

REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ

ISSN 0073-9855
RIALA6



GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE

Volume 73 número 4, 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 4, 2014
Outubro –Dezembro 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(4)

ISSN 0073-9855

CDD₁₈614.07205

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

■ ARTIGO DE REVISÃO/REVIEW ARTICLE

- 1621 A desidratação osmótica como pré-tratamento para frutas e hortaliças**
Fruits and vegetables with osmotic dehydration pretreatment
Mariana Buranelo EGEE, Luciana Pereira LOBATO 316-324

■ ARTIGO ORIGINAL/ ORIGINAL ARTICLE

- 1622 Monitoring the extraneous matters in pulps of tomato, guava, mango and strawberry marketed during the seasons of the year**
Monitoramento de matérias estranhas em polpas de tomate, goiaba, manga e morango adquiridas no comércio durante as estações do ano
Márcia Bittar ATUI, Augusta Mendes da SILVA, Maria Aparecida Moraes MARCIANO, Viviane Acosta FRANCO, Lidia Berenice CHASIN, Antônio Roberto FERREIRA, Maria Isabel A. FIORAVANTI, Elaine Cristina de MATTOS, Márcia Dimov NOGUEIRA325-330
- 1623 Avaliação sensorial e da cor objetiva de hambúrgueres congelados formulados com linhaça dourada e derivados**
Sensory and objective color evaluation of frozen burgers formulated with golden flaxseed and its byproducts
Daiana NOVELLO, Marise Aparecida Rodrigues POLLONIO 331-337
- 1624 Óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. como sanitizante natural para controle de bactérias sésseis em superfície utilizada para corte de alimentos**
Essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. as natural sanitizer for controlling the sessile bacteria and as antimicrobial on the food-cutting surfaces
Camila Ribeiro ROCHA, Roberta Torres CARELI, Rayane Patrícia SILVA, Anna Christina de ALMEIDA, Ernane Ronie MARTINS, Eliandra Maria Bianchini OLIVEIRA, Eduardo Robson DUARTE..... 338-344
- 1625 Resíduos de antibióticos e qualidade microbiológica de leite cru e beneficiado**
Residues of antibiotics and microbiological quality of raw and benefited milk
Anna Júlia PORTZ , Emanuel Pereira COUTO, Márcia de Aguiar FERREIRA 345-350
- 1626 Controle de qualidade externo nos laboratórios de tuberculose do estado de São Paulo, Brasil**
External quality control of the tuberculosis laboratory network of São Paulo state, Brazil
Helois da Silveira Paro PEDRO, Gleize VILLELA, Andréa Gobeti Vieira COELHO, Susilene Maria Tonelli NARDI, Regina Ruivo Ferro e SILVA, Leonilda Chiari GALLE, Maria de Lourdes M. SHIKAMA, Andréa Rezende LEITE, Rodrigo Friozi POVINELLI, Jaqueline Otero SILVA, Maria Helena Leme FERRAZ, Lucilaine FERRAZOLI..... 351-357

■ COMUNICAÇÃO BREVE/ BRIEF COMMUNICATION

- 1627 Análise laboratorial de bolos destinados para público infantil e comparação com as informações nutricionais contidas nos rótulos e adequação à legislação**
Laboratory analysis of cakes for children and comparison with the nutritional information included in the label and their adequacy to the legislation
Bruna dos Anjos PEDERZOLI, Andressa de Assis LOURENÇO, Fabiana Torma BOTELHO 358-363

1628	Avaliação da qualidade microbiológica de queijos do tipo Minas padrão de produção industrial, artesanal e informal Microbiological evaluation of Minas type cheeses from industrial, artisanal and informal manufacturing Amanda Laryssa Borges do Carmo AMORIM, Emanuel Pereira COUTO, Angêla Patrícia SANTANA, Jaqueline Lamounier RIBEIRO, Márcia de Aguiar FERREIRA	364-367
1629	Primeiro relato de <i>Salmonella enterica</i> e <i>Campylobacter spp.</i> isolados de Garibaldi (<i>Chrysomus ruficapillus</i>) e Canário-da-terra (<i>Sicalis flaveola</i>) silvestres First report on the <i>Salmonella enterica</i> and <i>Campylobacter spp.</i> isolation from wild birds Garibaldi (<i>Chrysomus ruficapillus</i>) and Canário-da-terra (<i>Sicalis flaveola</i>) Priscila Alves DIAS, Daiane Elisa WILSMANN, Júlia Grün HEINEN, Carine Dahl CORSINI, Cecília CALABUIG, Cláudio Dias TIMM.....	368-371
■ NOTA CIENTÍFICA/ SCIENTIFIC NOTE		
1630	Avaliação de diferentes alíquotas de enxaguadura para a contagem pelo método direto de <i>Campylobacter spp.</i> em carcaças de frango resfriadas Evaluation of the different rinse volumes for performing the direct technique for <i>Campylobacter spp.</i> enumeration in chilled broiler carcasses Thalyta Marina BENETTI, Wanda Moscalewski ABRAHÃO, Isabelle Danguì FERRO, Renata Ernlund Freitas MACEDO, Tereza Cristina Rocha Moreira de OLIVEIRA	372-376
■ COLABORADORES		
■ INSTRUÇÕES AOS AUTORES.....		

