0,25$   $\mu\text{g/mL}$  (R); sulfametoxazol + trimetoprima (SUT)  $\leq 2,0$  (S) a  $\geq 4$   $\mu\text{g/mL}$  (R) e tetraciclina,  $\leq 4,0$  (S) a  $\geq 16$   $\mu\text{g/mL}$  (R).

**Tabela 1.** Concentração inibitória mínima-CIM das amostras de *S. aureus* e respostas de susceptibilidade às diferentes concentrações dos agentes antimicrobianos testados

Antimicrobiano (nº amostras testadas)	Ponto de corte $\mu\text{g/mL}^1$	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )											
		Concentrações dos antimicrobianos testados e											
		número de isolados susceptíveis encontrados em cada concentração											
		0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256
Enro (161)	$\leq 4$	23	29	24	28 <sup>A</sup>	32	13 <sup>B</sup>	12					
Sut (66)	$\leq 2$					56 <sup>A</sup>	5 <sup>B</sup>	1	1			3	
Genta (15)	$\leq 4$	1	2	2	2	2 <sup>A</sup>	3		1	1 <sup>B</sup>	1		
Azit (56)	$\leq 2$			7	18	16 <sup>A</sup>	2	2	6 <sup>B</sup>	5			
Tetra (119)	$\leq 4$			39	36 <sup>A</sup>	6	5		3	3	3	18 <sup>B</sup>	6
Cefalo (58)	$\leq 8$	8	9	5	7 <sup>A</sup>	3	1	5	8	9 <sup>B</sup>	3		
Amox (81)	$\leq 0,2$		30	17 <sup>A</sup>	13	8	8 <sup>B</sup>	4			1		
Pen G (249)	$\leq 0,12$	46	22	38	32 <sup>A</sup>	27	16	5	18	18	10 <sup>B</sup>	11	6
Linco (97)	$\leq 0,5$		1	12	26	11 <sup>A</sup>	4	6	12	20 <sup>B</sup>	1		4

Antimicrobiano: Enro = enrofloxacina; Sut = sulfametoxazole + trimethoprim; Genta = gentamicina; Azit =azitromicina; Tetra = tetraciclina; Cefalo =cefalotina; Amox =amoxicilina; Pen G = penicilina G 10 UI; Linco =lincomicina; 1 = Ponto de corte interpretativo de susceptibilidade<sup>28</sup>; A = CIM<sub>50</sub> = Concentração que inibiu 50% das amostras testadas; B = CIM<sub>90</sub> = Concentração que inibiu 90% das amostras testadas<sup>19</sup>

Enrofloxacin e o sulfametoxazol+trimetoprima apresentaram atividade inibitória (CIM<sub>90</sub>) para os isolados de *S. aureus*, em concentrações que variaram entre 1-4 µg/mL e 2-4 µg/mL, respectivamente. Em contraste, os antimicrobianos menos efetivos foram azitromicina com CIM entre ≥ 2 - > 16 µg/mL; cefalotina com CIM entre ≥ 1 - > 32 µg/mL; gentamicina e lincomicina com CIM entre ≥ 2 - > 32 µg/mL; a amoxicilina com CIM entre ≥ 0,5 - > 64 µg/mL; a penicilina G com CIM entre ≥ 1 - > 64 µg/mL e a tetraciclina com CIM entre ≥ 1 - > 128 µg/mL, necessitando de altas concentrações para inibir o crescimento de isolados de *S. aureus*.

Os resultados de susceptibilidade à enrofloxacin são semelhantes aos descritos por outros autores<sup>15,18,35,36</sup> que observaram uma CIM ≥ 2 µg/mL para a enrofloxacin e susceptibilidade de 83 % de isolados bovinos de infecções mamárias causadas por *S. aureus*. Por outro lado, o perfil de susceptibilidade dos isolados de *S. aureus* frente à gentamicina variou de 83 a 100 % com CIM = 0,5 µg/mL, enquanto que frente à associação sulfametoxazol+trimetoprima (SUT) esta susceptibilidade foi de 97,3 %. Desta maneira, pode-se considerar que nestas concentrações estes antimicrobianos seriam mais efetivos para o tratamento da mastite bovina estafilocócica.

Quanto à tetraciclina, além de apresentar um CIM<sub>90</sub> de 128 µg/mL foi possível perceber a presença de linhagens frente aos quais o antimicrobiano foi efetivo somente na concentração de 256 µg/mL. Uma possível explicação é a que os isolados remanescentes podem ter utilizado o mecanismo de efluxo ou outro, onde proteínas citoplasmáticas protegeram o ribossomo bacteriano da ação das tetraciclinas permitiram que a síntese proteica prossiga normalmente<sup>37,39</sup>.

Os isolados de *S. aureus* foram resistentes à amoxicilina, penicilina e lincomicina, apresentando CIM<sub>90</sub> = 4 µg/mL, CIM<sub>90</sub> = 64 µg/mL e CIM<sub>90</sub> = 32 µg/mL, respectivamente. Neste caso em mais uma vez foi possível perceber a presença de linhagens frente aos quais os antimicrobianos mostraram atividade bactericida em concentrações maiores, que variaram entre 8 e 256 µg/mL. O trabalho de Giannechini et al<sup>35</sup> ao avaliarem *S. aureus* encontraram CIM<sub>90</sub> > 8 µg/mL e 56 % de resistência à penicilina.

Outros trabalhos<sup>15,17,18,36</sup> apontaram resultados de resistência à beta-lactâmicos (em especial a penicilina) entre 31 a 63 % com CIM > 8 µg/mL. Mesmo que os valores absolutos de resistência encontrados por estes

autores não estejam próximos a este trabalho, deve-se ter em mente que as infecções causadas por *S. aureus* são normalmente tratadas com antimicrobianos, cujas dosagens são estabelecidas com base nos resultados de susceptibilidade observados *in vitro*, e em dados farmacológicos da droga usada. Fatores inerentes ao animal podem afetar a concentração efetiva da droga no sitio de ação. O uso de antimicrobianos para tratamento da mastite é um passo importante para o controle da doença, mas o amplo uso de penicilinas na Medicina Veterinária pode favorecer o desenvolvimento de resistência e explicar a maior prevalência de amostras resistentes aos beta-lactâmicos<sup>36,38</sup>.

Testes para determinação da CIM foram realizados<sup>17</sup> para analisar 123 amostras de *S. aureus* bovino e evidenciaram 26 % de resistência à penicilina com CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub> em concentrações de 0,06 a 0,5 µg/mL. Por outro lado, de acordo com Haran et al<sup>18</sup>, após analisarem 101 amostras de leites crus, coletados de tanque, identificaram apenas dois isolados MRSA, sendo 50 % deles resistentes a enrofloxacin e 100 % resistentes à penicilina. Portanto, não existem parâmetros que possam estabelecer quais os percentuais mínimos e máximos de resistência dos isolados de *S. aureus* de casos clínicos de mastites bovinas, frente aos mais diversos antimicrobianos. Tal fato enseja a necessidade de sempre estabelecer o CIM<sub>90</sub>, quando os testes de susceptibilidade a antimicrobianos disponibilizados no mercado apresentem altos índices de resistência, bem como uma menor disponibilidade de produtos para os tratamentos de mastite. Determinado caso a caso, o CIM<sub>90</sub> pode ser uma ferramenta útil para os tratamentos das mastites estafilocócicas, quando não se dispõe de produtos comerciais em baixas concentrações.

## CONCLUSÃO

A identificação de micro-organismos por meio de métodos moleculares é cada vez mais recomendada. No presente estudo, podemos concluir que as amplificações dos genes *femA* e *mecA*, por uma PCR Biplax, mostraram-se úteis para a identificação de *S. aureus* isolados de amostras de leite e devem ser recomendadas como uma alternativa aos métodos bacteriológicos utilizados para o diagnóstico das mastites estafilocócicas.

É conhecida que a presença de amostras MRSA (*mecA*+) representa uma preocupação para a saúde pública, especialmente pela sua presença no leite cru.



Apesar do baixo percentual de MRSA encontrado entre os isolados de *S. aureus*, os resultados forneceram uma visão sobre a presença destes micro-organismos em algumas propriedades das microrregiões analisadas. As autoridades sanitárias devem estar atentas aos casos de multirresistências aos antimicrobianos.

As respostas das mastites causadas por *S. aureus* frente aos tratamentos apresentam resultados variáveis. As infecções causadas por estes micro-organismos são normalmente tratadas com antimicrobianos cujas dosagens são estabelecidas com base nos resultados de susceptibilidade observados *in vitro*, e em dados farmacológicos da droga usada. O perfil de susceptibilidade dos *S. aureus* frente aos antimicrobianos mostram índices de resistência, como observado neste trabalho. Os resultados dos testes de CIM<sub>90</sub> permitem encontrar concentrações mais altas para o uso de antimicrobianos e, assim, aumentar os percentuais de susceptibilidade, como é caso da enrofloxacina e da associação sulfametoxazol+trimetoprima. Pode-se concluir que a CIM<sub>90</sub> é recomendada para a indicação terapêutica dos antimicrobianos e, assim, aumentar a eficiência dos tratamentos das mastites estafilocócicas.

#### AGRADECIMENTOS

Este trabalho contou com apoio financeiro do convênio Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), sob o número 578407/2008-6 e do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), sendo parte do projeto “Pesquisa integrada sobre mastite e qualidade do leite no Brasil”.

#### REFERÊNCIAS

1. Arcuri EF, Brito MAVP, Brito JRF, Pinto SM, Ângelo FF, Souza GN. Qualidade microbiológica do leite refrigerado nas fazendas. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*. 2006;58(3): 440-6.
2. Silva ER, Silva N. Coagulase gene typing of *Staphylococcus aureus* isolated from cows with mastitis in southeastern Brazil. *Can J Vet Res*. 2005;69(4): 260-4.
3. Zecconi A, Hahn G. *Staphylococcus aureus* in raw milk and human health risk. *Bull Int Dairy Fed* 2000;1(345):15-8.
4. Proft T, Fraser JD. Bacterial superantigens. *Clin Exp Immunol* 2003;133(1):299 – 306.
5. Phuektes P, Mansell PD, Browning GF. Multiplex polymerase chain reaction assay for simultaneous detection of *Staphylococcus aureus* and streptococcal causes of bovine mastitis. *J Dairy Sci* 2001;84(5):1140-8.
6. Silva MA. Utilização de PCR multiplex para o diagnóstico de mastite bovina [dissertação de mestrado]. Belo Horizonte (MG):Universidade Federal de Minas Gerais;2008.
7. Costa GM. Mamite bovina em rebanhos leiteiros da região sul do Estado de Minas Gerais [tese de doutorado]. Belo Horizonte (MG):Universidade Federal de Minas Gerais;2008
8. Andrade APC. Identificação bioquímica, molecular e pesquisa de genes codificadores de enterotoxinas de *Staphylococcus* spp. isolados de queijo coalho [dissertação de mestrado]. Fortaleza (CE): Universidade Federal do Ceará;2009.
9. Dias NL. Identificação de *Staphylococcus aureus*, avaliação do seu potencial enterotoxigênico e resistência a metilicina pela técnica de PCR em amostras de leite da microrregião de Sete Lagoas-MG, 2009 [dissertação de mestrado]. Belo Horizonte (MG): Universidade Federal de Minas Gerais;2010.
10. Dias NL, Silva DCB, Oliveira DCBS. Detecção de genes de *Staphylococcus aureus*, enterotoxinas e de resistência à metilicina em leite. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2011;63(1):1547-52.
11. Ângelo FF. Detecção de genes de exotoxinas em *Staphylococcus* spp. isolados de leite cru refrigerado e de leite de vacas com mastite [tese de doutorado]. Viçosa (MG): Universidade Federal de Viçosa;2010.
12. Lee JH, Jeong JM, Park YH. Evaluation of the methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)-screen latex agglutination test for detection of MRSA of animal origin. *J Clin Microbiol*. 2004;42(6):2780-2.
13. Sader HS, Fritsche TR, Jones RN. Antimicrobial activities of ceftaroline and ME1036 tested against clinical strains of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52(3):1153-5.
14. Cardoso HFT, Costa GM, Silva N. Susceptibilidade a antimicrobianos de *S. aureus* isolados de leite bovino no Estado de Minas Gerais. *Rev Bras Med Vet Zootec*. 2000;22(5):199-206.
15. Brito MAVP, Brito JRF, Silva MAS. Concentração mínima inibitória de dez antimicrobianos para amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de infecção intramamária bovina. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2001;53(5):531-7.
16. Owens WE, Ray CH, Washburn PJ. Effect of selected antibiotics on *Staphylococcus aureus* present in milk from infected mammary glands. *J Vet Med*. 1993;40(7):508-14.
17. Rubin JE, Ball KR, Chirino-Trejo M. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from various animals. *Can Vet J*. 2011;52(1):153-7.
18. Haran MKP, Godden SM, Boxrud D. Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus*, including Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*, isolated from bulk tank milk from Minnesota Dairy Farms. *J Clin Microbiol*. 2012;50(3): 688-95.
19. Salvarani FM, Pinto FF, Lobato FCF. Concentração inibitória mínima (CIM) de oito antimicrobianos frente a isolados de *Streptococcus suis*. *Braz J Vet Res Anim Sci*. 2008;45(1):41-7.
20. Neves MC, Costa JRV, Vieira VC. Resistência aos antimicrobianos e análise da diversidade genética de *Staphylococcus aureus* por PCR-rapd. *Arq Inst Biol*. 2010;77(4):575-82.
21. Kalmus P, Aasmae B, Kärssin A. Udder pathogens and their resistance to antimicrobial agents in dairy cows in Estonia. *Acta Vet Scand*. 2011;53(4):1-7.

22. Quinn PJ, Carter ME, Markey BK. Clinical veterinary microbiology. London:Wolfe; 1994.
23. Cremonesi P, Castiglioni B, Malferrari G. Technical Note: Improved for rapid DNA extraction of mastitis pathogens directly from milk. *J Dairy Sci*. 2006;89(1):163-9.
24. Silva ER. Genotipagem e avaliação do potencial enterotoxigênico de amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de mastite caprina e bovina [tese de doutorado]. Belo Horizonte (MG): Universidade Federal de Minas Gerais;2004.
25. CLSI-Clinical and Laboratory Standards Institute. Methodology of testing antimicrobial sensitivity by dilution for aerobic bacteria growth: norma aprovada. (Substituição da norma A5 vol. 20, n. 2). Sexta edição. M7-A6. 2003; 23(2).
26. CLSI-Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial- Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 15º suplemento informativo (Substituição da norma M100-S14, vol. 24). 177 p. M100-S15. 2005; 25(1).
27. Carvalho FG. Colonização e identificação de *Streptococcus grupo mutans* e *Candida spp.* em lesões de cárie associadas ou não a Síndrome da Cárie de mamadeira [dissertação de mestrado]. Araraquara (SP): Universidade de São Paulo;2005.
28. CLSI-Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 20º suplemento (Substituição da norma M100-S19. v. 29, n. 3). 180p. M100-S20. 2010; 30(1).
29. Mehrotra M, Wang G, Johnson WM. Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. *J Clin Microbiol*. 2000;38(3):1032-5.
30. Kobayashi IN, Wu H, Kojima K. Detection of *mecA*, *femA*, and *femB* genes in clinical strains of staphylococci using polymerase chain reaction. *Epidemiol Infect*. 1994;1(113): 259-66.
31. Nihonyanagi S, Kanoh Y, Okada K, Uozumi T, Kazuyama Y, Yamaguchi T, et al. Clinical usefulness of multiplex pcr lateral flow in MRSA detection: a novel, rapid genetic testing method. *Inflamm*. 2012;35(3):927-34.
32. Moon JS, Lee AR, Kang HM, Lee ES, Joo YS, Park YH, et al. Antibigram and coagulase diversity in staphylococcal enterotoxin-producing *Staphylococcus aureus* from bovine mastitis. *J Dairy Sci*. 2007;90(4):1716-24.
33. Huletsky A, Giroux R, Rossbach V, Gagnon M, Vaillancourt M, Bernier M, et al. New Real-Time PCR assay for rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* directly from specimens containing a mixture of staphylococci. *J Clin Microbiol*. 2004;42(5):1875-84.
34. Sturenburg E. Rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* directly from clinical samples: methods, effectiveness and cost considerations. *Ger Med Sci*. 2009; 7(1):1-19.
35. Giannechini RE, Concha C, Franklin A. Antimicrobial susceptibility of udder pathogens isolated from dairy herds in the west littoral region of Uruguay. *Acta Vet Scand*. 2002;43(1): 31-41.
36. Zafalon LF, Arcaro JRP, Nader Filho A. Investigação de perfis de resistência aos antimicrobianos em *Staphylococcus aureus* isolados na ordenha de vacas em lactação. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2008;67(2):118-25.
37. Pereira-Maia EC, Silva PP, Almeida WB. Tetraciclina e gliciliclinas: uma visão geral. *Quim Nova*. 2010;33(3):700-6.
38. Klein R C. Expressão de genes de virulência de *Staphylococcus aureus* isolados de mastite bovina em resposta à concentrações subinibitórias de antimicrobianos [dissertação de mestrado]. Viçosa (MG): Universidade Federal de Viçosa;2010.
39. Souza MV, Reis C, Pimenta FC. Revisão sobre a aquisição gradual de resistência de *Staphylococcus aureus* aos antimicrobianos. *Rev Patol Trop*. 2005;34(1):27-36.