A desidratação osmótica como pré-tratamento para frutas e hortaliças

Fruits and vegetables with osmotic dehydration pretreatment

RIALA6/1621

Mariana Buranelo EGEA^{1*}, Luciana Pereira LOBATO²

*Endereço para correspondência. ¹Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, Campus Rio Verde, Rod. Sul Goiana Km 01, Caixa Postal 66, Zona Rural, Rio Verde, Goiás, Brasil, CEP 75.901-970, Tel.: (64) 3620-5600.

E-mail: mariana.egea@ifgoiano.edu.br

²Universidade Federal de Sergipe, UFS, Lagarto, Brasil

Recebido: 30.06.2014 - Aceito para publicação: 30.11.2014

RESUMO

A desidratação osmótica é uma operação importante para transformar os alimentos de origem vegetal perecíveis em novos produtos com valor agregado e com maior vida de prateleira. Este processo é responsável pela remoção de água, em que as frutas e hortaliças são submetidas à imersão em solução hipertônica que tenha alta pressão osmótica. O presente trabalho apresenta uma revisão sobre a desidratação osmótica abrangendo-se a definição do processo, as variáveis e as alterações desejáveis e indesejáveis nos procedimentos realizados com os produtos de origem vegetal.

Palavras-chave. impregnação, secagem osmo-convectiva, perda de massa, incorporação de sólidos.

ABSTRACT

Osmotic dehydration is a crucial operation unit used for transforming the perishable vegetal product into the new produces containing an added nutritional value and much longer shelf life. This process is responsible for removing the water from fruits and vegetables. Accordingly, the fruits and vegetables are subjected to the immersion into a hypertonic solution which causes a high osmotic pressure in the system. The present study aimed at presenting a review on the osmotic dehydration involving the process definition, the process variables and the desirable and undesirable changes in procedures carried on in products of vegetable source.

Keywords. Impregnation, osmo-convective drying, loss in mass, solids incorporation.

INTRODUÇÃO

O Brasil é um grande produtor de produtos de origem vegetal. No entanto, estima-se que, entre a colheita e a chegada à mesa do consumidor (incluindo as etapas de colheita, transporte e armazenamento), ocorram perdas quantitativas ou qualitativas em torno da metade da produção, ou seja, de 30 - 40 % das frutas e hortaliças nunca chegam ao consumidor. Dentre os vegetais, os valores são mais elevados para pimentão, quiabo, pepino e alho (35 % a 42 %) e para frutas, o maior problema ocorre em banana e morango (38 % - 40 %)¹. Assim, a ciência e a tecnologia de alimentos sugerem novos processos de industrialização para reduzir estas perdas².

A desidrataçãoo smótica (DO), ou alternativamente denominada impregnação ou saturação, é uma operação importante para transformar os frutos perecíveis em novos produtos com valor agregado e com maior vida de prateleira³,⁴. Neste processo ocorre a remoção de água onde as frutas e hortaliças são submetidas à imersão em solução hipertônica que tenha alta pressão osmótica. Nas células vegetais, a parede celular, que contém numerosos interstícios relativamente grandes, não se apresenta como a principal barreira, sendo permeável à água e a pequenos solutos. A direção da força de remoção de água acontece entre o alimento e a solução, onde a membrana semipermeável deixa que a difusão aconteça do alimento para a solução e desta para o alimento⁵,⁶.