## Sistema de abastecimento de água do município de Catalão-GO: Avaliação da turbidez, cloração e qualidade bacteriológica

### Water supply system of the city of Catalão-GO: Evaluation of turbidity, chlorination and bacteriological quality

RIALA6/1616

Juliana Cassiano SILVA<sup>1</sup>, Heleno de Paula PONTES<sup>1</sup>, Gabriel José BARBOSA<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Departamento Municipal de Vigilância Sanitária, Secretaria Municipal de Saúde. Praça Aguiar de Paula nº81, Centro, Catalão/GO, Brasil, Tel: 55 (64) 3411-4931. E-mail: jullivet@yahoo.com.br

<sup>2</sup>Universidade Federal de Uberlândia.

Recebido: 19.08.2014 - Aceito para publicação: 30.09.2014

#### RESUMO

A água é uma necessidade vital para qualquer ser vivo e é utilizada para inúmeras finalidades. Em função do uso a que se destina deve apresentar determinadas características de potabilidade. A qualidade da água distribuída no município de Catalão-GO foi avaliada por meio de análise dos parâmetros de turbidez, cloração e análise microbiológica baseando-se nos padrões estabelecidos pela Portaria nº 2.914/2011-MS, e para correlacionar a interferência climática na turbidez e no cloro. Foram coletadas nove amostras semanais, durante os meses de julho a dezembro de 2012. A água foi analisada quanto aos parâmetros de turbidez, cloro, coliformes totais e *Escherichia coli*. Das 216 amostras analisadas, 7,87 % (17) amostras apresentaram cloro abaixo do preconizado em legislação. Em relação à turbidez, 100 % das amostras apresentaram valor <5 UT. Quanto aos coliformes totais e *E. coli*, 100 % das amostras apresentaram resultados satisfatórios quanto à ausência em 100 mL. Não houve correlação entre os níveis de cloro e temperatura ambiente, tampouco entre turbidez e precipitação pluviométrica. Considerando-se o atendimento ao padrão de potabilidade por meio das médias mensais obtidas pelo Departamento de Vigilância Sanitária Municipal de Catalão-GO, o sistema público de abastecimento de água tem atingido níveis satisfatórios de qualidade da água tratada.

**Palavras-chave.** coliformes totais, *Escherichia coli*, precipitação pluviométrica, qualidade da água, temperatura ambiente.

#### ABSTRACT

Water is a vital necessity for any living being and it is used for numerous purposes. Depending on the intended use it must display certain characteristics of potability. This study aimed at evaluating the quality of water supplied in the city of Catalão-GO, by analyzing turbidity, chlorination and microbiological attributes based on the parameters established by Decree nº 2914/2011-Ministry of Health, and to correlate the climate interference on turbidity and chlorine. Nine samples were collected weekly during the months from July to December 2012. The water samples were analyzed for turbidity, chlorine, total coliforms and *Escherichia coli* parameters. Of 216 analyzed samples, 7.87 % (17) showed chlorine below the rate recommended in the legislation. Regarding the turbidity 100 % of samples presented value <5 UT. In analyzing the total coliforms and *E. coli*, 100 % of the samples showed satisfactory results, being absent in 100 mL of sample. No correlation was found neither between chlorine levels and temperature, nor between turbidity and rainfall. Considering that the potability standards have complied with the monthly averages obtained by the Department of Municipal Sanitary of Catalão-GO, the public water supply system has reached the satisfactory quality rates of the treated water.

**Keywords.** total coliforms, *Escherichia coli*, rainfall, water quality, temperature.

## INTRODUÇÃO

A água é um bem público universal de importância fundamental para os seres vivos. Suas propriedades estão relacionadas às necessidades vitais dos indivíduos, desde a composição de líquidos e tecidos, até as funções exercidas em atividades metabólicas e reprodutivas. Dessa forma, a preocupação com a qualidade deste recurso disponibilizado para o consumo humano deve ser prioridade na elaboração dos planos de gestão dos recursos hídricos e abastecimento municipal, questões essenciais para definição de políticas de saúde pública<sup>1</sup>.

As águas superficiais, bem como as dos aquíferos subterrâneos contêm diversas substâncias comuns ao meio ambiente, tais como sais dissolvidos; partículas em suspensão e micro-organismos, que podem provocar danos à saúde das pessoas e portanto, antes de servir ao consumo humano, essas águas necessitam de tratamento que melhore suas características sensoriais, físicas, químicas e bacteriológicas<sup>2</sup>.

Esse processo é desenvolvido nos Sistemas de Abastecimento de Água (SAA), infraestrutura utilizada para conduzir a água dos pontos de captação até a entrada nas redes e reservatórios internos dos domicílios. Para prevenir contra riscos de contaminação, os SAA devem adotar métodos rigorosos de monitoramento contínuo da qualidade da água, garantindo que o sistema opere satisfatoriamente, proporcionando um produto dentro das normas exigidas para o consumo humano<sup>3</sup>.

Segundo a Pesquisa Nacional de Saneamento Básico - PNSB 2008<sup>4</sup>, do total de 5.531 municípios que possuem rede geral de distribuição de água, apenas 87,2 % dos municípios brasileiros distribuem água totalmente tratada, 6,2 % distribuem água parcialmente tratada e, em 6,6 % dos municípios não há nenhum tipo de tratamento. No que diz respeito à existência de instrumento reguladores dos serviços de abastecimento de água, a PNSB 2008 revela que apenas 32,5 % dos municípios brasileiros lançam mão de algum instrumento de regulação. A maioria ocorre nas regiões Centro/Sul, onde aproximadamente 40 % dos municípios regulam o serviço<sup>4</sup>.

A Portaria nº 2.914/2011 do Ministério da Saúde<sup>5</sup> dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. O documento fixa as normas para identificar e avaliar os fatores de riscos associados aos SAA, estabelecendo um conjunto de ações corretivas

pertinentes a serem adotadas para evitar problemas de saúde para a população<sup>6</sup>.

Um dos indicadores utilizados no controle de qualidade da água é a turbidez, expressa por NTU (*Nephelometric Turbidity Units*), medida que representa uma propriedade óptica de dispersão da água na presença da luz. Este fenômeno aumenta com a quantidade de material particulado em suspensão e desta forma, a turbidez é maior à medida que se aumenta a carga de sedimento suspenso<sup>7</sup>.

O emprego da turbidez como indicador da eficiência do tratamento hídrico encontra duas aplicações principais na avaliação da qualidade da água; a primeira trata-se da indicação da remoção de cistos e oocistos de protozoários por meio de filtração e a segunda, do bom condicionamento da água pré-desinfecção, já que partículas em suspensão podem proteger os micro-organismos dos efeitos dos agentes desinfetantes<sup>8</sup>.

O cloro é um desinfetante eficiente e com baixo custo operacional. Assim, embora utilizado principalmente para a função de desinfecção, a cloração quando aliada a outros procedimentos torna-se eficiente na inativação de bactérias, permitindo que a água tratada alcance a especificação de potabilidade quanto aos parâmetros microbiológicos<sup>2</sup>.

A eficiência de um processo de desinfecção é avaliada pela redução do número de organismos patogênicos, sendo inviável econômico e operacionalmente detectar todos os organismos patogênicos presentes na água. Para tornar a avaliação mais segura e menos dispendiosa podem ser utilizados microrganismos indicadores, sendo que o indicador mais preciso de contaminação fecal é a *Escherichia coli*<sup>9</sup>.

Segundo Pinto<sup>9</sup>, a determinação de coliformes totais nas amostras de água distribuída é tida como indicador da integridade do sistema de distribuição, uma vez que estes organismos apresentam taxa de inativação similar ou superior à dos coliformes termotolerantes e de *E. coli*. Por isso, geralmente, tolera-se um determinado percentual de amostras positivas para coliformes totais na água distribuída, contudo, exige-se ausência sistemática de *E. coli* ou coliformes termotolerantes.

Mediante as considerações anteriormente descritas, foi desenvolvido estudo para verificar a eficácia do tratamento feito pela SAA do município de Catalão/GO. Objetivou-se avaliar se a qualidade da água distribuída enquadra-se nos parâmetros estabelecidos pela Portaria nº 2.914/2011-MS<sup>5</sup>. As análises levaram em conta os

aspectos da turbidez, da cloração e microbiológicas, procurando correlacionar a interferência de fatores climáticos sobre as duas variáveis iniciais. Os resultados podem ser utilizados para avaliar sistematicamente e aperfeiçoar as metodologias de controle e preservação da qualidade da água distribuída no município.

## MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de água analisadas foram extraídas do sistema de abastecimento municipal que é abastecido em aproximadamente 90 % pela bacia do Ribeirão Samambaia, localizada ao norte do município (Latitude: -18,1450; Longitude: -47,9420), sendo que a complementação da água utilizada é proveniente de cinco poços artesianos, caracterizando um sistema misto de abastecimento.

Foram coletadas nove amostras semanais, totalizando 216 entre os meses de julho e dezembro de 2012. A água foi analisada quanto aos parâmetros de turbidez, cloro, coliformes totais e *E. coli*. As coletas ocorreram no período da manhã, em residências escolhidas aleatoriamente para assegurar que todos os bairros fossem contemplados.

As coletas foram realizadas seguindo as orientações do Manual de Vigilância Ambiental e Instruções de coleta de água para ensaios laboratoriais<sup>10</sup>. De acordo com o manual, a torneira deve ser completamente aberta, esperando-se aproximadamente três minutos para que a água que esteja no encanamento seja descartada para que, em seguida, seja feita a coleta. Para cada amostra, foi preenchido o termo de coleta de água para consumo humano, contendo informações como: endereço completo, data e hora, coordenadas geográficas, cloro residual livre mg/L, turbidez UT, registro de precipitação pluviométrica nas últimas 24 horas e assinatura dos responsáveis pela coleta.

Para análise de cloro, foi preenchido um frasco de 10 mL, onde posteriormente acrescentou-se uma pastilha do reagente DPD (N,N-dietil-1,4 fenilenodiamino). A solução foi homogeneizada e inserida no colorímetro portátil modelo DR/890 da marca HACH. Após a leitura, o resultado em mg/L foi registrado no termo de coleta. Antes de cada leitura, o aparelho foi zerado com água destilada.

Na avaliação da turbidez, foi preenchido o tubo de 10 mL com a água, que posteriormente foi colocado no aparelho turbidímetro portátil modelo 2100P marca

HACH para a leitura e o resultado, registrado no termo de coleta.

As análises de coliformes totais e *E. coli* foram realizadas pelo Laboratório de Saúde Pública Dr. Giovanni Cysneiros – LACEN/GO. Para coleta das amostras, os procedimentos foram: identificação do frasco estéril disponibilizado pelo LACEN/GO com o número do termo de coleta correspondente; nas residências as torneiras eram completamente abertas por aproximadamente três minutos; intervalo no qual o responsável pela coleta se paramentava com luvas, touca e máscara. Em seguida, realizava-se a limpeza da parte interna e externa da torneira, utilizando-se um algodão embebido em álcool a 70 %. Após essa assepsia, a torneira era aberta novamente para deixar a água escorrer por um minuto, e em seguida, o frasco coletor esterilizado contendo inativador de cloro era preenchido com aproximadamente 200 mL de água, com bastante cuidado para que não houvesse contaminação do gargalo ou da tampa. Posteriormente o frasco era fechado e armazenado em caixa térmica com gelox e encaminhada para o LACEN/GO.

Para as análises de coliformes totais e *E. coli*, a metodologia utilizada foi de substrato cromogênico/enzimático segundo o Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater<sup>11</sup>.

O termo de coleta de água foi digitado no Gerenciador de Ambiente Laboratorial (GAL), sistema ao qual o LACEN/GO tem acesso. Após conferir a amostra o laboratório dentro de aproximadamente 15 dias emite um relatório de ensaios com os resultados das análises e conclusão final com o parecer se a amostra analisada atende aos padrões bacteriológicos de potabilidade estabelecidos pela Portaria nº 2.914/2011<sup>5</sup>.

Os testes de Anderson-Darling e Bartlett foram aplicados, no programa estatístico Action 2.3 (R Development Core Team, 2008)<sup>12</sup>, e a distribuição normal e homogeneidade da variância, respectivamente, foram confirmadas em todas as variáveis. Os dados foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA), utilizando o programa estatístico SISVAR 5.1<sup>13</sup>, num delineamento inteiramente casualizado, em blocos e Teste de Tukey com significância 5 % para comparação de médias.

Os dados meteorológicos foram obtidos através do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET)<sup>14</sup>. Para verificar a correlação entre os níveis de cloro e temperatura ambiente, assim como a correlação entre a turbidez e precipitação pluviométrica, foi realizado

o cálculo do coeficiente de correlação por Postos de Spearman ( $r$ ), com nível de significância de 5 %, obtido pelo programa estatístico Action 2.3<sup>12</sup>.

## RESULTADOS

Segundo a Portaria nº 2.914/2011<sup>5</sup>, é obrigatório a manutenção de no mínimo 0,2 mg/L e no máximo 2,0 mg/L de cloro residual livre no sistema de distribuição. Das 216 amostras analisadas, apenas 7,87 % (17) apresentaram cloro abaixo do preconizado pela legislação. As médias dos níveis de cloro (mg/L) obtidas foram analisadas segundo o cronograma da coleta e os resultados foram organizados nas categorias semanal e mensal, visto que houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) para a interação (Tabela 1).

Comparando os resultados semanais do mês de julho, verificamos que as amostras coletadas na última semana continham a menor média de cloro, ao passo que a segunda semana apresentou a maior concentração deste agente. Para os meses de agosto e setembro notamos que os menores níveis de cloro foram obtidos nas amostras coletadas na quarta semana, e, no mês de setembro, os resultados indicaram que a cloração foi mais intensa nas águas distribuídas na terceira semana.

Em relação às amostras coletadas no último trimestre de 2012, a menor e a maior média de cloro observadas no mês de outubro foram observadas na segunda e na terceira semana respectivamente. Em novembro houve maior concentração de cloro nas amostras coletadas na terceira semana. Quanto às amostras coletadas no último mês da pesquisa, o menor

nível de cloro foi observado na segunda semana.

Expandindo os resultados das amostras semanais dentro do período mensal, foi possível notar que, para a primeira semana de cada mês a média dos níveis de cloro maior foi no mês de julho. De forma contrária o menor nível foi encontrado em dezembro. Em relação às segundas semanas observamos que as maiores e menores médias de concentração de cloro foram encontradas nos meses de julho e outubro, respectivamente.

Para as terceiras semanas, a maior média de cloro registrada ocorreu nas amostras coletadas em setembro e a menor em dezembro. Por fim, na última semana de cada mês, a maior média de cloro foi em julho e a menor em novembro.

A legislação vigente de qualidade da água prevê um valor máximo permitido de turbidez de 5,0 UT em toda a extensão do sistema de distribuição (reservatório e rede)<sup>5</sup>. Das 216 amostras de água analisadas, 100 % ficaram abaixo do limite estabelecido pela norma. Os valores médios de turbidez (UT) foram analisados segundo a interação entre os meses e semanas avaliadas, com diferença significativa ( $p < 0,05$ ) (Tabela 2).

No âmbito das análises semanais, para o mês de julho constatamos que na terceira foi observada a maior intensidade desta propriedade na água das amostras coletadas. Para o mês de agosto notamos que o maior nível de turbidez manifestou-se nas amostras da primeira semana. Quanto ao mês de setembro a turbidez foi maior na quarta semana.

A maior média de turbidez no mês de novembro foi observada na quarta semana. Por fim, no mês de dezembro a maior média de turbidez foi observada nas

**Tabela 1.** Média dos níveis de cloro (mg/L) obtidos a cada semana

Meses	Semanas			
	1	2	3	4
Julho	0,70 bE	0,72 cF	0,70 bE	0,69 aF
Agosto	0,63 bC	0,69 cD	0,69 cD	0,58 aB
Setembro	0,66 bD	0,70 cE	0,74 dF	0,62 aE
Outubro	0,61 bB	0,55 aA	0,62 cB	0,61 bD
Novembro	0,61 cB	0,56 aB	0,63 dC	0,57 bA
Dezembro	0,59 cA	0,57 aC	0,58 bA	0,59 cC

Médias seguidas por letras minúsculas diferentes nas linhas e maiúsculas diferentes nas colunas diferem entre si, pelo Teste de Tukey com 5% de significância

**Tabela 2.** Média dos níveis de turbidez (UT) obtidos a cada semana

Meses	Semanas			
	1	2	3	4
Julho	0,67 bA	0,57 aA	1,32 dF	0,78 cA
Agosto	1,56 dE	0,91 bB	1,13 cC	0,90 aB
Setembro	0,84 aB	1,14 bD	1,25 cD	1,48 dE
Outubro	1,12 bD	1,14 cD	1,11 aB	1,21 dD
Novembro	0,99 aC	1,21 cE	1,02 bA	1,54 dF
Dezembro	1,62 dF	1,06 aC	1,30 cE	1,19 bC

Médias seguidas por letras minúsculas diferentes nas linhas e maiúsculas diferentes nas colunas diferem entre si, pelo Teste de Tukey com 5% de significância

amostras coletadas na primeira semana.