Na concepção de Raoult-Wack⁶, a desidrataçãoo smótica é um pré-tratamento onde são obtidos produtos de umidade intermediária ou ainda aqueles onde se aplicam tratamentos como secagem, congelamento ou embalagem como tratamento final visando sua maior conservação. Suas principais vantagens são a redução de perdas de características sensoriais do alimento acompanhada de melhora na textura, aumento da estabilidade de pigmentos, modificação na proporção de açúcares:acidez e ganho de processamento por redução de gasto de energia em tratamentos finais. Ainda, ocorre a diminuição da umidade, dos custos com embalagem e transporte. Além disso, esta etapa como pré-processamento ajuda a diminuir a quantidade de energia gasta nas etapas que seguem à desidrataçãoo smótica⁵,⁶.

A melhora na qualidade pode ser atribuída ao uso de operações com temperaturas moderadas, que podem ser baixas comparadas a outros processamentos (aproximadamente 25 °C) e neste caso, a água é removida do produto sem mudança de fase, conservando a estrutura celular vegetal. A não ocorrência de mudança de fase com a

remoção de água na fase líquida faz com que a transferência de massa e de calor sejam eficientes, facilitando os processamentos realizados após a desidrataçãoo smótica⁶.

Em contrapartida, neste processo ocorre a perda de alguns sólidos naturais do alimento, como açúcares, minerais, entre outros nutrientes, e ganho de sólidos elevado, afetando o perfil nutricional do alimento. Outro problema é o tratamento da solução de desidrataçãoo smótica que ainda não possui um aproveitamento específico e geralmente é usada em grandes proporções de fruta:solução. Essas soluções, que possuem altas concentrações de sólidos, têm custo elevado e ocasionam um problema quanto a sua reutilização pela dificuldade de controle do processo. No entanto, estudos têm sido realizados com a finalidade de reuso da solução osmótica ou de separação de compostos extraídos do alimento⁷-⁹.

O objetivo desta revisão bibliográfica foi apontar os aspectos positivos e negativos da realização da desidrataçãoo smótica como pré-tratamento para frutas e hortaliças.

TRANSFERÊNCIA DE MASSA NA DESIDRATAÇÃO OSMÓTICA

Na desidrataçãoo smótica de produtos sólidos com alto conteúdo de água em soluções aquosas concentradas (como soluções de açúcar ou sal) três tipos de fluxos estão envolvidos (Figura 1). O primeiro é um fluxo de saída de água do alimento para a solução. O segundo fluxo é de transferência de sólidos da solução para o produto e, o terceiro fluxo, é o de saída de solutos do produto (ácidos orgânicos, minerais, vitaminas, etc.) para a solução, o qual é quantitativamente insignificante comparado com os dois primeiros fluxos, mas deve ser considerado na composição final do produto⁴,⁵.

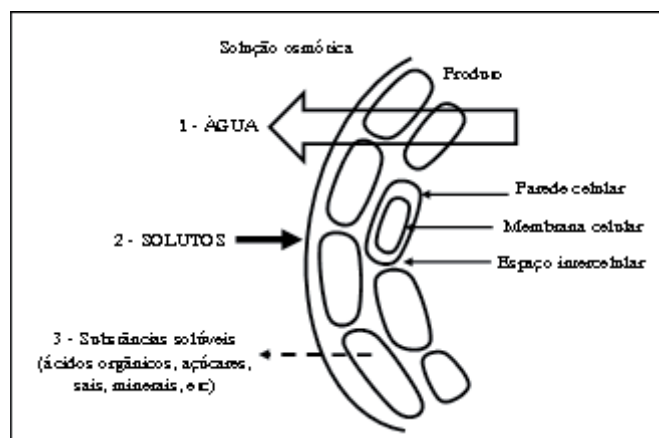


Figura 1. Esquema dos fluxos envolvidos na transferência de massa da desidrataçãoo smótica de frutas e hortaliças

Fonte: adaptado de Lenart⁵

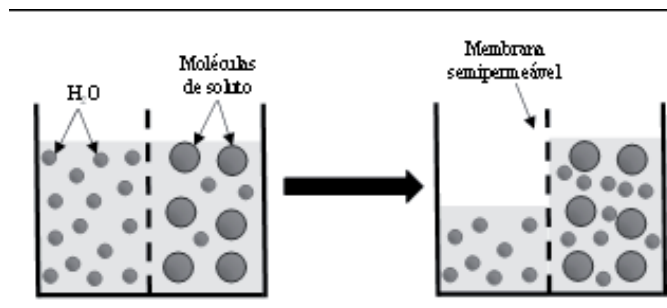


Figura 2. Esquema demonstrando a osmose
Fonte: o autor (2014)

Considerando todo o processo de desidratção osmótica, muitos mecanismos podem atuar ao mesmo tempo, dependendo das condições de operação e da natureza do produto. Estes podem ser: difusão, osmose, interação dos fluxos e encolhimento dos produtos, os quais podem diminuir o volume inicial em até 50 %⁶. A difusão é um fenômeno de transporte de matéria onde um soluto é transportado devido aos movimentos das moléculas de um fluido. Estes movimentos fazem com que, do ponto de vista macroscópico, o soluto passe das zonas mais elevadas de concentração para zonas de baixa concentração. A osmose, como mostrado na Figura 2, é o nome dado ao movimento do solvente, no caso a água, entre meios com concentrações diferentes de solutos, separados por uma membrana semipermeável. A solução menos concentrada é denominada hipotônica e a mais concentrada hipertônica¹⁰.

Assim como no processo de secagem, o processo de desidratção osmótica pode influenciar o encolhimento, que é a diminuição das dimensões do produto, devido à alteração na microestrutura do tecido fresco, em que se verifica um aumento de cavidades, células alongadas, dentre outras modificações¹¹, promovidas pelo stress térmico e principalmente pela remoção de umidade. Notou-se que o comportamento do alimento em uma determinada geometria é fator de alteração do encolhimento¹². Simal et al¹³, desidratando maçãs previamente tratadas por desidratção osmótica, concluíram que houve maior encolhimento para as maçãs que não haviam sido tratadas osmoticamente.

Muitos são os fatores que influenciam diretamente na velocidade de transferência de massa durante o processo osmótico: a temperatura, a agitação, tempo de duração, concentração e composição da solução (peso molecular e natureza do soluto) e a permeabilidade da membrana da fruta ou hortaliça (estrutura do sólido, a área

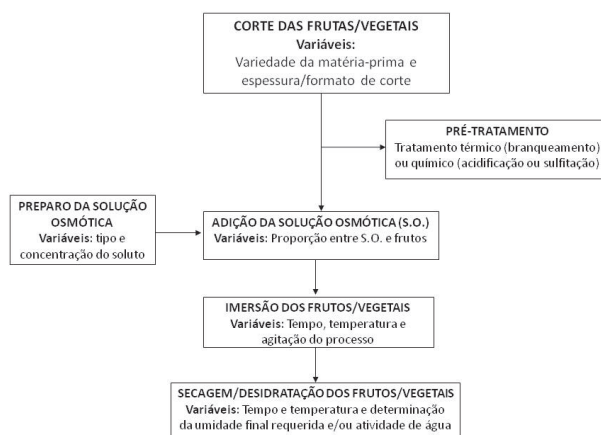


Figura 3. Fluxograma das etapas básicas da desidratção osmótica de frutas e vegetais
Fonte: o autor (2014)

da superfície do alimento submetido ao processamento), modo de contato produto-solução (fase sólido-líquido), pressão do processo e proporção produto/solução⁶.

ESTRUTURA DOS ALIMENTOS DESIDRATADOS

A perda de água e ganho de sólidos são controlados principalmente pelas características físicas das matérias-primas utilizadas na desidratção osmótica. Em altas (>40 °C) ou baixas (<10 °C) temperaturas, as mudanças na estrutura das frutas afetam as suas propriedades de desidratção e de impregnação⁴. Assim, estudar a microestrutura dos alimentos durante o fenômeno de desidratção osmótica é importante para elucidar os mecanismos de transferência de massa¹⁴.

Paes et al¹⁵ observaram em maçãs que o aumento da temperatura de processamento da desidratção osmótica (45-55 °C) afetou a textura causando amolecimento do tecido vegetal que ocorreu provavelmente pela modificação da estrutura associada a danos causados na membrana. No entanto, a modificação da membrana celular poderia torná-la menos seletiva, facilitando a saída de líquido da célula. Este aumento de perda de água sem uma grande modificação no ganho de açúcar foi observado por outros autores¹⁶.