De forma análoga às avaliações da cloração, as amostras coletadas para avaliar a turbidez também foram estratificadas em semanas dentro dos meses devido à interação estatisticamente significativa. Os extremos de manifestação da turbidez nas primeiras semanas foram dezembro com a maior e julho com a menor. No caso das segundas semanas a maior turbidez encontrada ocorreu em novembro e a menor em julho. Já para as terceiras semanas, a maior média de turbidez observada foi em julho e a menor em novembro. Por fim, nas quartas semanas houve maior média de turbidez em novembro e menor em julho.

Das 216 amostras de água analisadas, 100 % apresentaram resultados satisfatórios quanto à ausência em 100 mL de coliformes totais e *E. coli*, ratificando que a água distribuída pelo SAA de Catalão atende a Portaria nº 2.914/2011 quanto aos requisitos de coliformes totais e *E. coli*.

O coeficiente de correlação linear ( $r$ ), e o  $p$ valor entre os níveis de cloro e temperatura ambiente foram -0,67 e 0,15, respectivamente. Dessa forma constatou-se a ocorrência de correlação negativa, embora em termos estatísticos essa observação não seja significativa. Por último, entre turbidez e precipitação pluviométrica,  $r = 0,58$  e  $p$ valor = 0,06, foi identificada uma correlação positiva, porém, sem diferença estatística significativa.

## DISCUSSÃO

Neste estudo observou-se níveis de cloro < 0,2 mg/L em apenas 7,87 % das amostras contrariando com os

estudos realizados por d'Aguila<sup>15</sup> onde das 227 amostras analisadas, 74 (32,5 %) apresentaram cloro < 0,2 mg/L.

Segundo Teixeira et al<sup>2</sup>, das 667 amostras analisadas, 375 (83,5 %) estavam em desacordo com a legislação vigente por apresentarem níveis de cloro residual livre inadequados. Além disso, 124 (33,1 %) dessas amostras apresentaram contaminação por coliformes totais e 34 (9,1 %) por *E. coli*, evidenciando correlação direta entre a deficiência de cloro e a contaminação bacteriológica, fato não comprovado neste estudo, pois, mesmo com cloro residual livre em níveis insatisfatórios verificado em 17 amostras, não houve nenhuma contaminação bacteriológica.

A ausência de contaminação pode ser explicada pelo fato de 100 % das amostras apresentarem turbidez < 5 UT, corroborando com estudos de Souza et al<sup>16</sup> que defendem que a turbidez interfere na eficiência da desinfecção, já que quanto maior a turbidez, menor a eficiência do cloro e consequentemente menor remoção de coliformes totais e *E. coli*.

O INMET<sup>14</sup> registrou as menores temperaturas em 2012 no mês de julho com média de 20,7 °C, sendo que neste mês foram encontradas as maiores médias de concentração de cloro. Meyer<sup>17</sup> ressaltou que este agente e seus compostos são fortes agentes oxidantes. Em geral, a reatividade do cloro diminui com o aumento do pH, e sua velocidade de reação aumenta com a elevação da temperatura, logo o cloro volatiliza mais rápido em altas temperaturas.

Todas as amostras analisadas apresentaram turbidez < 5 UT e ausência em 100 mL de Coliformes totais e *E. coli*. Estes resultados vem de encontro com estudos

realizados por Pádua e Benardo<sup>18</sup> que encontraram uma correlação positiva ( $R^2 = 0,8432$ ) entre a turbidez e o número mais provável de coliformes totais por 100 mL, o que vem reforçar a importância de se produzir água com baixa turbidez nas Estações de Tratamento de Água (ETA) visando diminuir os riscos sanitários da água distribuída à população.

De acordo com os dados obtidos pelo INMET<sup>14</sup> a maior precipitação pluviométrica em 2012 ocorreu em novembro, quando foram registrados 301 mm. Isso comprova uma relação positiva entre turbidez e índices pluviométricos, uma vez que as maiores médias de turbidez foram observadas durante esses trinta dias. Resultados semelhantes foram observados por Teixeira e Senhorelo<sup>7</sup> os quais relataram que a turbidez é provocada por partículas em suspensão e que os altos índices pluviométricos podem carrear partículas de argila, silte, areia, fragmentos de rocha e óxidos metálicos do solo, provocando o aumento da turbidez analisada.

Os resultados também revelaram que nenhuma das amostras apresentou contaminação bacteriológica, com isso acredita-se que os índices de acometimentos de infecções de veiculação hídrica tenderão a limites baixos. Constatação em linha com os resultados obtidos por Kottwitz e Guimarães<sup>19</sup> no município de Cascavel-PR, onde 100 % das amostras de água do SAA municipal atendiam às exigências da legislação vigente quanto à análise bacteriológica.

Por outro lado, esses resultados contrastam com os obtidos por Michelina et al<sup>20</sup> ao estudarem a qualidade microbiológica da água do SAA da região de Araçatuba-SP. Nesse caso os pesquisadores encontraram uma taxa de 17,8 % das amostras contaminadas por coliformes totais e 8,6 % por coliformes termotolerantes. Ao mesmo ponto que d'Águila<sup>15</sup> das 244 amostras de água analisadas, 116 (47,54 %) apresentaram positivas para coliformes totais e 47 (19,26 %) foram positivas para *E. coli*.

Outros trabalhos como Nogueira et al<sup>21</sup> avaliaram a qualidade microbiológica de amostras de água tratada e não-tratada proveniente de comunidades urbanas e rurais na região de Maringá-PR. Os resultados mostraram que o maior número de amostras contaminadas por coliformes totais (83 %) e coliformes termotolerantes (48 %) foram extraídas de fontes de água não tratadas. Os pesquisadores também descobriram que mais de 17 % da água potável tratada continham coliformes, sugerindo tratamento insuficiente ou recrescimento.

Segundo Bastos et al<sup>22</sup> na avaliação da qualidade da água tratada, os coliformes totais têm valor sanitário importante e sua presença pode indicar falha no tratamento, ou possível contaminação pós tratamento ou, ainda, presença de nutrientes em excesso nos reservatórios ou nas redes de distribuição.

Após o tratamento, a reservação deve ser cuidadosa para que a água tratada mantenha as características de potabilidade adquiridas na estação. Os reservatórios devem ser construídos em locais específicos, com materiais adequados e devem receber manutenção periódica, possuir sistema de ventilação e extravasores protegidos para evitar contaminação. Esses reservatórios devem ser submetidos a um controle sistemático da qualidade da água armazenada<sup>22,23</sup>.

## CONCLUSÃO

Destaca-se que, considerando o atendimento ao padrão de potabilidade através das médias mensais obtidas pelo Departamento de Vigilância Sanitária Municipal de Catalão-GO, o sistema público de abastecimento de água tem atingido níveis satisfatórios de qualidade da água tratada.

Os resultados obtidos nessa pesquisa vêm corroborar a importância do tratamento da água e a manutenção das redes de distribuições, bem como a vigilância da qualidade da água, na qual os órgãos públicos são responsáveis. O acompanhamento contínuo da qualidade da água para consumo humano permitirá verificar as mudanças que porventura venham a ocorrer ao longo do tempo e determinar se as projeções destas modificações poderão implicar em algum impacto na saúde dos consumidores.

## REFERÊNCIAS

1. Ramos GDM, Machado Junior HF, Silva VL, Castelan FG, Guerra AF, Fernandes MM, et al. Qualidade microbiológica da água consumida pela população do Distrito do Sana, Macaé, Rio de Janeiro. *Rev Inst Adolfo Lutz*.2008;67(2):100-5.
2. Teixeira ISC, Peresi JTM, Silva SIL, Ribeiro AK, Graciano RAS, Povinelli RF, et al. Solução alternativa coletiva de abastecimento de água (SAC): avaliação da qualidade bacteriológica e da cloração. *Rev Inst Adolfo Lutz*.2012;71(3):514-9.
3. Brasil. Ministério da Saúde- MS. Vigilância e controle da qualidade da água para consumo humano. 1ª ed. Brasília (DF): Ministério da Saúde; 2006.
4. Brasil. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Instituto Brasileiro de geografia e Estatística (IBGE). Pesquisa Nacional de Saneamento Básico. Rio de Janeiro: IBGE; 2008.



5. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria No 2.914, de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 14 dez. 2011. Seção 1, p.39-46.
6. Carmo RF, Bevilacqua PD, Bastos RKX. Vigilância da qualidade da água para consumo humano: abordagem qualitativa da identificação de perigos. *Eng Sanit Amb*.2008;13(4):426-34.
7. Teixeira EC, Senhorelo AP. Avaliação de correlação entre turbidez e concentração de sólidos suspensos em bacias hidrográficas com uso e ocupação diferenciada. *In: XXVII Congresso interamericano de engenharia sanitária e ambiental*, 2000, Porto Alegre.
8. World Health Organization (WHO). Guidelines for Drinking-water Quality.Vol.1. 3ª ed. Geneva,2004.
9. Pinto VG. Análise comparativa de legislações relativas à qualidade da água para consumo humano na América do Sul [dissertação de mestrado]. Belo Horizonte (MG): Universidade Federal de Minas Gerais; 2006.
10. Goiás, Secretaria Estadual de Saúde. Manual de Vigilância Ambiental e Instruções de coleta de água para ensaios laboratoriais. [acesso 2013 Nov 01]. Disponível em: [[http://www.sgc.goias.gov.br/.../arq\\_203\\_arq\\_762\\_manual\\_vig\\_ambiental.doc/](http://www.sgc.goias.gov.br/.../arq_203_arq_762_manual_vig_ambiental.doc/)].
11. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. Standard Methods for the Examination of Water & Wastewater. SMEWW, 21º Ed. Washington (DC): APHA-AWWA-WEF; 2005.
12. The R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing 2013.
13. Ferreira DF. Sistema de análise de variância: versão 4.3. Lavras, Minas Gerais: Departamento de Ciências Exatas da UFLA; 1999.
14. Instituto Nacional de Meteorologia (INMET). Estações Automáticas. [acesso 2013 Out 28]. Disponível em: [[http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=home/page&Page=rede\\_estacoes\\_auto\\_gra](http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=home/page&Page=rede_estacoes_auto_gra)]
15. d'Aguila PS, Roque OCC, Miranda CAS, Ferreira AP. Avaliação da qualidade de água para abastecimento público do Município de Nova Iguaçu. *Cad Saúde Pública*.2000;16(3):791-8.
16. Souza JB, Sartori L, Daniel LA. Influência da cor e turbidez na desinfecção de águas de abastecimento utilizando-se cloro e radiação ultravioleta. *In: XXVII Congresso interamericano de engenharia sanitária e ambiental*, 2000, Porto Alegre.
17. Meyer ST. O uso de cloro na desinfecção de águas, a formação de trihalometanos e os riscos potenciais à saúde pública. *Cad. Saúde Públ*. 1994; 10 (1): 99-110.
18. Pádua VL, Bernardo L. Comparação entre turbidez e distribuição de tamanhos de partículas. *In: 21º Congresso brasileiro de engenharia sanitária e ambiental*, 2001, João Pessoa.
19. Kottwitz LBM, Guimarães IM. Avaliação da qualidade microbiológica da água consumida pela população de Cascavel, PR. *Hig Aliment*.2003;17(113):54-9.
20. Michelina FA, Bronharoa TM, Daré BF, Ponsanoc EHG. Qualidade microbiológica de águas de sistemas de abastecimento público da região de Araçatuba, SP. *Hig Aliment*.2006;20(147):90-5.
21. Nogueira G, Nakamura CV, Tognim MC, Abreu Filho BA, Dias Filho BP. Microbiological quality of drinking water of urban and rural communities. *Rev Saúde Pública*.2003;37(2):232-6.
22. Bastos RKX, Bevilacqua PD, Nascimento LE, Carvalho GR, Silva CV. Coliformes como indicadores da qualidade da água: alcances e limitações. *In: XXVII Congresso Interamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental*. Porto Alegre: Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental, 2000.
23. Barros RTV, Castro AA, Costa AM, Chernicharo LM, Von Sperling E, Moller LM, et al. Manual de saneamento e proteção ambiental para os municípios. Belo Horizonte: Escola de Engenharia da UFMG, 1995.

## Ocorrência de partículas magnéticas em açúcar produzido e comercializado no Estado de São Paulo/Brasil

### Occurrence of magnetic particles in sugar produced and sold in Sao Paulo State/ Brazil

RIALA6/1617

Sonia de Paula Toledo PRADO<sup>1</sup>, Regina Célia Arantes STANCARP<sup>2</sup>, Elaine Marra de Azevedo MAZON<sup>3</sup>, Maria Helena MARTINI<sup>3</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Centro de Laboratório Regional de Ribeirão Preto (CLR VI), Instituto Adolfo Lutz, Rua Minas, 877, Campos Elíseos, CEP 14.085-410, Ribeirão Preto, SP, Brasil, telefone: 16 3625-5046 ramal 214, e-mail: sptprado@ial.sp.gov.br

<sup>2</sup>Centro de Laboratório Regional de Bauru, Instituto Adolfo Lutz, Bauru, SP, Brasil

<sup>3</sup>Centro de Laboratório Regional de Campinas, Instituto Adolfo Lutz, Campinas, SP, Brasil

Recebido: 20.03.2014 - Aceito para publicação: 23.09.2014

#### RESUMO

Este trabalho apresenta os resultados do monitoramento realizado por meio das análises microscópicas para pesquisa e identificação de partículas magnéticas presentes em açúcar cristal produzido e comercializado nas regiões de Ribeirão Preto, Bauru e Campinas/SP. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária por meio da REALI (Rede de Alerta e Comunicação de Riscos em Alimentos) nº 17/2011 solicitou aos Grupos de Vigilância Sanitária a fiscalização e coleta de amostras nas usinas de açúcar após denúncias de consumidores. Sessenta amostras coletadas entre 2011 e 2012 foram analisadas nos Centros de Laboratórios Regionais dessas três regiões, utilizando-se as metodologias de espalhamento da amostra para análise visual (Zamboni, 1986) e de dissolução da amostra (Tec. Nº 945.80-AOAC, 2005). Os resultados foram avaliados segundo as legislações em vigor. Das 41 amostras de 2011, 41,5 % continham partículas magnéticas de até 4,5 mm de comprimento e das 19 amostras analisadas em 2012, 21,1 % continham partículas de até 2,0 mm, as quais indicam falhas nas boas práticas e riscos à saúde, exigindo-se medidas corretivas na produção. É necessária uma legislação que defina padrões de referência e limites para a presença destas partículas, além de maior entrosamento entre indústria, comunidade científica e órgãos reguladores para garantia de alimentos seguros.

**Palavras-chave.** açúcar cristal, partículas magnéticas, análise microscópica, saúde pública.

#### ABSTRACT

This study reports the results of microscopic analysis for detecting and identifying magnetic particles in granulated sugar produced and commercialized in the regions of Ribeirão Preto, Bauru and Campinas of São Paulo State. The National Health Surveillance Agency through the REALI (Alert and Communication of Risks in Foods Network) nº17/2011 requested for the Sanitary Surveillance Groups action for supervising and collecting samples from sugar factories after consumers complaints. Sixty samples collected between 2011 e 2012 were analyzed at the Centers for Regional Laboratories of these three regions. The methodologies of scattering sample (Zamboni, 1986) and of dissolution of sample (AOAC, 2005) were employed for detecting the magnetic particles, and the results were evaluated according to legislations in force. Of 41 samples collected in 2011, 41.5 % contained magnetic particles up to 4.5 mm of length, and of 19 samples analyzed in 2012, 21.1 % contained particles up to 2.0 mm, which indicate fails in good practical of manufacture and potentials health risks, which require corrective measures in production. It is crucial to institute a legislation to set benchmarks and limits for the presence of these particles, and the greater integration among industry, scientific community and regulatory agencies to ensure safe food production.

**Keywords.** granulated sugar, magnetic particles, microscopic analysis, public health.

## INTRODUÇÃO

O Brasil atualmente é o maior produtor mundial de cana de açúcar (*Saccharum* spp.), seguido por Índia, Tailândia e Austrália, sendo o estado de São Paulo o maior produtor nacional, responsável por 53,5 % da produção<sup>1</sup>.

Apesar da grande importância sócioeconômica para o país e para o agronegócio, o setor pode, eventualmente, apresentar maquinário antigo, que propicia a presença de partículas metálicas no produto final, provenientes dos equipamentos utilizados no processamento do açúcar. Segundo Vian<sup>2</sup>, usinas mais antigas como as que surgiram na época do Programa Nacional do Alcool (Proálcool), necessitam de maior manutenção, uma vez que seu parque industrial conta com mais de 30 anos. Através da manutenção preventiva é possível detectar e diagnosticar defeitos nos equipamentos industriais e evitar a ocorrência de prejuízos<sup>2</sup>.