A utilização de pré-tratamentos para inibir o escurecimento enzimático como o branqueamento, realizados anteriormente à desidratção osmótica, também podem alterar a estrutura celular de frutas. Egea et al¹⁷ observaram aumento na concentração de agente

osmótico, com conseqüente aumento na transferência de massa, em maçãs nos tratamentos onde o branqueamento por tratamento térmico foi realizado. De acordo com Matussek et al¹⁸, o branqueamento torna as membranas de tecido de plantas mais permeáveis à mobilidade dos sólidos envolvidos na desidratção osmótica, provavelmente por afetar a estrutura.

O impacto negativo da desidratção osmótica na integridade celular dos tecidos vegetais e o efeito benéfico do cálcio no processo já foi verificado em goiabas¹⁹, morangos²⁰ e maçãs²¹. Para preservar a integridade estrutural da parede celular dos alimentos desidratados osmoticamente podem-se adicionar sais de cálcio na solução osmótica. O Ca²⁺ promove uma interação entre os íons cálcio e a pectina da parede celular, proporcionando maior rigidez na estrutura celular de frutas e hortaliças²².

Neste sentido, Ferrari et al²³ estudaram as propriedades mecânicas e a estrutura celular do melão desidratado osmoticamente, onde adicionou-se lactato de cálcio na solução osmótica de sacarose ou maltose. Na presença de sacarose, a perda de água decorrente do processo osmótico causou intensa plasmólise do citoplasma, resultando em perda de turgor e conseqüente diminuição da resistência da parede que levaram à variação da forma e tamanho das células, ficando algumas células deformadas e até colapsadas. O tratamento com maltose causou menos danos celulares que o tratamento com sacarose. Nele o citoplasma se manteve intacto e foram observados apenas alguns danos à parede celular das frutas. Com a adição de lactato de cálcio, nos ensaios de sacarose e de maltose, houve preservação estrutural das frutas, demonstrando a vantagem da utilização de íons cálcio nos tratamentos osmóticos.

VARIÁVEIS DO PROCESSO DE DESIDRATAÇÃO OSMÓTICA

A taxa de remoção de água e incorporação de sólidos durante a desidratção osmótica depende de diversos fatores, tais como: concentração e temperatura da solução, tempo de contato, grau de agitação da solução, forma e tamanho do sólido, razão solução/sólido e nível de vácuo, se aplicado²⁴. Os efeitos da concentração de soluto, da temperatura e do tempo de contato têm sido estudados em várias frutas e vegetais^{2,25-29}.

Tipo e concentração do agente osmótico

Como já foi dito antes, durante o processo

osmótico de desidratção observam-se três tipos básicos de transferência de massa que ocorrem simultaneamente: a saída de água do produto para a solução hipertônica, a saída de alguns solutos do produto e a entrada de soluto da solução para o produto. A partir desta transferência é possível introduzir uma quantidade desejada de princípio ativo, agente conservante, qualquer soluto de interesse nutricional ou que seja capaz de conferir ao produto uma melhor qualidade sensorial¹⁶. A Figura 3 mostra um fluxograma das principais etapas do processo de desidratção osmótica.

Durante o processo de desidratção, alguns solutos presentes no xarope podem não migrar efetivamente para as células das frutas e hortaliças, mas tão somente penetrar nos espaços intracelulares e ali se alojar, em razão das alterações na permeabilidade e seletividade da estrutura do tecido celular devido à maturação, condições de estocagem e pré-tratamentos químicos sofridos pelo produto^{4,5,10}. Essa impregnação do soluto no alimento, de certo modo, possibilita a formulação de produtos funcionais e favorece a preservação sensorial e nutricional dos mesmos, sendo um diferencial dentre os demais processos de desidratção³⁰.

A escolha do soluto é uma questão fundamental por estar relacionada com as alterações nas propriedades sensoriais e no valor nutricional do produto final, além do custo de processo. Características dos agentes osmóticos usados, como seu peso molecular e comportamento iônico, afetam significativamente a desidratção, tanto na quantidade de água removida quanto no ganho de sólidos⁵. A sacarose é tida como um ótimo agente osmótico, especialmente quando a DO é empregada como etapa preliminar à secagem convectiva, pois previne o escurecimento enzimático e a perda de aromas. É esperado que quanto maior a concentração de sacarose na solução osmótica, maior é o ganho de sólidos nas frutas².

O uso de cloreto de sódio como agente osmótico é desejável quando o gosto de sal mantém ou melhora o sabor do produto processado. Constitui um excelente agente osmótico, e pode ser usado combinado com a sacarose⁵.

Estudos demonstrando o uso combinado do sal e da sacarose como agentes osmóticos devem ser realizados antes da adequação das etapas do processamento. Na desidratção de abóbora foi possível perceber que quanto maior o teor de sacarose na solução e maior o tempo de DO, maior o conteúdo de sacarose e menor o

teor de sal. Isso ocorre por que o ganho de sal em geral ocorreu preponderantemente na primeira hora de DO, enquanto que o de sacarose prosseguiu na segunda hora de processo. Portanto, a massa de sacarose contribuiu para diminuir o teor de sal na massa seca total, após 2 h de DO²⁶.

Em cupuaçu, quando foi comparado o uso de uma solução binária (sacarose a 40 °Brix) e solução ternária (80 % de sacarose + 20 % de cloreto de sódio) foi observado uma redução de 14,75 % e 25,08 %, respectivamente na umidade do produto. A maior eficiência da solução sacarose + sal é resultado do gradiente criado tanto pelo sal como pela sacarose, que favorece a remoção de uma maior quantidade de água das células. Também, o sal inibe a formação da barreira de açúcar, ocasionando também maiores taxas de desidratção³.

Outros agentes desidratantes já foram testados: açúcar invertido em abacaxi²⁵, combinação de açúcar invertido, sucralose e sacarose em goiaba³¹, maltose em melão²² e fruto-oligossacarídeos em maçãs^{17,18,32}.

Queiroz et al³¹ combinando agentes osmóticos (sacarose, sucralose e açúcar invertido), observou que a perda de água é significativamente menor nas amostras submetidas à solução de sacarose (0,3 g.mL⁻¹) e sucralose (0,2 g.L⁻¹) e maior em soluções de açúcar invertido. Este comportamento ocorre possivelmente devido ao efeito osmótico mais acentuado do açúcar invertido por conter monossacarídeos (glicose e frutose) que exercem maior efeito osmótico que a sacarose, devido sua menor massa molecular. Menor massa molecular do agente osmótico facilita a penetração nos tecidos vegetais e dificulta a formação de camada nas periferias, impedindo a cristalização e permitindo a maior saída de água³³.

Agentes osmóticos que acrescentam valor nutricional aos alimentos, como é o caso dos fruto-oligossacarídeos, que aumentam o teor de fibras solúveis quando ingeridos na dieta humana, já foram estudados para serem usados na desidratção osmótica de maçã^{17,18,32}. A única restrição com relação ao uso deste produto no processo de DO é pelo seu custo mais elevado e serem necessárias soluções com altas concentrações de agentes desidratantes. Portanto, seria necessário um estudo para a reutilização desta solução ou para a recuperação deste ingrediente da solução.

Tempo, temperatura e agitação da desidratção osmótica

No geral, quanto maior o tempo e a temperatura de imersão em solução osmótica maior a incorporação

de sólidos nos produtos vegetais. A agitação é muito utilizada no processo osmótico por que os fluxos contínuos de entrada de sólidos e saída de água criam gradientes em volta do produto vegetal dificultando a continuidade destes fluxos^{5,6}.

Veja-Gálvez et al³⁰ estudaram o efeito da concentração (40, 50 e 60 %) e da temperatura (30, 40, 50 °C) da solução sobre a desidratção osmótica na papaia chilena (*Vasconcellea pubescens*). Quando se aumenta a concentração da solução acontece maior remoção de água, sendo que ela é mais alta na concentração de 60 % para todas as temperaturas e o mesmo aconteceu com os sólidos solúveis. Isto indica que a temperatura não teve influência sobre a difusividade efetiva da água e dos sólidos solúveis neste caso.

A maior perda de água do processo de DO ocorre nos primeiros 30 min do processo pela alta diferença de gradiente sólido-solução existente¹⁰. Em abacaxi^{25,34} e em goiabas³¹ os parâmetros que caracterizam a transferência de massa deixaram de apresentar diferenças significativas depois de 45 min de imersão. Entretanto, em jenipapo³⁵ os fluxos de massa em soluções de 30, 50 e 70 % de sacarose, começaram a reduzir consideravelmente depois de 2 h de desidratção osmótica, atingindo o equilíbrio apenas às 12, 24 e 32 h de imersão, respectivamente. Em jaca, a perda de água durante o processo osmótico em concentrações de 40 e 50 °Brix a 43 °C ocorreu mais intensamente durante as primeiras 4 h. Enquanto isso, a incorporação de sólidos é maior nas duas primeiras horas²⁹.