A demanda deste monitoramento surgiu em virtude de inúmeras denúncias e reclamações de consumidores, ocorridas inicialmente no estado de Minas Gerais e depois no estado de São Paulo, relativas à presença de partículas metálicas em açúcar cristal. Após a divulgação pela mídia e da repercussão nacional, a ANVISA/MS, por meio da REALI (Rede de Alerta e Comunicação de Riscos em Alimentos) nº 17/2011, acionou o Grupo Técnico de Alimentos do Centro de Vigilância Sanitária do Estado de São Paulo (CVS/SP), que determinou a todos os Grupos de Vigilância Sanitária (GVS), ações de fiscalização e coleta de amostras para ensaios de microscopia em todas as usinas de açúcar de suas áreas geográficas.

Conforme a Resolução RDC nº 271, de 22/09/2005, da ANVISA/MS<sup>3</sup>, o açúcar pode ser definido como: “sacarose obtida a partir do caldo de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) ou de beterraba (*Beta alba* L.). São também considerados açúcares os monossacarídeos e dissacarídeos, podendo se apresentar em diversas granulometrias e formas de apresentação”. Ainda, essa mesma legislação, no item 6 - Requisitos Gerais, diz que: “Os produtos devem ser obtidos, processados, embalados, armazenados, transportados e conservados em condições que não produzam, desenvolvam e ou agreguem substâncias físicas, químicas ou biológicas que coloquem em risco a saúde do consumidor. Deve ser seguida a legislação de Boas Práticas de Fabricação”.

A Portaria SVS/MS nº 326 de 30/07/1997, que

estabeleceu o Regulamento Técnico sobre as condições higiênico-sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para estabelecimentos produtores/industrializadores de alimentos<sup>4</sup>, no item 3 – Definições, diz que: “Contaminação: presença de substâncias ou agentes estranhos, de origem biológica, química ou física que sejam considerados nocivos ou não à saúde humana”. Atualmente, a RDC nº 14 de 28/03/2014<sup>5</sup>, da ANVISA/MS, que dispõe sobre matérias estranhas macroscópicas e microscópicas em alimentos e bebidas, na letra f) do item X, artigo 4º, Seção III Definições, considera “objetos rígidos, pontiagudos e ou cortantes, iguais ou maiores que 7 mm (medido na maior dimensão), aqueles que podem causar lesões ao consumidor, tais como: fragmentos de osso e metal; lasca de madeira; e plástico rígido”, e na letra g “objetos rígidos, com diâmetros iguais ou maiores que 2 mm (medido na maior dimensão), aqueles que podem causar lesões ao consumidor, tais como: pedra, metal, dentes, caroço inteiro ou fragmentado”. Esta Resolução não dispõe de limites de tolerância para açúcares e derivados e, por se tratar de resolução positiva, não é tolerado qualquer tipo de matéria estranha neste tipo de produto.

Portanto, matérias estranhas que possam estar presentes no açúcar, que alterem macroscopicamente e/ou microscopicamente o produto e o diferem da sua definição, estão em desacordo com as legislações em vigor.

O presente trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a qualidade microscópica de açúcar cristal (embalado e a granel) produzido e comercializado nas regiões de Ribeirão Preto, Bauru e Campinas, por meio da pesquisa de matérias estranhas microscópicas e/ou macroscópicas, conforme a RDC nº 14 de 28/03/2014<sup>5</sup>.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material

Foram analisadas nos Laboratórios do Núcleo de Ciências Químicas e Bromatológicas dos Centros de Laboratórios Regionais (CLR) do Instituto Adolfo Lutz das cidades de Ribeirão Preto, Bauru e Campinas, 18, 6 e 17 amostras, respectivamente, de açúcar cristal embaladas de diferentes marcas e a granel, durante o segundo semestre de 2011. As amostras foram coletadas para fins de análise fiscal, em supermercados e usinas, por equipes de Vigilância Sanitária das respectivas prefeituras, durante um período de três meses.

Durante o Programa Paulista de Análise Fiscal de Alimentos, realizado no segundo semestre de 2012,

também foram analisadas no Núcleo de Ciências Químicas e Bromatológicas do CLR do Instituto Adolfo Lutz de Ribeirão Preto e de Bauru, 16 e 3 amostras, respectivamente, de açúcar cristal embaladas de diferentes marcas, também coletadas pelas equipes de Vigilância Sanitária da região.

### Análise microscópica

A detecção das partículas magnéticas foi realizada por espalhamento da amostra para análise visual (procedimento macroanalítico), segundo Zamboni<sup>6</sup>, assim descrita: “Transferir a amostra para uma bandeja de alumínio. Examinar com uma lupa e separar o material estranho utilizando uma pinça ou espátula. Transferir o material estranho para uma placa de Petri. Examinar ao microscópio estereoscópico. Passar um ímã sob a placa para a identificação da presença de partículas magnetizáveis. Medir as partículas magnetizáveis com régua apropriada. Identificar outras matérias estranhas”.

Também, foi realizado o método por dissolução da amostra e filtração (procedimento microanalítico), de acordo com Official Methods of Analysis of AOAC, técnica nº 945.80<sup>7</sup>. Para a separação das partículas magnéticas das outras matérias estranhas, utilizou-se um ímã. As medições foram feitas utilizando-se micrômetro de ocular em microscópio estereoscópico, conforme WHO<sup>8</sup> e, utilizadas a Portaria nº 326/1997, da SVS/MS<sup>4</sup> e a Resolução RDC nº 14/2014, da ANVISA/MS<sup>5</sup>, para a interpretação dos resultados.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com a revogação da Resolução RDC nº175/2003<sup>9</sup>, em 28/03/2014, e sendo as análises desta pesquisa realizadas em data anterior, os resultados foram apresentados na Tabela 1 de acordo com a Resolução em vigor (RDC nº 14/2014, da ANVISA/MS<sup>5</sup>) e comparados com a RDC nº 175/2003<sup>9</sup> e a Portaria 326/1997<sup>4</sup>.

Das 41 amostras analisadas em 2011, 41,5 % continham partículas magnéticas de até 4,5 mm de comprimento sendo que 15 (36,6 %) referiam-se à amostras embaladas e 26 (63,4 %) à amostras a granel, sendo verificado, porém, que os resultados das análises não foram influenciados pelo tipo de embalagem dos açúcares.

Das 19 amostras embaladas de diferentes marcas coletadas para análise fiscal durante o Programa Paulista de 2012 em Ribeirão Preto e Bauru, 21,1 % continham partículas magnéticas de até 2,0 mm de comprimento e uma continha um inseto inteiro morto (formiga), além das partículas magnéticas, estando em desacordo com a Resolução RDC nº 14/2014, da ANVISA/MS<sup>5</sup> (Tabela 1).

Foram também observadas nas amostras analisadas, matérias estranhas macroscópicas indicativas de falhas das Boas Práticas como fragmentos de insetos não reconhecidos como vetores mecânicos, fragmentos de vegetais, matéria carbonizada e outros grânulos de formato irregular e coloração branca, provavelmente

**Tabela 1.** Frequência de amostras de açúcar cristal embaladas e a granel em desacordo com as legislações em vigor e revogada, quanto à presença de partículas magnéticas

Município	Legislações					
	RDC nº 14/2014		RDC nº 175/2003 <sup>*</sup> Portaria nº 326/1997		Portaria nº 326/1997	
	<i>Amostras embaladas e a granel</i>		<i>Amostras embaladas</i>		<i>Amostras a granel</i>	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Ribeirão Preto	9	15,0	5	8,3	4	6,7
Campinas	9	15,0	3	5,0	6	10,0
Bauru	3	5,0	3	5,0	0	0
<b>Total</b>	<b>21</b>	<b>35,0</b>	<b>11</b>	<b>18,3</b>	<b>10</b>	<b>16,7</b>

\*Legislação revogada (RDC nº 175/2003, da ANVISA/MS); n: número de amostras; %: porcentagem de partículas magnéticas

resultante de falhas durante o processo de clarificação do caldo de cana (Figura 1).

Na época de realização desse estudo utilizou-se a Resolução RDC nº 175/2003, da ANVISA/MS<sup>9</sup> que considerava impróprios para o consumo humano somente os produtos que apresentassem matéria prejudicial à saúde humana, como insetos ou outros animais reconhecidos como vetores mecânicos, tais como baratas, moscas, rato/ratazana, pombos e morcegos, vivos ou mortos, inteiros ou em partes; excrementos; objetos rígidos, pontiagudos e/ou cortantes e parasitos, por causarem agravos à saúde do consumidor. Já a Portaria nº 326/1997, da SVS/MS<sup>4</sup> estabelece como apto para o consumo humano o alimento que atende ao padrão de identidade e qualidade pré-estabelecido, nos aspectos higiênico-sanitários e nutricionais, e define como contaminação a presença de substâncias ou agentes estranhos, de origem biológica, química ou física que sejam considerados nocivos ou não para a saúde humana. Para as amostras a granel coletadas nas usinas de beneficiamento aplicou-se somente a Portaria nº 326/97 uma vez que a RDC nº 175/2003<sup>9</sup> aplicava-se apenas a alimentos em suas embalagens originais íntegras.

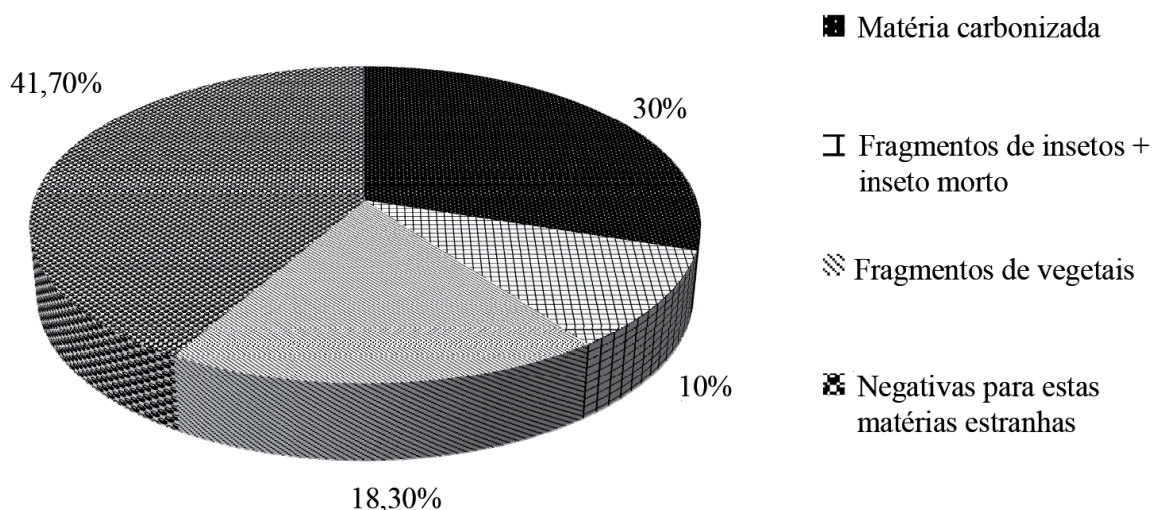
Com a publicação da RDC nº 14 em 28/03/2014<sup>5</sup> foi estabelecido às disposições gerais para avaliar

a presença de matérias estranhas macroscópicas e microscópicas, indicativas de riscos a saúde humana e/ou as indicativas de falhas na aplicação das boas práticas na cadeia produtiva de alimentos e bebidas, embaladas ou a granel, fixando seus limites de tolerância.

Partículas magnéticas presentes no açúcar são provenientes de partes metálicas de equipamentos de processo, as quais, além de indicar falhas nas boas práticas, podem representar riscos à saúde. Segundo dados da literatura, objetos rígidos e/ou cortantes com dimensões acima de 7 mm podem provocar lesões por dilaceração, perfuração e levar à possível infecção secundária no trato digestivo<sup>10</sup>. As partículas menores que 7 mm representam possível risco para grupos especiais, tais como crianças e idosos, exigindo medidas corretivas na produção do alimento<sup>10</sup>. As partículas magnéticas encontradas no presente estudo (medidas sempre em sua maior dimensão), indicam riscos à saúde humana segundo a RDC 14/2014<sup>5</sup> e podem servir de alerta para as usinas produtoras de açúcar quanto à manutenção/substituição de seus equipamentos.

No processo produtivo, são aplicados campos magnéticos de até 8.000 Gauss para retirada de partículas magnéticas, porém, a eliminação completa não é alcançada, principalmente aquelas com tamanhos

## Matérias estranhas



**Figura 1.** Porcentagem de amostras de açúcares cristal embaladas e a granel em desacordo com a Resolução RDC nº 14/2014 em relação a outros tipos de matérias estranhas

inferiores a 1 mm<sup>11</sup>. Segundo Oliveira, Esquiaveto e Silva Jr<sup>11</sup>, o maior impacto da presença destas partículas é a sua ocorrência em alimentos mastigáveis como balas, caramelos e chocolates.

A presença de partículas magnéticas em açúcar cristal é uma irregularidade de interesse sob o aspecto de saúde pública, pois dependendo de seu tamanho e formato o consumidor poderá ser exposto a algum tipo de lesão, além de causar rejeição por parte do consumidor devido à aparência alterada do produto.

A realização desse monitoramento constatou prontamente o problema e possibilitou a ação rápida dos órgãos competentes para as devidas tomadas de decisão, como por exemplo, as ações adotadas por parte da ANVISA/MS, com as publicações da Resolução-RE N° 5481, de 07 de Dezembro de 2011<sup>12</sup>, Resolução-RE N° 138, de 18 de Janeiro de 2012<sup>13</sup> e Resolução-RE N° 378, de 31 de Janeiro de 2012<sup>14</sup> que determinaram a proibição da distribuição e comercialização em todo território nacional, de algumas marcas dos produtos analisados por apresentarem resultados insatisfatórios devido à presença de matérias estranhas, indicando falhas na adoção de boas práticas de fabricação<sup>15</sup>.

Embora a presença de partículas magnéticas seja um problema conhecido pela indústria, são poucos ou quase inexistentes os estudos sobre a pesquisa de matérias estranhas ou mais especificamente sobre partículas magnéticas em açúcares, o que possibilita a utilização destes resultados para realização de novos estudos relacionados à modernização de materiais e equipamentos utilizados no processamento desse produto.

## CONCLUSÃO

A ausência de dados na literatura e de uma legislação que defina padrões de referência e contemple limites para a presença e tamanhos destas partículas, caracteriza uma lacuna de estudos nessa área.

Ações fiscalizadoras mais efetivas e periódicas das autoridades sanitárias deverão ser mantidas, principalmente com relação à manutenção/conservação dos maquinários das usinas utilizados durante o processamento do açúcar.

As denúncias dos consumidores foram confirmadas após a realização das análises microscópicas e comparando os resultados com os dados obtidos no Programa Paulista de Análise Fiscal de Alimentos realizado em 2012 pelos Laboratórios de Ribeirão Preto e Bauru, verificou-se uma

melhoria na qualidade desses produtos.

Sugere-se um maior entrosamento entre indústria, comunidade científica e órgãos reguladores para a garantia de alimentos seguros e saudáveis à população.

## REFERÊNCIAS

1. Indicadores IBGE. Estatística da Produção Agrícola - Janeiro de 2013. [acesso 2013 Jan 10]. Disponível em: [http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa\_201301comentarios.pdf].
2. Vian CEF. Manutenção e análise de equipamentos. [acesso 2013 Dez 15]. Disponível em: [http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01\_136\_22122006154842.html].
3. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC n° 271, de 22 de setembro de 2005. Aprova o Regulamento Técnico para Açúcares e Produtos para Adoçar. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 23 set 2005. Seção 1.
4. Brasil. Secretaria de Vigilância Sanitária. Ministério da Saúde. Portaria n° 326, de 30 de julho de 1997. Aprova o Regulamento Técnico sobre Condições Higiênico-Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 01 ago-1997. Seção 1.
5. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC n° 14, de 28 de março de 2014. Aprova o Regulamento Técnico que estabelece os requisitos mínimos para avaliação de Matérias Estranhas Macroscópicas e Microscópicas em Alimentos e Bebidas e seus limites de tolerância. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 31 mar 2014. Seção 1.
6. Zamboni CQ et al. Manual de análise microscópica de alimentos. [mimeografado]. São Paulo, 1986. p. 63.
7. Association of Official Analytical Chemists (AOAC). Official Methods of Analysis. 18 th ed. Maryland; 2005.
8. World Health Organization (WHO). Procedimentos Laboratoriais em Parasitologia Médica. Tradução: Y. Levanon. 1ª Ed. São Paulo: Livraria e Ed. Santos, 1994; 114p.
9. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC n° 175, de 08 de julho de 2003. Aprova o Regulamento Técnico de Avaliação de Matérias Macroscópicas e Microscópicas Prejudiciais à Saúde Humana em Alimentos Embalados. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 09 jul 2003. Seção 1.
10. Olsen AR. Regulatory action criteria for filth and other extraneous materials. I. Review of hard or sharp foreign objects as physical hazards in food. Regul Toxicol Pharmacol. 1998; 28:181-9.
11. Oliveira DT, Esquiaveto MMM, Silva Junior JF. Impacto dos itens da especificação do açúcar na indústria alimentícia. Ciênc Tecnol Aliment [internet]. 2007; 27(1):99-102. Disponível em: [http://www.scielo.br/pdf/cta/v27s1/a18v27s1.pdf].
12. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RE n° 5481, de 07 de Dezembro de 2011. [acesso 2013 Nov 18]. Disponível em: [http://bvmsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2011/res5481\_07\_12\_2011.html].

13. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução-RENº 138, de 18 de janeiro de 2012. [acesso 2013 Nov 18]. Disponível em: [[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis..anvisa/2012/res0138\\_18\\_01\\_2011.html](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis..anvisa/2012/res0138_18_01_2011.html)].
14. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução-RE Nº 378, de 31 de Janeiro de 2012. [acesso 2013 Dez 11]. Disponível em: [[http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/893a4c004a02721c9fbbbfaa19e2217c/RE\\_n\\_377.pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/893a4c004a02721c9fbbbfaa19e2217c/RE_n_377.pdf?MOD=AJPERES)].
15. Assuntos de Interesse / Ações Fiscais / Proibições, 2011. [acesso 2013 Nov 25]. Disponível em: [<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Alimentos/Assuntos+de+Interesse/Acoes+Fiscais/Proibicoes/Interdicoes+2011>].

## Comportamento de *Escherichia coli* entero-hemorrágica, enteropatogênica e enteroinvasiva em ambrosia

### Behavior of enterohemorrhagic, enteropathogenic and enteroinvasive *Escherichia coli* in ambrosia

RIALA6/1618

Marina de Mattos FERRASSO\*, Camile MILAN, Débora Rodrigues SILVEIRA, Cláudio Dias TIMM

\*Endereço para correspondência: Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, campus Capão do Leão, pr. 34, Pelotas, RS CEP: 96010-900 - Fone: (53) 3275-7216. E-mail: marinaferrasso@gmail.com

Recebido: 11.04.2014 - Aceito para publicação: 30.09.2014

#### RESUMO

Ambrosia é um tipo de doce de leite preparado artesanalmente com leite, ovos e açúcar, muito consumido na América do Sul, e comumente comercializado em feiras livres, supermercados e docerias. A contaminação de alimentos por micro-organismos patogênicos geralmente ocorre durante as etapas de processamento, nos centros de distribuição, no mercado varejista ou na casa do consumidor. Neste trabalho foi avaliado o comportamento dos agentes patogênicos *Escherichia coli*: entero-hemorrágica (EHEC) ATCC 4895, enteropatogênica (EPEC) INCQS 00182 e enteroinvasiva (EIEC) ATCC 43893 em amostras de ambrosia. Aliquotas de ambrosia foram experimentalmente contaminadas com as cepas analisadas no estudo. Foram realizadas pesquisas do micro-organismo inoculado após 0, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20 e 30 dias de estocagem. EHEC foi recuperada de todas as amostras até cinco dias após a contaminação. EPEC sobreviveu na ambrosia e foi isolada até o quarto dia do experimento. A cepa de EIEC conseguiu permanecer viável durante os 30 dias de estocagem. As cepas patogênicas de *E. coli* estudadas mostraram diferente comportamento em ambrosia, mas todos representam perigo potencial para a saúde dos consumidores. Este estudo serve como alerta em relação à necessidade da adoção de medidas higiênico-sanitárias apropriadas durante a produção, embalagem e manipulação da ambrosia.

**Palavras-chave.** doce de leite, *Escherichia coli*, segurança alimentar.

#### ABSTRACT

Ambrosia is a type of Dulce de Leche hand-made with milk, eggs and sugar, widely consumed in South America, and it is commonly sold in street markets, supermarkets and candy shops. Food contamination by pathogenic micro-organisms usually occur during the processing steps, at the distribution centers, at the retail market or in the consumer home. This study aimed at evaluating the behavior of the pathogenic strains of *Escherichia coli* enterohemorrhagic (EHEC) ATCC 43895, enteropathogenic (EPEC) INCQS 00182 and enteroinvasive (EIEC) ATCC 43893 in ambrosia samples. Aliquots of ambrosia were experimentally contaminated by the strains analyzed in this study. Detections of the inoculated microorganisms were done at 0, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20 and 30 days of storage. EHEC was recovered from all of analyzed samples until five days after infection. EPEC survived in ambrosia and it was isolated until the fourth day of the experiment. EIEC strain remained viable during the 30 days of storage. The analyzed pathogenic strains of *E. coli* showed different behavior in ambrosia, but all of them demonstrated potential danger to the consumers health. This study works for warning to adopt appropriate hygiene and sanitary actions during the ambrosia production, packaging and manipulation.

**Keywords.** dulce de leche, *Escherichia coli*, food security.



## INTRODUÇÃO

Segundo a legislação vigente no Brasil, entende-se por doce de leite o produto, com ou sem adição de outras substâncias alimentícias, obtido por concentração do leite sob ação do calor, com ou sem adição de sólidos de origem láctea e/ou creme adicionado de sacarose<sup>1</sup>. A ambrosia é um tipo de doce de leite produzido artesanalmente com leite, ovos e açúcar.

As Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) são causadas pela ingestão de alimentos contaminados por um agente infeccioso específico ou por toxinas por ele produzidas<sup>2</sup>. A maioria dos países com sistemas de notificação de casos de DTA tem documentado aumentos significativos dessas enfermidades ao longo das últimas décadas<sup>3</sup>. Essas enfermidades são responsáveis por altos níveis de morbidade e mortalidade na população em geral, mas principalmente em grupos de risco, como crianças jovens, crianças, idosos e imunocomprometidos<sup>4</sup>.

A ambrosia se enquadra como possível fonte de contaminação para humanos, tendo em vista que sua matéria-prima, leite e ovos, pode ser veiculadora de patógenos e que a sua produção geralmente é artesanal, nem sempre atendendo aos preceitos das boas práticas de fabricação.

*Escherichia coli* são bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, caracterizando-se como bacilos Gram-negativos, não esporulados, capazes de fermentar a lactose com produção de ácido e gás<sup>5</sup>. Essas bactérias podem adquirir atributos específicos de virulência e tornarem-se patogênicas, apresentando diferentes patogenias que são utilizadas para a classificação das cepas em patótipos. *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) está associada a surtos de diarreia, pois coloniza o intestino por meio de adesinas e produz toxinas que induzem a liberação de fluido intestinal<sup>6</sup>. *E. coli* enteropatogênica (EPEC) causa diarreia infantil e é mais frequente em países em desenvolvimento<sup>7</sup>. Possui capacidade de se aderir à mucosa intestinal, mediada por um fator de enteroadesância chamado EAF, e provocar destruição das microvilosidades<sup>8</sup>. O patótipo EHEC (*E. coli* entero-hemorrágica) possui como fator de virulência a produção de citotoxinas que podem provocar colite hemorrágica, síndrome urêmica hemolítica e morte<sup>9,10</sup>. EIEC ou *E. coli* enteroinvasiva é um patógeno intracelular que multiplica-se dentro das células intestinais, provocando ulcerações do cólon que resultam em diarreia sanguinolenta<sup>9,6</sup>. A maioria das cepas de EIEC apresenta diversas

características bioquímicas que as tornam diferentes das demais, entre elas estão a incapacidade de descarboxilar a lisina e a não fermentação ou fermentação tardia da lactose<sup>8</sup>.

As consequências da infecção por *E. coli* justificam a importância de determinar sua capacidade de sobrevivência e comportamento em alimentos, mesmo naqueles que não apresentam as condições ideais para sua multiplicação e desenvolvimento, como doce de leite pastoso e ambrosia. Assim sendo, o objetivo desse trabalho foi avaliar a capacidade de sobrevivência e comportamento de *E. coli* entero-hemorrágica, enteropatogênica e enteroinvasiva em ambrosia.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Produção da ambrosia

A ambrosia utilizada foi preparada com um litro de leite pasteurizado padronizado a 3 % de lipídios, uma dúzia de ovos de galinha (gema e clara) e 500 gramas de açúcar. Os ingredientes foram homogeneizados em um tacho aberto de aço inoxidável e mantidos em fogo baixo, sem mexer, por aproximadamente 3 h. Posteriormente, alíquotas de 25 gramas foram asepticamente pesadas e acondicionadas em sacos estéreis.

### Cepas bacterianas

Foram utilizadas as cepas de *Escherichia coli* EHEC ATCC 43895, EPEC INCQS 00182 (FIOCRUZ) e EIEC ATCC 43893.

### Inóculos

As cepas de EHEC, EPEC e EIEC foram cultivadas em 3 mL de caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI, Acumedia, Lansing, Michigan) a 37 °C por 24 h. Depois, um novo cultivo a partir desse primeiro foi realizado por mais 24 h. Após, foram preparadas diluições seriadas para contagens em ágar para Contagem Padrão em Placas (PCA, Acumedia, Michigan, USA) e para o preparo dos inóculos com concentrações de 10<sup>4</sup> UFC/mL.

### Contaminação experimental de ambrosia e contagem de *E. coli*.

As amostras de 25 g de ambrosia contidas nos sacos estéreis foram contaminadas com 0,25 mL de inóculo, obtendo-se a concentração final de aproximadamente

10<sup>2</sup> células bacterianas por grama de doce. As amostras experimentalmente contaminadas foram homogeneizadas nos sacos em que foram acondicionadas, mantidas a 20 °C e analisadas depois de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20 e 30 dias de estocagem. Como controle negativo, foi utilizada alíquota de 25 gramas de ambrosia não contaminada experimentalmente. Para a contagem, foi utilizada a técnica do número mais provável (NMP)<sup>11</sup>. A cada alíquota de 25 g de ambrosia, foram adicionados 225 mL de solução salina a 0,85 % (m/v) com 20 % de glicose para obtenção da diluição 10<sup>-1</sup>, sendo as demais diluições decimais preparadas a partir dessa. Para semear a diluição 10<sup>0</sup>, 10 mL da diluição 10<sup>-1</sup> foram adicionados a 10 mL de Caldo Lauril Sulfato (Acumedia) concentração dupla. 1,0 mL de cada diluição subsequente foi semeado em uma série de três tubos de ensaio de Caldo Lauril Sulfato. Os tubos foram incubados a 37 °C por 48 h. Para as amostras contaminadas com EHEC e EPEC após a incubação, as diluições que apresentaram formação de gás foram repicadas para tubos de ensaio com 10 mL de Caldo Bile Verde Brilhante (Acumedia) com tubos de Durham e incubadas a 37 °C por 48 h. Os tubos de cada diluição foram contados considerando a formação de gás e os resultados foram obtidos com uso de uma tabela para

NMP. Para as amostras contaminadas com EIEC, devido a não fermentação de lactose e ausência de formação de gás, após a incubação nos tubos com Caldo Bile Verde Brilhante, foram feitas sementeiras de cada diluição em ágar MacConkey (Acumedia) e incubadas a 37 °C por 24 h. O crescimento de colônias foi considerado como positivo para o tubo de origem. Os resultados finais das contagens foram obtidos com uso de uma tabela para NMP. O experimento foi realizado em triplicata.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As populações de *E. coli* EHEC, EPEC e EIEC em amostras de ambrosia experimentalmente contaminadas estão relatadas na Tabela 1. Há poucos trabalhos sobre esse assunto na literatura, sendo esse o primeiro relato publicado sobre o comportamento de *E. coli* em ambrosia.

Apesar da baixa atividade de água e alta concentração de sacarose, a ambrosia mostrou ser um ambiente favorável à sobrevivência de cepas patogênicas de *E. coli*. A cepa de EHEC foi recuperada da ambrosia até cinco dias após a contaminação experimental. A sobrevivência deste patótipo também foi estudada

**Tabela 1.** Contagens de *Escherichia coli* (log NMP/g) em ambrosia experimentalmente contaminada

Tempo de estocagem	EHEC	EPEC	EIEC
Dia 0	1,99 <sup>A</sup> (0,4) <sup>a</sup>	1,66 <sup>A</sup> (0)	2,11 <sup>A</sup> (0,17)
Dia 1	2,22 <sup>A</sup> (1,41)	0,74 <sup>AB</sup> (0,15)	1,59 <sup>A</sup> (0,19)
Dia 2	2,06 <sup>A</sup> (1,13)	0,8 <sup>AB</sup> (0,88)	2,57 <sup>A</sup> (0,85)
Dia 3	1,86 <sup>A</sup> (1,54)	<b>0<sup>Bb</sup></b> (0)	2,72 <sup>A</sup> (0,93)
Dia 4	<b>0,77<sup>A</sup></b> (0,56)	<b>0,32<sup>B</sup></b> (0,45)	<b>2,02<sup>A</sup></b> (1,42)
Dia 5	<b>0,2<sup>A</sup></b> (0,28)	NR	2,42 <sup>A</sup> (1,14)
Dia 10	NR <sup>c</sup>	NR	<b>1,33<sup>A</sup></b> (0,02)
Dia 20	NR	NR	<b>0,45<sup>A</sup></b> (0,64)
Dia 30	NR	NR	0 <sup>A</sup> (0)

<sup>A,B</sup> Médias com letras distintas na mesma coluna diferiram no teste de Tukey ( $P < 0,05$ )

<sup>a</sup> Média de três repetições (desvio padrão)

<sup>b</sup> Log 0 = número mais provável por g (NMP/g) menor que 1

<sup>c</sup> NR = *E. coli* não foi recuperada em nenhuma repetição, considerando o limite de detecção da técnica, que é de 0,3 NMP/g

Valores em negrito = *E. coli* não foi recuperada de todas as repetições

por Timm et al<sup>12</sup>, que avaliaram a capacidade de sobrevivência de *E. coli* O157:H7 em ambrosia. Em ambos os trabalhos, a bactéria manteve-se viável por algum tempo após a contaminação experimental, sendo recuperada até o décimo dia de estocagem. A dose infectante de *E. coli* O157:H7 pode ser menor que 100 células<sup>4</sup>, fator que, aliado à capacidade de sobrevivência desse micro-organismo em ambrosia, colabora para o aumento do risco potencial à saúde do consumidor. EPEC sobreviveu até quatro dias na ambrosia, tendo aumentado sua população no primeiro e segundo dias após a contaminação experimental, o que é indicativo de que a ambrosia proporciona um ambiente favorável para a manutenção desse patotipo, pelo menos nos primeiros dias após a contaminação. A cepa de EIEC mostrou ser capaz de se manter viável por longo período na ambrosia, uma vez que pôde ser recuperada até 30 dias após a inoculação, em uma das três repetições. Embora não tenham sido observadas diferenças estatísticas nas populações de EIEC ao longo do período de estudo, o ambiente propiciado pela ambrosia parece não ter efeitos deletérios importantes sobre este patotipo.

Timm et al<sup>13</sup> coletaram 28 amostras de doce de leite no comércio varejista da cidade de Pelotas, Rio Grande do Sul, e observaram duas amostras (7,1 %) com presença de coliformes termotolerantes. Tais resultados sugerem que esse tipo de alimento pode veicular *E. coli*, considerando que esse micro-organismo é a espécie predominante em culturas de coliformes termotolerantes<sup>14</sup>. Esse dado reforça a importância deste estudo, tendo em vista que demonstra a provável sobrevivência de *E. coli* em doce de leite contaminado de forma não experimental. Embora Timm et al<sup>13</sup> tenham trabalhado com doce de leite pastoso, este é o alimento com características mais próximas da ambrosia no qual já foi reportada a presença de coliformes termotolerantes. Peixoto, Weckwerh e Simionato<sup>15</sup>, por outro lado, avaliaram a qualidade microbiológica de produtos de confeitaria em Ribeirão Preto, São Paulo, no ano de 2008, e observaram contagens de coliformes termotolerantes <3 NMP/g em ambrosia, demonstrando a qualidade satisfatória das amostras analisadas, segundo os padrões estipulados pela RDC nº 12 da ANVISA<sup>2</sup>.

Os três patotipos de *E. coli* avaliados mostraram capacidade de sobreviver em ambrosia, o que constitui um risco à saúde do consumidor, tendo em vista que o doce é comumente estocado no comércio ou mesmo no ambiente doméstico

por vários dias, podendo ser consumido quando os micro-organismos ainda estão viáveis no alimento. É importante ressaltar que boas práticas de manipulação pós-processamento são necessárias para evitar a contaminação desse alimento, principalmente devido à alta atividade de água do produto e o tratamento térmico durante o seu preparo.

## CONCLUSÃO

Os patotipos de *E. coli* estudados mostraram capacidade para sobreviver em ambrosia, representando perigo potencial para a saúde dos consumidores. Os resultados servem como alerta em relação à necessidade da adoção de medidas higiênico-sanitárias apropriadas durante a produção, embalagem e manipulação da ambrosia.