Porto et al³⁶ estudando o processo osmótico para uvas *Crimson Seedless* testou a temperatura (30 a 50 °C), o tempo (1 a 4 h) e concentração de sacarose (40 a 50 °Brix) na perda de umidade, incorporação de sólidos e índice de eficiência de desidratção. Estes autores observaram que dentro das condições estudadas a concentração de sacarose e o tempo de imersão apresentaram efeitos positivos sobre a perda de umidade e a incorporação de sólidos enquanto a temperatura não apresentou influência em nenhuma variável resposta estudada. Neste caso, a melhor condição para desidratção osmótica da uva para maior índice de desidratção é quando este processo é realizado em solução osmótica com 42 °Brix, por 1,6 h de imersão e a 46 °C.

Assim, para definir a eficiência dos processos osmóticos é preciso considerar o tipo de agente osmótico escolhido, a temperatura e o tempo de processo. Além disso, cada tecido vegetal apresenta uma permeabilidade ao tipo de agente osmótico.

QUALIDADE DE PRODUTOS DESIDRATADOS OSMOTICAMENTE

Dentre as diversas metodologias utilizadas para melhorar as características sensoriais de frutas e hortaliças desidratadas, a desidratção osmótica, como pré-tratamento, tem apresentado bons resultados.

A qualidade do alimento engloba o aspecto de segurança, suas propriedades nutricionais e sensoriais. A aceitação do produto pelo consumidor está diretamente relacionada com a qualidade do mesmo⁵.

Aspectos nutricionais

O ácido ascórbico ou vitamina C é um poderoso antioxidante naturalmente presente em muitos alimentos. Quanto ao teor de vitamina C, perdas elevadas deste nutriente ocorrem no que se refere ao processamento osmótico quando comparado com frutas *in natura*³⁷. As etapas de corte e agitação expõem a vitamina C ao oxigênio, com conseqüente oxidação³⁸. Além disso, o processo osmótico onde se utiliza o aumento de temperatura é responsável pela degradação térmica desta vitamina²⁷. No entanto, estas perdas de vitamina C diminuem com a realização do processo osmótico como pré-tratamento para a secagem convectiva, como já foi comprovado para laranjas³⁷ e maçã^{17,32}.

Martins et al²⁷ estudando passas de caju elaboradas por desidratção osmótica, concluíram que os maiores teores de vitamina C foram observados após 3 h de imersão na solução osmótica com até 50 °Brix e 40 °C. Entretanto, as perdas de vitamina C foram elevadas (86 a 95 %) quando comparadas ao teor de vitamina C do pseudofruto *in natura*. Estes autores justificam que a redução da estabilidade neste caso aconteceu por que o processamento dos frutos consistiu de corte ao meio, imersão em solução aquosa e secagem em temperaturas de até 65 °C.

O mesmo comportamento ocorre com o conteúdo de fenóis totais e atividade antioxidante. Estudando laranjas desidratadas osmoticamente, Mendes et al.³⁷ observaram perdas de conteúdo fenólico e atividade antioxidante de 45,1 % e 37,3 % menores que na secagem convencional demonstrando a eficiência do processo para a preservação das propriedades funcionais do produto.

Cor

Os pigmentos nos alimentos são instáveis e suscetíveis às reações químicas e bioquímicas que ocorrem durante o processamento ou armazenamento¹.

De grande importância tecnológica é a relação existente entre a cor dos alimentos e outros fatores de qualidade, como a composição química e o grau de desenvolvimento e alteração, sendo estes os motivos para se utilizar a cor como índice de transformações naturais dos alimentos frescos ou de mudanças ocorridas no processo industrial.

Muitos produtos de origem vegetal necessitam que antes da desidratção osmótica seja realizado um tratamento para inibição enzimática como prevenção ao escurecimento enzimático. Estes tratamentos (térmicos ou químicos) modificam a coloração final destes produtos. Campos et al³⁹ estudando o branqueamento com ácido cítrico e ácido ascórbico em carambola realizado anteriormente à desidratção osmótica, observaram que todos os tratamentos conduziram a uma redução no escurecimento (parâmetro L*) da carambola, independente da concentração de ácido cítrico utilizada. Menores concentrações de ácido cítrico ou ácido ascórbico no branqueamento, foram menos eficientes em evitar o escurecimento enzimático. Em maçãs, quando o branqueamento utilizando inativação térmica (70 °C por 3 min) foi comparado com o tratamento químico (imersão em solução de 1 % em ácido cítrico por 15 min), foi observado que este último é mais eficiente em manter os valores de L* mais altos.¹⁷