## REFERÊNCIAS

1. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de doce de leite. Portaria nº 354, de 04/09/97. Diário Oficial [da] União, Brasília, 08 set. 1997. Seção I, p. 19685.
2. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa. Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. Resolução-RDC nº12, de 02/01/01, Diário Oficial [da] União, Brasília, 10 jan. 2001. Seção I, p. 45-53.
3. WHO. World Health Organization. *In: Food Safety, Microbiological risks*. 2013b. [acesso 2013 Mai 4]. Disponível em: [http://www.who.int/foodsafety/micro/general/en/index.html].
4. WHO. World Health Organization. *In: Food Safety, Foodborne disease*. 2013a. [acesso 2013 Mai 4]. Disponível em: [http://www.who.int/foodsafety/foodborne\_disease/en/].
5. Meng J, Doyle MP, Zhao T, Zhao S. Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *In: Doyle MP, Beuchat LR., Montville TJ. Food microbiology: fundamental and frontiers*. 2. ed. Washington: ASM; 2001. p.141-77.
6. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol*. 2004; 2:123-40.
7. Torres AG, Zhou X, Kaper JB. Adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* strains to epithelial cells. *Infect Immun*. 2005; 73:18-29.
8. Franco BDGM, Landgraf M. *Microrganismos Patogênicos de Importância em Alimentos*. *In: Franco BDGM, Landgraf M. Microbiologia dos alimentos*. São Paulo: Atheneu; 2003. Cap 4. p. 33-81.
9. Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev*. 1998; 1:142-201.
10. Ordoñez JG e Trabulsi LR. *Escherichia coli* Enteroemorrágica (EHEC) *In: Trabulsi LR, Altherthum F, Gompertz OF, Candeias, JAN. Microbiologia 4ª ed. Rio de Janeiro: Atheneu; 2004. Cap 37. p. 284-8*

11. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. Instrução Normativa nº 62, de 26/08/2003. Diário Oficial [da] União, Brasília, 18 set. 2003. Seção I, p. 14-51.
12. Timm CD, Silva DT, Dias PA, Conceição RCS. Sobrevivência de micro-organismos patogênicos em ambrosia. *Semina: Ciências Agrárias* 2013;34(4):1829-34.
13. Timm CD, Conceição RCS, Coelho FJO, Roos TB, Tejada LS, Quevedo OS, et al. Avaliação microbiológica de doce de leite pastoso. *Rev Inst Adolfo Lutz*. São Paulo. 2007; 66:275-7.
14. Landgraf M. *Microorganismos indicadores*. In: Franco BDGM, Landgraf M. *Microbiologia dos alimentos*. São Paulo: Atheneu; 2003. Cap 3. p.1 27-31.
15. Peixoto D, Weckwerh PH, Simionato EMRS. Evaluation of the microbiological quality of confectionery products sold in Ribeirão Preto – SP. *Alim Nutr*. 2009; 20(4):611-5.

## Avaliação do sistema Petrifilm™ HS na contagem de coliformes em leite pasteurizado

### Evaluation of the Petrifilm™ HS system for counting coliforms in pasteurized milk

RIALA6/1619

Andréia CIROLINI\*, Andressa Mara BASEGGIO, Roberta Juliano RAMOS, Helen da Silva SILVESTRE, Cristhiane Stecanella de Oliveira CATTANI, Cleide Rosana Werneck VIEIRA

\*Endereço para correspondência: Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Rodovia Admar Gonzaga 1346, Itacorubi, CEP 88034-001, Florianópolis, SC, Brasil.  
E-mail: deiacirolini@yahoo.com.br

Recebido: 28.12.2013 - Aceito para publicação: 26.09.2014

#### RESUMO

Os métodos microbiológicos alternativos apresentam vantagens sobre os ensaios convencionais, no entanto é preciso confirmar sua eficácia. O presente trabalho avaliou o sistema Petrifilm™ HS com o sistema Petrifilm™ EC, em comparação com a metodologia convencional na contagem de coliformes a 35 °C em leite pasteurizado. Altas correlações foram encontradas entre as metodologias utilizadas para efetuar a contagem de coliformes a 35 °C. O sistema Petrifilm™ HS para contagem de coliformes a 35 °C em leite pasteurizado mostrou resultados satisfatórios.

**Palavras-chave.** Petrifilm™ HS, Petrifilm™ EC, coliformes, leite pasteurizado.

#### ABSTRACT

Alternative microbiological methods present several advantages over the conventional methodologies, but their efficiency should be confirmed. The present study aimed at analyzing Petrifilm™ HS and Petrifilm™ EC systems, and comparing with the conventional methodology for counting coliforms at 35 °C in pasteurized milk. High correlations were found among these methodologies used for coliforms counting at 35 °C. Petrifilm™ HS system presented satisfactory results for counting coliforms at 35 °C in pasteurized milk.

**Keywords.** Petrifilm™ HS, Petrifilm™ EC, coliforms, pasteurized milk.

## INTRODUÇÃO

O leite é um dos alimentos mais utilizados pela população, devido sua riqueza de nutrientes, sendo, portanto importante garantir sua qualidade. A qualidade microbiológica do leite pasteurizado é influenciada pela matéria-prima e por condições de processamento e pós-pasteurização<sup>1</sup>.

O controle microbiológico em amostras de leite é realizado, principalmente, através da pesquisa de micro-organismos indicadores, os quais podem fornecer informações sobre as condições sanitárias durante produção, processamento e armazenamento, sobre a estimativa da vida de prateleira do produto, assim como sobre a possível presença de patógenos<sup>2</sup>. O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), através da Instrução Normativa nº 62/2011, reúne as normas de produção, identidade e qualidade do leite tipo A, leite pasteurizado e cru refrigerado, além de regulamentar a coleta de leite cru refrigerado e o seu transporte a granel<sup>3</sup>.

Os métodos microbiológicos convencionais empregados para contagem de bactérias utilizam procedimentos que envolvem a homogeneização, diluições, inoculação em placas com ágar específicos para a formação de colônias e contagem. Muitas vezes, outras etapas também precisam ser realizadas para permitir que micro-organismos injuriados por tratamentos físicos e químicos recuperem-se e multipliquem até níveis detectáveis<sup>4</sup>. A técnica do Número Mais Provável (NMP), também chamada de técnica dos tubos múltiplos, é outra maneira bastante utilizada pelos laboratórios de microbiologia de alimentos para estimar a contagem de alguns tipos de micro-organismos, como coliformes totais (a 35 °C), coliformes termotolerantes (a 45 °C), *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*<sup>2</sup>.

Os métodos microbiológicos convencionais, embora sejam confiáveis e eficientes, exigem disponibilidade de tempo e grande trabalho laboratorial<sup>5</sup>. Desta forma, métodos alternativos têm sido desenvolvidos para obter o resultado final em menos tempo. Tais métodos são bastante desejáveis na indústria de alimentos, apesar das técnicas poderem ser mais caras e requererem pessoal com alto nível de treinamento<sup>4</sup>.

Um dos métodos alternativos utilizados para contagem de micro-organismos em alimentos é o sistema Petrifilm™ (3M Company, St. Paul, MN, EUA). O teste

é constituído por um sistema de filme duplo, sendo a base do cartão revestida de polietileno recoberta com meio de cultura desidratado, que contém nutrientes e um agente gelificante solúvel em água fria; o filme superior é transparente, removível e contém um corante indicador<sup>2</sup>. As placas de contagem de coliformes possuem como meio de cultura base o ágar vermelho violeta bile, corante indicador 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) e agentes gelificantes<sup>6</sup>. As placas de Petrifilm™ para contagem de coliformes podem ser classificadas como Petrifilm™ *E. coli* (EC) e Petrifilm™ High Sensitive (HS), sendo que a diferença entre elas é que a do tipo HS permite a inoculação de 5 mL de homogeneizado de alimento<sup>7</sup>, enquanto a do tipo EC permite a inoculação de 1 mL.

A *Association Official Analytical Chemists* (AOAC) e *Association Française de Normalisation* (AFNOR) reconhecem as placas Petrifilm™ EC e HS como método oficial<sup>8,9</sup>.

Alguns aspectos importantes do alimento podem influenciar o desempenho dos métodos alternativos como, por exemplo, o pH, a atividade de água, a presença de conservantes, certos componentes, como lipídios e sais e a cor do alimento<sup>10</sup>.

Baseado na importância de que a presença de coliformes em leite pasteurizado é uma forma de avaliação da qualidade geral do produto, este trabalho teve por objetivos analisar a viabilidade do emprego de um teste de alta sensibilidade (Petrifilm™ HS) e comparar seu desempenho com sistema Petrifilm™ EC e a metodologia convencional para a contagem de coliformes a 35 °C em leite pasteurizado produzido em laticínios do Estado de Santa Catarina – Brasil.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Amostras

Cento e quarenta e uma amostras de leite pasteurizado foram coletadas em seis laticínios com sistema de Inspeção Federal (SIF), do estado de Santa Catarina/Brasil, entre dezembro de 2009 e novembro de 2011. A coleta foi realizada por um fiscal sanitário do Ministério da Agricultura (SFA/SC).

As amostras foram armazenadas em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável e transportadas até o Laboratório de Microbiologia do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina, onde foi realizada a verificação da temperatura com termômetro digital (Wertern®).

### Análises microbiológicas

As embalagens foram homogeneizadas e desinfetadas com álcool 70 %. Foram realizadas diluições decimais, utilizando-se água peptonada (0,1 %) (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, England)<sup>11</sup> e os ensaios de contagem de coliformes a 35 °C foram realizados em sistema Petrifilm™ HS, Petrifilm™ EC e pela metodologia convencional.

### Sistema Petrifilm™ (3M Company, St. Paul, MN, EUA)

As placas Petrifilm™ HS e Petrifilm™ EC foram inoculadas com alíquotas de 5 mL e 1 mL de amostra, respectivamente e incubadas a 35 °C por 24 horas. Decorrido o tempo de incubação, realizou-se a contagem de colônias vermelhas associadas à formação de gás<sup>6</sup>.

### Metodologia convencional

Os ensaios de coliformes a 35 °C foram realizados de acordo com Davidson, Roth e Gambrel-Lenarz<sup>12</sup>, pela técnica de plaqueamento em profundidade. Alíquotas de 1 mL foram inoculadas, em duplicata, em placas de Petri, sendo adicionado ágar vermelho violeta bile (VRBA - Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, England). As placas foram incubadas a 32 °C ± 1 °C por 24 horas e, após este período de incubação, realizou-se a contagem de colônias vermelhas com 5 mm. Para teste confirmatório, três a cinco colônias foram transferidas para tubos contendo caldo bile verde brilhante 2 % lactose (BVB - Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, England), incubados a 35 °C ± 1 °C por 48 horas, sendo que resultado final de coliformes a 35 °C foi expresso a partir da positividade dos tubos, caracterizada pela turvação e pela produção de gás em cada tubo individualmente.

### Análise estatística

Os valores obtidos foram convertidos em forma logarítmica e, na sequência, foram submetidos à análise de regressão. Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa Statistica® 8.0<sup>13</sup>.

Para fins de cálculos estatísticos, sempre que os resultados obtidos foram < 1 UFC/mL, estes resultados foram substituídos pelo número imediatamente inferior, ou seja, 0,9 UFC/mL.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas amostras de leite pasteurizado, a presença de coliformes a 35 °C determinada pelo sistema Petrifilm™ HS foi de 47,5 % (67/141), no sistema Petrifilm™ EC foi de 36,2 % (51/141) e na metodologia convencional foi de 34,7 % (49/141).

O coeficiente de correlação entre os resultados obtidos sistema Petrifilm™ HS e pela metodologia convencional para a contagem de coliformes a 35 °C mostrou uma associação linear positiva (Figura 1).

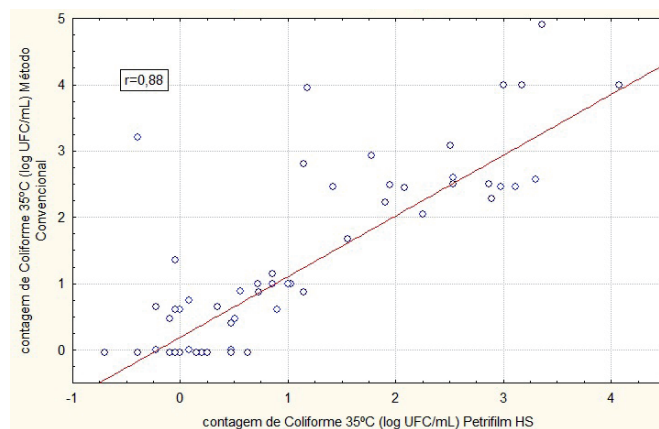
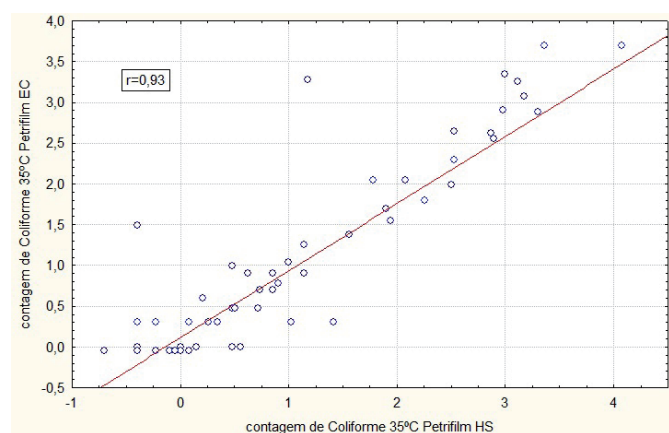


Figura 1. Dispersão dos resultados da contagem de coliformes a 35 °C (log UFC/mL) em leite pasteurizado utilizando Petrifilm™ H Semétodo convencional

A alta correlação encontrada na contagem de coliformes a 35 °C entre o sistema Petrifilm™ HS com a metodologia convencional está de acordo com resultados de Beloti et al<sup>7</sup>, que encontraram coeficiente de correlação de 0,90 entre o sistema Petrifilm™ HS e a técnica do NMP, ao analisarem 145 amostras de água.

Raybaudi et al<sup>1</sup> encontraram diferença significativa na contagem de coliformes em amostras de leite pasteurizado ao compararem o sistema Petrifilm™, o método do NMP e um método proposto por Shertha e Sinha<sup>14</sup>, usando Violet red bile (VRB) e demonstraram que o teste proposto por Shertha e Sinha recuperou maiores níveis de coliformes, seguido do método do NMP. De acordo com os autores, os meios de cultura líquidos oferecem melhores condições de multiplicação para os micro-organismos quando comparado com meios sólidos, o que poderia explicar a melhor recuperação no teste proposto por Shertha e Sinha e o método do NMP.

O sistema Petrifilm™ HS também mostrou uma alta correlação com o sistema Petrifilm™ EC (r=0,93) na contagem de coliformes a 35 °C (Figura 2).



**Figura 2.** Dispersão dos resultados da contagem de coliformes a 35 °C (log UFC/mL) em leite pasteurizado utilizando Petrifilm™ HS e Petrifilm™ EC

Silva et al<sup>5</sup> avaliaram o sistema Petrifilm™ EC em comparação com a técnica dos tubos múltiplos na detecção de coliformes a 35 °C em queijo minas, lingüiça frescal, hortaliças e fubá. O sistema Petrifilm™ EC mostrou-se mais eficiente e prático, sendo um método alternativo adequado para a enumeração de coliformes a 35 °C em alimentos.

Também pode-se observar uma alta correlação ( $r=94$ ) utilizando o método convencional e o sistema Petrifilm™ EC na contagem de coliformes a 35 °C em leite pasteurizado.

Apesar das altas correlações encontradas na avaliação do sistema Petrifilm™ HS para contagem de coliformes a 35 °C em leite pasteurizado, no Brasil, o sistema Petrifilm™ HS não é reconhecido como método oficial pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. No entanto, este sistema apresenta como vantagem uma redução do tempo de 48 horas para a emissão do resultado final em comparação a metodologia convencional. Essa otimização do tempo de análise permite a indústria de alimentos maior agilidade, como, na verificação da qualidade do alimento, na liberação de lotes e na tomada de decisões. Aliado a isso a metodologia alternativa apresenta uma melhor praticidade laboratorial, pela redução do material utilizado em laboratório, preparo dos meios de cultura e do volume de resíduos gerados durante o ensaio. Como destaca Cattani et al<sup>15</sup>, faz-se necessário utilizar metodologias alternativas à convencional na rotina diagnóstica dos laboratórios para obtenção de resultados confiáveis e em menor tempo possível.

## CONCLUSÃO

O sistema Petrifilm™ HS mostrou resultados satisfatórios para o ensaio de coliformes a 35 °C em leite

pasteurizado, podendo ser uma alternativa à metodologia convencional.

## REFERÊNCIAS

1. Raybaudi RM, Zea ZA, Curini G, Martinez A JY. Comparison of a rapid procedure with the MNP and Petrifilm methods for the detection of coliforms in pasteurized milk. *J Rapid Methods Autom Microbiol*.2005;13:11-8.
2. Franco BDGM, Landgraf M. *Microbiologia dos alimentos*. São Paulo: Atheneu; 2005.
3. Brasil. Instrução Normativa nº 62 de 29 de dezembro de 2011. Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade de Leite Tipo A, Cru refrigerado, Leite Pasteurizado, Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, 30 dez. 2011. Seção 1.
4. Forsythe SJ. *Microbiologia da Segurança Alimentar*. 2 ed. Porto Alegre: Artmed; 2013.
5. Silva MP, Cavalli DR, Oliveira TCRM. Avaliação do padrão coliformes a 45°C e comparação da eficiência das técnicas dos tubos múltiplos e Petrifilm EC na detecção de coliformes totais e *Escherichia coli* em alimentos. *Ciênc Tecnol Aliment*.2006;26:352-9.
6. Kornacki JL, Johnson JL. *Enterobacteriaceae, coliforms and Escherichia coli* as quality and safety indicators. In: Downes FP, Ito K. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. American Public Health Association: Washington; 2001, p.69-82.
7. Beloti V, Souza JA, Barros MAF, Nero LA, Mattos MR, Gusmão VV et al. Evaluation of Petrifilm™ EC and HS for total coliforms and *Escherichia coli* enumeration in water. *Braz J Microbiol*.2003;34:301-4.
8. Association Official Analytical Chemists (AOAC). *Official Methods of Analysis*. 17 ed., Washington, DC: Association Official Analytical Chemists;2002.
9. NF Validation. Validation of Alternative Analysis Methods - Application to Foodstuffs (Nf102). [acesso 2014 jun 19]. Disponível em: [http://nf-validation.afnor.org/en/wp-content/uploads/sites/2/2014/04/List-of-methods-certified-NF-VALIDATION-Food.pdf].
10. Tavolaro P, Ferrati AR, Destro MT, Landgraf M, Franco BDGM. Performance of two ready-to-use systems for enumeration of aerobic mesophilic microorganisms in frozen goat milk. *Braz J Microbiol*.2005;36:295-300.
11. Brasil. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. Oficializar os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 18 set. 2003.
12. Davidson PM, Roth LA, Gambrel-Lenarz SA. Coliform and other indicator bacteria. In: Wehr H M, Frank JF, editor. *Standard methods for the examination of dairy products*. American Public Health Association; 2004, cap. 7; p. 187-203.
13. Statsoft Inc, *Statistica (Data Analysis Software System)*, version 8, www.statsoft.com.2004.
14. Shrestha KG, Sinha RN. A rapid method for detection of coliforms in processed milk products. *Aust J Dairy Technol*.1990;5:27-30.
15. Cattani CSO, Fuchs PIP, Cirolini A, Vieira CRW. Métodos alternativos para contagem de micro-organismos em carcaças suínas. *Cienc Rural*.2013;43:1031-6.



## Que doce de leite é esse? Uma discussão sobre o padrão de identidade e qualidade do doce de leite pastoso

Which dulce de leche is that? A discussion on the identity and quality standard of creamy *dulce de leche*

RIALA6/1620

Louise Cristiane TURCATEL<sup>1</sup>, Patrícia Fernanda Ferreira PIRES<sup>1</sup>, Priscila Reis DINIZ<sup>1</sup>, Sila Mary Rodrigues FERREIRA<sup>1</sup>, Márcia Aurelina de Oliveira ALVES<sup>1</sup>, Márcia Regina BEUX<sup>2</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Departamento de Nutrição, Setor de Ciências da Saúde, Campus III – Jardim Botânico, Universidade Federal do Paraná (UFPR), Av. Prof. Lothário Meissner, 632, Curitiba, Paraná, Brasil, CEP: 80210-170. Tel.: (41) 3360-4010. E-mail: sila.ufpr@gmail.com

<sup>2</sup>Departamento de Patologia Básica, Universidade Federal do Paraná.

Recebido: 04.06.2014 - Aceito para publicação: 16.09.2014

### RESUMO

No presente trabalho foi determinada a qualidade do doce de leite pastoso comercial para discutir se há descaracterização do produto tradicional pela indústria de alimentos, considerando-se o padrão de identidade e qualidade (PIQ). Foram avaliadas cinco marcas de doce de leite pastoso e uma marca definida como amostra padrão, codificadas em DL I, DL II, DL III, DL IV, DL V e DL P. As amostras foram submetidas à análise físico-química de umidade, cinzas, lipídios, proteínas e análise dos parâmetros de cor e textura. Os ingredientes dos rótulos foram analisados e confrontados com o padrão de identidade e qualidade. Os resultados foram tratados pela análise de variância (ANOVA) e teste Tukey com  $p < 0,05$  no software Statística 10.0 (StatSoft). Os valores obtidos das amostras quando comparados com a amostra padrão sugerem que o doce de leite tem sido modificado ao longo dos anos. No entanto, mesmo com a adição de outros ingredientes não tradicionais ao doce de leite, o produto final está de acordo com os parâmetros estabelecidos pelo padrão de identidade e qualidade, o que pode ser atribuído a uma permissividade da legislação Brasileira, aliada à apropriação da indústria de alimentos sobre o produto tradicional.

**Palavras-chave.** doce de leite pastoso, padrão de identidade e qualidade, indústria de alimentos.

### ABSTRACT

This study aimed at determining the quality of commercial creamy dulce de leche, and to discuss whether there is a mischaracterization of the traditional formula by the food industry, considering the identity and quality standards (PIQ–Brazilian abbreviation). Samples of five brands of creamy dulce de leche and a standard sample were evaluated, and coded as DL I, DL II, DL III, DL IV, DL V, and DL P. These samples were investigated by means of physical-chemical analyses of moisture, ash, lipids, and proteins, and analyses of color and texture parameters. The ingredient labels were analyzed and compared with the identity and quality standards. The results were treated by analysis of variance (ANOVA) and Tukey test with  $p < 0.05$  in the 10.0 Statística (StatSoft) software. The values obtained from analyzed samples when compared with the standard one, it suggests that the dulce de leche been modified over the years. However, even with the addition of non-traditional ingredients into dulce de leche, the final product has been in accordance with the parameters set by the identity and quality standards, which can be attributed to a permissiveness of the Brazilian legislation, allied with the food industry appropriation on the traditional product.

**Keywords.** creamy dulce de leche, identity and quality standards (PIQ), food industry.

## INTRODUÇÃO

A produção de doce de leite é realizada no Brasil desde pequenas indústrias a grandes empresas, principalmente no Estado de Minas Gerais, que historicamente consolidou a “maneira mineira de fazer” o típico doce culturalmente conhecido<sup>1</sup>. De acordo com Demiate, Konkel e Pedroso<sup>2</sup>, a “maneira mineira de fazer” o doce se refere basicamente ao resultado da cocção do leite com açúcar (sacarose) até a concentração e a caramelização desejada.

Mesmo sendo produzido em grandes quantidades, o produto não apresenta uniformidade e a produção industrial necessita adequar-se em relação à qualidade, visando eliminar a diversificação de doces de leite encontrados no mercado<sup>2</sup>. A ausência de padronização e a perda de identidade do produto podem ser explicadas, em parte, pela descaracterização desse doce, produzido tradicionalmente, ao que remete a maneira de produzir como expressão de determinada cultura de um povo e que, inserida no contexto econômico da produção industrial de alimentos perde sua relevância ao adicionar outros ingredientes permitidos pelos padrões de identidade e qualidade (PIQ).

Segundo a definição da Portaria nº 354, de 4 de setembro de 1997<sup>3</sup>, o doce de leite é o produto, com ou sem adição de outras substâncias alimentícias, obtido por concentração por meio da ação do calor à pressão normal ou reduzida do leite ou leite reconstituído, com ou sem adição de sólidos de origem láctea e/ou creme adicionado de sacarose (parcialmente substituída ou não por monossacarídeos e/ou outros dissacarídeos). O doce de leite tem como ingredientes obrigatórios, o leite e/ou leite reconstituído e a sacarose na concentração de no máximo 30 quilos por 100 litros de leite.

Os órgãos que legislam sobre a referida qualidade desse doce, em particular ressaltam que a qualidade do doce de leite, tanto microbiológica como físico-química, é uma questão de saúde pública, visto que a população deve ter ao seu alcance produtos de boa qualidade que proporcionem segurança ao consumidor. Para que se garanta a qualidade microbiológica do leite empregado como matéria-prima e do produto final são empregados conservadores e para reforçar as qualidades sensoriais são utilizados aromatizantes, corantes, espessantes, estabilizantes e reguladores de acidez. Por conseguinte, a adição desses coadjuvantes de tecnologia leva a alteração do sabor característico do doce de leite tradicional.

Do ponto de vista da Segurança Alimentar e Nutricional, é um direito da população ter acesso ao alimento seguro, de boa qualidade e dentro do padrão estabelecido em legislação. Entretanto, há de se considerar que atualmente a indústria de alimentos se apropria da forma de produzir alimentos tradicionais, adicionando ingredientes tecnologicamente mais vantajosos<sup>4</sup>.

Sob a justificativa de se reconhecer a relevância do ajuste da legislação diante das transformações industriais e tecnológicas ao que se refere à maneira de produzir alimentos, o objetivo deste trabalho foi determinar a qualidade do doce de leite comercial e discutir se há descaracterização do produto tradicional pela indústria de alimentos, considerando o padrão de identidade e qualidade (PIQ).

## MATERIAL E MÉTODOS

Trata-se de um estudo observacional analítico transversal onde foram avaliadas cinco marcas comerciais distintas de doce de leite pastoso designadas por DL I, DL II, DL III, DL IV e DL V. Como amostra padrão (DL P) foi adotada uma marca tradicional de doce de leite. O critério de seleção das amostras foi o de menor valor comercial dentre as disponíveis no mercado local do município de Curitiba/PR. Esse critério se justifica uma vez que as maiores modificações nas formulações têm por finalidade reduzir o custo do produto final. A amostra padrão foi escolhida por não conter ingredientes que alterassem em proporção a formulação tradicional mineira, uma vez que contém em sua formulação apenas sorbato de potássio e bicarbonato de sódio como conservante e regulador de acidez, respectivamente.

A avaliação das amostras foi por meio da análise físico-química, análise do perfil de cor e textura e análise dos ingredientes discriminados nos rótulos dos produtos comparados com a amostra DL P e com o padrão de identidade e qualidade (PIQ) definida pela legislação brasileira<sup>3</sup>.

Foram coletados, em um único dia, dois potes de polietileno de 400 g do mesmo lote de cada marca de doce de leite pastoso, os quais foram transportados e armazenados à temperatura ambiente até o momento da análise. O período de validade dos produtos foi padronizado, em até dois meses de fabricação. As amostras foram inspecionadas para verificar indicações de anormalidade no seu aspecto físico, odor, alteração de cor e condições de embalagem. As amostras foram

homogeneizadas manualmente, com o auxílio de uma colher, para obtenção da amostra analítica. As análises foram realizadas em triplicata.

As análises físico-químicas relativas aos parâmetros de umidade, cinzas e proteínas foram realizadas de acordo com as normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz<sup>5</sup>. Para determinação de umidade foi utilizado o método de secagem direta em estufa de circulação de ar a 105 °C. A determinação de cinzas foi realizada por incineração em mufla à temperatura próxima de 550 °C e para a determinação de as proteínas, foi empregado o método de Kjeldahl clássico. A determinação de lipídios foi realizada de acordo com o método desenvolvido por Bligh e Dyer<sup>6</sup>. Os resultados foram comparados com os parâmetros estabelecidos pelo padrão de identidade e qualidade<sup>3</sup>.

Para avaliação dos parâmetros de cor luminosidade (L\*) e intensidade da cor amarelo (b\*), utilizou-se colorímetro Mini Scan Xe Plus, modelo N° 45/0-L, série 6403 com D<sub>65/10</sub> para luz do dia. Para avaliação de textura (TPA), foi utilizado o texturômetro TexturePro CT modelo V1.1, probe cilíndrico (TA43) de 25 mm, com velocidade pré-teste: 2 mm/s, velocidade teste: 1 mm/s, velocidade pós-teste: 1 mm/s, distância: 10 mm, tempo: 10 s e força de contato: 50 kg para

obtenção dos parâmetros dureza e gomosidade. A lista de ingredientes foi avaliada de forma qualitativa.

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), modelo inteiramente casualizado e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey com significância estatística de  $p < 0,05$ , por meio do *software* Statistica 10.0 (StatSoft).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1, pode-se observar o resultado da análise físico-química, de textura e de cor obtidos para as amostras de doce de leite.

Em relação à umidade, foi verificado que todos os valores apresentaram-se abaixo de 30 %, como preconizado pelo PIQ, exceto a amostra DL P que apresentou o maior teor de umidade, embora não tenha apresentado diferença estatística em relação às demais amostras. Sugere-se que isso tenha ocorrido devido ao tempo de cocção e ao teor de açúcar do produto, que são determinantes para obtenção da umidade desejada<sup>7</sup>, como também pela maior quantidade, em proporção, de leite. Fato que pode ser confirmado pelo teor de cinzas da amostra.

**Tabela 1.** Análise físico-química e perfil de cor e textura das amostras de doce de leite

Amostras	DL P	DL I	DL II	DL III	DL IV	DL V	PIQ
	Parâmetros físico-químicos						
Umidade (g/100g)	36,79±0,10*	25,97±0,12	26,86±0,35	26,73±0,62	22,41±0,23	26,34±0,31	Máx. 30g/100g
Cinzas (g/100g)	1,87±0,01*	1,14±0,02*	1,87±0,02	1,82±0,03	1,39±0,01*	1,63±0,02*	Máx. 2 g/100g
Lipídios (g/100g)	8,85±0,83*	4,01±0,21*	7,65±0,17*	8,85±0,18	7,87±0,13	6,91±0,04*	6 - 9 g/100g
Proteínas (g/100g)	7,28±0,10*	3,97±0,08*	7,08±0,14	7,06±0,59	6,13±0,12	7,48±0,21	Mín. 5 g/100g
Parâmetros de cor e textura							
Luminosidade (L)	10,74*	8,12*	7,98*	9,19*	8,15*	11,16	-
Intensidade de cor amarelo (b)	12,55*	11,25*	11,71*	12,24	9,40*	13,22	-
Dureza (g)	94,00*	128,67	284,00*	281,33*	457,67*	330,00*	-
Gomosidade (g)	100,50*	108,33	223,67	234,67*	233,33*	299,00*	-

DL: Doce de Leite; DL P: Doce de Leite Padrão; \* Amostras que diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ) em relação à amostra DL P, PIQ: Padrão de identidade e Qualidade

Os resultados do teor de cinzas mostraram que nenhuma amostra apresentou valores acima do limite permitido pela legislação. No entanto, as amostras DL I, DL IV e DL V apresentaram diferença estatística em relação à amostra DL P. O menor valor encontrado nas amostras avaliadas pode sugerir menor quantidade de leite nas formulações, considerando que o teor de cinzas é proporcional a presença de leite no doce de leite<sup>2</sup>. Cabe observar também que a utilização de bicarbonato de sódio e outros sais na produção do doce de leite também podem alterar os valores de cinzas.

A descrição dos ingredientes contidos nos rótulos das amostras avaliadas é apresentada na Tabela 2.

Os doces de leite comercializados apresentaram variação em relação ao teor de gordura. O interesse tecnológico da indústria em minimizar o custo da produção leva a utilização de substitutos da gordura para a produção do doce, como o amido modificado, soro do leite, fibra solúvel e a polidextrose. Esses são ingredientes que apresentam estrutura química diferente da gordura, mas em contrapartida dispõem de funções que se assemelham as características físico-químicas, sensoriais e visuais da gordura (viscosidade, sensação na boca e aparência)<sup>8</sup>.

Segundo Demiate, Konkel e Pedroso<sup>2</sup>, o teor de lipídios do doce de leite produzido a partir de leite de vaca integral é, em média, 8,0 %. No entanto, a maioria das amostras do presente estudo apresentou valores menores. No rótulo, apenas as amostras DL P e DL III identificaram a utilização de leite integral. Nenhum outro rótulo das amostras pesquisadas continha informação se o tipo de leite utilizado era integral, semidesnatado ou desnatado. As amostras DL I, DL III, DL IV e DL V indicaram a utilização de amido, o que poderia interferir no resultado. A amostra DL I apresentou limite inferior à recomendação do PIQ de 6 a 9 g/100 g de produto e na comparação com a amostra padrão, as amostras DL I, DL II e DL V tiveram diferença significativa em relação ao teor de lipídios.

Assim como o teor de cinzas, o de proteína também é proporcional à quantidade de leite utilizado como matéria prima<sup>2</sup>. Podemos observar pelos dados da tabela 1 que, dentre as seis amostras pesquisadas de doce de leite pastoso, quatro amostras – DL P, DL II, DL III e DL V - apresentaram valores acima de 7 %. A amostra DL I apresentou teor inferior ao recomendado pela legislação, de no mínimo 5 g de proteína para cada 100 g de produto, tendo sido a única amostra que

**Tabela 2.** Lista de ingredientes das amostras de doces de leite

Amostra	Ingredientes
DL P	Leite integral, açúcar, regulador de acidez: bicarbonato de sódio e conservador sorbato de potássio
DL I	Leite, açúcar, glicose, amido modificado, estabilizantes citrato de sódio, pectina, regulador de acidez: bicarbonato de sódio, conservador sorbato de potássio e lactase
DL II	Leite pasteurizado padronizado, e/ou leite em pó reconstituído, açúcar, enzima $\beta$ -galactosidade e conservador: sorbato de potássio
DL III	Leite pasteurizado integral, açúcar, soro de leite em pó, creme de leite, xarope de glicose, amido de milho, bicarbonato de sódio, conservante sorbato de potássio, enzima lactase e aroma sintético idêntico ao natural de baunilha
DL IV	Leite, leite reconstituído, açúcar, glicose, creme de leite, amido modificado, xarope de caramelo, regulador de acidez: bicarbonato de sódio, estabilizante citrato de sódio, conservador sorbato de potássio
DL V	Leite pasteurizado padronizado e/ou leite em pó, açúcar, xarope de glicose, amido de mandioca, regulador de acidez: bicarbonato de sódio, conservador sorbato de potássio e aroma artificial de baunilha

DL: Doce de Leite; DL P: Doce de Leite Padrão

apresentou diferença significativa para o teor de proteína em comparação com a amostra padrão. Das amostras analisadas de doce de leite, somente as amostras DL P e DL II não indicaram a utilização de amido e/ou soro de leite e leite reconstituído na formulação do produto (Tabela 2), o que pode interferir no teor de proteínas.

As análises de cor e textura das seis amostras analisadas de doce de leite foram utilizadas principalmente para contrastar os resultados das cinco amostras comerciais com a amostra padrão. Os ingredientes adicionados ao doce de leite podem interferir nos parâmetros cor e textura, que por sua vez, são relevantes

na escolha do consumidor.

Segundo Ferreira et al<sup>9</sup>, os parâmetros mais importantes para a avaliação da cor de doce de leite são a luminosidade ( $L^*$ ) e a intensidade da cor amarelo ( $b^*$ ). O parâmetro L expressa a luminosidade ou claridade da amostra, isto é, quanto mais próximo de 100 mais clara a amostra. Houve diferença estatisticamente significativa entre as amostras DL I, DL II, DL III e DL IV em relação à amostra padrão DL P para esse parâmetro.

A amostra DL V apresentou-se mais clara que as demais, em contrapartida a amostra DL II apresentou-se mais escura. A adição de amido e a presença de sólidos solúveis, como o leite em pó e soro de leite em pó, encontrados na amostra DL V, podem ter influenciado a coloração mais clara, pois refletem o tempo de concentração do produto. Assim como a adição da enzima  $\beta$ -galactosidase, encontrada na amostra DL II, que além de evitar a cristalização pela quebra de lactose nos açúcares glicose e galactose, permite que esses fiquem livres para serem precursores mais rápidos na reação de Maillard. Isto pode acarretar em coloração mais escura<sup>9,10</sup>.

A glicose é utilizada em substituição a sacarose e tem como finalidade evitar a cristalização do doce, melhorando a textura e o brilho do produto. Em contrapartida, quando utilizada em quantidades muito elevadas pode resultar em um doce mais escuro e com consistência viscosa<sup>1</sup>. As amostras DL I, DL III, DL IV e DL V apresentaram esse ingrediente em sua composição.

Em relação ao parâmetro de intensidade da cor amarelo ( $b^*$ ), houve diferença significativa das amostras DL I, DL II e DL IV em relação à amostra DL P. A amostra DL V apresentou maior reflexão de comprimento de onda associado à cor amarela e a amostra DL IV apresentou um valor menor em relação às outras amostras.

A diferença da cor no produto final pode ser atribuída a muitas variáveis: a acidez inicial do leite, a quantidade e o momento da adição do bicarbonato de sódio, a presença de açúcares redutores além da lactose, a presença de glicose ou xarope de glicose, a presença de corantes, o teor inicial (calda) e final (doce de leite) de sólidos solúveis, o tempo gasto para a evaporação, e a pressão de vapor utilizada nos tachos<sup>9</sup>.

Segundo Ferreira et al<sup>9</sup>, a dureza corresponde a força necessária para produzir uma deformação na amostra e a gomosidade é considerada a energia requerida para desintegrar um alimento até estar pronto para a deglutição. As amostras DL III, DL IV e DL V apresentaram diferença significativa em relação à amostra DL P.

Pode-se observar que a dureza e a gomosidade da amostra DL P foi menor que as demais, isso sugere que o doce padrão pode ter sido submetido a menor concentração de calor, o que proporcionou uma característica mais cremosa que pode ter interferido também em maior teor de umidade, como mostra a Tabela 1. Ao comparar os resultados da análise de textura com os resultados da Tabela 2, pode-se observar que no doce de leite DL P não foi adicionado amido ou glicose, utilizado na fabricação com a intenção de aumentar viscosidade<sup>9</sup>. Das amostras pesquisadas, as amostras DL I, DL III, DL IV e DL V apresentaram tanto glicose quanto amido em sua composição, o que pode ter resultado em maior valor de dureza e gomosidade.

Com o comportamento da textura observado na amostra DL P pode-se sugerir que a adição de alguns ingredientes ao doce de leite pode promover à rejeição ou a aceitação produto.

Muitos ingredientes são utilizados como coadjuvantes tecnológicos com diferentes funções. O conservador sorbato de potássio é utilizado para aumentar o tempo de prateleira, o bicarbonato de sódio para regular a acidez e a enzima  $\beta$ -galactosidase é utilizada para evitar a cristalização da lactose e minimizar a textura arenosa no doce de leite<sup>10</sup>. Outros são utilizados para diminuir custos de produção, que por sua vez são os principais responsáveis pela descaracterização do doce de leite tradicional.

Além dos dois ingredientes mencionados como tradicionais (leite e sacarose), a legislação<sup>3</sup> permite a adição de outros ingredientes opcionais como: creme sólido de origem láctea, mono e dissacarídeos que substitua a sacarose em até 40 %, amidos ou amido modificado em concentração máxima de 0,5 % em relação ao volume de leite, cacau, chocolate, coco, amêndoas, amendoim, frutas secas. A denominação “doce de leite para confeitaria” é obrigatória caso haja a adição de estabilizantes (citrato de sódio), corante caramelo, espessantes (pectina) e umectantes (sorbitol), entre outros aditivos no doce de leite<sup>3</sup>.

Dentre os ingredientes utilizados na formulação do doce de leite das amostras analisadas, foram observados alguns desses: glicose, xarope de glicose ou caramelo, soro de leite, creme de leite e amidos. Cabe aqui ressaltar, que ainda que permitidos pela legislação, não são próprios ou característicos do doce de leite tradicional. Foi observada também, a presença de aditivos alimentares e coadjuvantes de tecnologia como estabilizante citrato de sódio, espessante pectina e aroma

artificial de baunilha no rótulo das amostras DL I, DL III, DL IV e DL V. Esses doces não foram identificados com a especificação “para confeitaria” na embalagem.

Segundo Madrona et al<sup>11</sup>, o amido é utilizado pela indústria de alimentos com o objetivo de aumentar o rendimento e diminuir custos de produção. A quantidade adicionada não deve ultrapassar um limite de 0,5 g/100 mL de leite. Dentre as seis amostras analisadas, quatro (DL I, DL III, DL IV e DL V) apresentavam em sua composição o amido, seja de mandioca, milho ou amido modificado. Na amostra DL I, além da presença do amido modificado foi observada a presença de pectina, que tem por função o espessamento do doce.

Ferreira et al<sup>9</sup>, ao avaliar seis marcas de doce de leite pastoso comerciais, verificou que, em duas delas, havia a presença de amido na composição. Em seu estudo, foram observadas modificações significativas na análise da textura para os parâmetros de dureza e gomosidade de uma das amostras com amido em relação às outras amostras analisadas. Essa mesma amostra foi a que obteve as pontuações mais baixas na análise sensorial. O excesso de amido na composição pode ser um indicativo de fraude, além de acarretar prejuízos ao consumidor devido à mudança nas características sensoriais e redução do valor nutricional do produto<sup>2</sup>.

Outro ingrediente não característico do doce de leite tradicional que aparece na lista é o soro de leite. Esse é utilizado pela indústria de alimentos com a alegação de ser fonte de nutrientes, principalmente proteínas. As proteínas do soro de leite têm diversas aplicações, tais como, a gelatinização, emulsificação, solubilidade, formação de espuma e viscosidade, que podem interferir na textura do doce de leite. O soro de leite é um subproduto residual da fabricação de queijos e é aproveitado e utilizado na produção de doce de leite para aumentar o rendimento, diminuir os custos do produto e, conseqüentemente, aumentar a lucratividade<sup>9</sup>. Das amostras analisadas somente a DL III apresentou soro de leite em sua composição.

Para fabricação do doce de leite pastoso, o teor mínimo de gordura no leite deve ser de 2,6 %. Para isto, é realizada uma padronização, onde o leite é centrifugado para separação do creme e do leite desnatado. Posterior a esta etapa ocorre a adição do creme ao leite na quantidade desejada para obtenção do leite padronizado. Isso permite controlar o teor de gordura no leite<sup>12</sup>. Porém, como a gordura do leite é de grande interesse tecnológico para a indústria láctea, muitas indústrias fabricam o doce

de leite com leite baixo teor de gordura<sup>2</sup>. Infere-se que esse possa ser o motivo da adição de creme de leite em algumas das amostras analisadas para, possivelmente, corrigir o teor de lipídios do produto final.

A adição de ingredientes, que não os coadjuvantes de tecnologia, podem alterar as características físico-químicas e por conseqüência as características sensoriais do doce de leite, principalmente no que se refere à cor e textura. Os resultados do presente trabalho direcionam a discussão da apropriação do “modo de produzir tradicional” pela indústria de alimentos, que vem ao longo dos anos modificando a formulação original desse doce típico.

Posto isso, sugere-se que o uso de uma nomenclatura diferenciada para esses produtos talvez seja uma alternativa para nortear a escolha do consumidor. Como exemplo do iogurte e requeijão. A instrução normativa número 16/2005<sup>13</sup> determinou a mudança do nome do produto *iogurte* para *bebida láctea*, quando o iogurte for adicionado de soro de leite ou amido, ademais, esse produto secundário deve conter a advertência no rótulo “Não é iogurte”.

A instrução normativa número 359/1997<sup>14</sup> determinou a mudança do nome do produto *requeijão* para *preparado lácteo*, quando o mesmo for adicionado de soro de leite ou amido. No rótulo, a indicação “cremoso” só deverá ser utilizada para o produto que atender os requisitos estabelecidos (ingredientes, presença de gordura de origem láctea e teor de umidade) para esse tipo de requeijão.

Por um lado, as legislações que regulamentam os padrões de identidade e qualidade e que determinam as normas de rotulagem dos produtos alimentícios são relevantes tanto para manter a qualidade e identidade de produtos tradicionais, quanto para atender a expectativa do público consumidor. Porém é necessário que essas legislações, regulamentos e normas sejam atualizados constantemente, acompanhando o conhecimento gerado pelas pesquisas científicas e aplicado nas inovações tecnológicas do setor alimentício<sup>15</sup>.

## CONCLUSÃO

Na análise físico-química, mesmo com a adição de outros ingredientes não tradicionais ao doce de leite, o produto final está de acordo com os parâmetros estabelecidos pelo padrão de identidade e qualidade. Dessa forma, infere-se que a legislação vigente contribui

para a segurança do processo de elaboração do produto, porém, não contempla a garantia e manutenção das características tradicionais e históricas do doce de leite.

A permissividade da legislação Brasileira, aliada à apropriação da indústria de alimentos sobre os produtos tradicionais, vem ao longo dos anos modificando esse alimento. A amplitude do padrão de identidade e qualidade estabelecida pela legislação em relação à formulação dos produtos possibilita a adição de ingredientes não característicos do doce de leite tradicional, o que leva a alteração da identidade e a descaracterização do produto.

---

### AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES – e a Universidade Federal do Paraná - UFPR.

---

### REFERÊNCIAS

1. Machado RMD, Silva AV, Tfouni GS. Doce de leite. Campinas: ITAL, 2003. 73p. [Agronegócio; 2].
2. Demiate IM, Konkel FE, Pedrosa RA. Avaliação da qualidade de amostras comerciais de doce de leite pastoso – composição química. *Ciênc Tecnol Alim*. 2001;21(1):108-114.
3. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº354 de 4 de setembro de 1997. Aprova o Regulamento técnico de Identidade e Qualidade do doce de leite. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 08 set. 1997. Seção 1, p. 19685.
4. Menasche R, Alvarez M, Collaço J. - Dimensões socioculturais da alimentação. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2012.
5. Instituto Adolfo Lutz (IAL) (São Paulo – Brasil). Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 4ª ed. [1ª edição digital]. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. Disponível em: [http://www.ial.sp.gov.br/index.php?option=com\\_remository&Itemid=0&func=startdown&id=5](http://www.ial.sp.gov.br/index.php?option=com_remository&Itemid=0&func=startdown&id=5)
6. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*. 1959; 37(8): 911-7.
7. Martins JFP, Lopes CN. Doce de leite: aspectos da tecnologia de fabricação. ITAL. Campinas, 1980. [Instruções Técnicas, nº 18].
8. Vieira MC, Gallina DA, Cavichiolo JR, Gomes RAR, Fachini C, Zacarchenco PBS. Produção de doce de leite tradicional, *light* e *diet*: Estudo comparativo de custos e viabilidade econômica. *ITAL. Inform Econom*. 2011; 41(10):15-27.
9. Ferreira LO, Pereira PAP, Maria J, Pinto SM. Avaliação das características de qualidade de doces de leite comerciais. *Rev Inst Latic “Cândido Tostes”*. 2012;67(387):05-11.
10. Klein MP, Jong EV, Révillion JP. Utilização da betagalactosidase para prevenção da cristalização em doce de leite. *Ciênc Agrotec*. 2010;34(6):1530-1530-35.
11. Madrona GS, Zotarelli MF, Bergamasco R, Branco IG. Estudo do efeito da adição de soro de queijo na qualidade sensorial do doce de leite pastoso. *Ciênc Tecnol Alim*. 2009;29(4):826-33.
12. Perrone IT, Stephani R, Neve BS, Sá JFO, Carvalho AF. Atributos tecnológicos de controle para produção do doce de leite. *Rev Inst Latic “Cândido Tostes”*. 2012;67(385): 42-51.
13. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa nº 16, de 23 de agosto de 2005. Aprova o Regulamento técnico de identidade e qualidade de bebida láctea. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 24 ago. 2005. Seção 1, p. 7.
14. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria da Defesa Agropecuária. Portaria nº 359, de 04 de setembro de 1997. Aprova Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade do Requeijão ou Requesôn. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 08 set. 1997. Seção 1, p. 43.
15. Smith ACL, Almeida-Muradian LB. Rotulagem de alimentos: avaliação da conformidade frente à legislação e propostas para a sua melhoria. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2011;70(4):463-72.

## Doença renal policística autossômica dominante em felinos da raça Persa: aspectos clínicos, laboratoriais, imagenológicos e genéticos

---

Guerra JM. **Autosomal dominant polycystic kidney disease in Persian cats: clinical, laboratory, imaging and genetics characteristics.** São Paulo, SP. 2014. [Dissertação de Mestrado – Área de concentração: Patologia Experimental e comparada, Laboratório de Patologia Morfológica e molecular, Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - FMVZ, Universidade de São Paulo – USP]. Orientador: Prof. Dr. Bruno Cogliati.

---

A doença renal policística autossômica dominante (DRPAD) felina é caracterizada pela presença de múltiplos cistos localizados em parênquima renal e, ocasionalmente, hepático e pancreático, sendo uma importante causa de doença renal crônica terminal. Ela é considerada a enfermidade congênita hereditária mais prevalente dos gatos domésticos, porém, os dados epidemiológicos e clínicos existentes no Brasil são escassos, o que torna o seu controle mais difícil no país. Da mesma forma, a DRPAD em humanos constitui-se na doença renal monogênica mais comum, acometendo 1 em cada 400 a 1.000 indivíduos, com curso clínico muito semelhante a doença em gatos. No presente estudo, 252 felinos da raça Persa e mestiços de Persa do Estado de São Paulo foram avaliados através de teste genético para DRPAD. Os resultados indicaram uma prevalência de apenas 6,35% de gatos portadores da mutação para DRPAD em heterozigose, valor abaixo dos índices registrados em outros países. Do total de animais, uma coorte de 82 felinos da região metropolitana de São Paulo foi selecionada para realização de exames físico, laboratoriais, imagenológicos e genéticos. Estes animais foram separados em dois grupos de acordo com a presença (n=12) ou ausência (n=70) de alterações ultrassonográficas sugestivas de doença renal policística. A sensibilidade e a especificidade entre o teste molecular e o exame ultrassonográfico para DRPAD nos animais estudados foram ambas de 100%. Os animais com alterações genéticas e ultrassonográficas indicativas de doença renal policística autossômica dominante apresentaram aumento significativo no valor de cálcio total sérico, fração de excreção urinária de cálcio e de sódio (p=0,0219; p=0,0275; p=0,0032, respectivamente). Os demais parâmetros clínicos e laboratoriais não diferiram entre os dois grupos de animais. O exame ecocardiográfico revelou que casos de hipertrofia miocárdica foram mais frequente entre os animais positivos para DRPAD (p=0,0001). Dessa forma, é possível concluir que exames de triagem ultrassonográfica e/ou molecular devem ser utilizados para o diagnóstico de animais com DRPAD, visto que, alterações clínicas e laboratoriais são tardias. Exames eletro e ecocardiográficos devem ser rotineiramente realizados nos felinos císticos. Ainda, a caracterização clínica da DRPAD em gatos ressalta não apenas sua grande importância para medicina felina, mas também para a comunidade médica devido à correlação com a doença humana, representando um modelo ortólogo espontâneo, em animal de porte médio, para o estudo dessa enfermidade e validação de novos procedimentos terapêuticos. **Palavras-chave.** rim policístico, mutação, ultrassonografia, eletrocardiografia, ecocardiografia.

**Tese disponível:** Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP  
E-mail: juliana.guerra@usp.br



### 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 N° 12, N° 13 e N° 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](mailto: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)<sup>2,3</sup>.

Segundo Chang et al<sup>31</sup>, 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>.

### 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