Demczuk Junior et al⁴⁰ avaliaram pré-tratamentos de ácido cítrico, ácido ascórbico e cloreto de cálcio e compararam com o tratamento controle em desidratção osmótica de kiwi. Foi observado que a maior variação total de cor aconteceu no pré-tratamento das fatias em ácido cítrico e o menor valor para o tratamento controle. As fatias de kiwi sofreram alterações nos parâmetros de cor ao longo do tempo de processamento osmótico, tornando-se mais escuras (diminuição de L*), menos verdes (aumento de a*) e menos amarelas (diminuição de b*). As amostras do tratamento controle sofreram as maiores variações na luminosidade L*, já as fatias pré-tratadas com cloreto de cálcio foram as que melhor mantiveram a cor original do kiwi.

Mendes et al³⁷ estudando laranjas desidratadas osmoticamente e submetidas a secagem não encontraram diferença significativa ($p < 0,05$) comparadas àquelas somente submetidas a secagem convectiva para o parâmetro L*. Diferente disso, para pêssegos²⁸ houve diminuição significativa neste parâmetro que, em conjunto com um aumento no parâmetro a* (vermelho) poderia estar associada com as reações de escurecimento enzimático\não enzimático. Além disso, em pêssegos

foi observado que houve conservação do parâmetro de maior importância para determinar a cor amarelo destes frutos (parâmetro b^* referente à cor amarelo). Este comportamento é atribuído à lipossolubilidade do pigmento e/ou a menor exposição da fruta ao ar, que causaria menor oxidação do pigmento.

Textura

Nas frutas, as propriedades mecânicas estão intimamente ligadas à estrutura celular. A firmeza da parede celular está relacionada com a composição de pectina na sua estrutura mais externa, conhecida como lamela média. A sua importância está no efeito “ligante” que promove na parede celular, provocando a adesão das células entre si. Além de variar de acordo com o grau de maturação da fruta, a pectina é bastante sensível ao calor, podendo alterar sua composição na lamela média, conforme a intensidade do processo de desidratção osmótica ou secagem⁴¹.

O processo tem grande aplicabilidade em alimentos sólidos de todos os tipos como, frutas, hortaliças, carnes, ervas, etc. Durante o processo podem ser aplicados pectina e íons cálcio como revestimento com a finalidade de manter ainda mais as características desejáveis do alimento²⁰.

A desidratção osmótica favorece a maciez do tecido e o menor encolhimento durante a secagem devido à impregnação do soluto desidratante durante o processamento. Isto faz com que quanto maior a entrada de sólidos, menor seja a resistência à compressão do produto comparado com o não desidratado osmoticamente⁴².

Germer et al²⁸ estudando a desidratção osmótica em pêssegos variando a temperatura (30 a 50 °C) e a concentração de xarope de sacarose (45 a 65 °Brix) e secos em secagem convectiva à 65 °C observaram o aumento da força máxima aplicada na análise de textura instrumental. Os valores de força máxima foram três vezes maiores em pêssegos desidratados osmoticamente e secos por secagem convectiva (53 a 74 N) que o necessário para corte de fruta *in natura* (16 a 24 N).

Os processos combinados de desidratção osmótica e secagem com ar quente podem fornecer produtos mais tenros a baixas atividades de água que produtos desidratados sem pré-tratamento, o que pode ser agradável para comer na forma de “snacks” ou para incorporar em produtos de panificação, sorvetes, queijos ou iogurte³.

Ferrari et al²³ estudou a influência do lactato de cálcio (0, 0,5, 1,0 e 1,5 %, p/v) e do tipo de açúcar (sacarose ou maltose, 40 °Brix) nas propriedades mecânicas de pedaços de melão desidratados osmoticamente. A adição de lactato de cálcio na solução osmótica de sacarose ou maltose resultou em maiores valores de tensão na ruptura para as frutas (maior manutenção da textura), sendo que tal aumento foi mais pronunciado nos ensaios com sacarose, devido à maior incorporação de cálcio observada nesses tratamentos. O lactato de cálcio mostrou-se eficiente na preservação da estrutura celular das amostras em concentrações de até 1,0 %.

Assim, a desidratção osmótica, apesar de diminuir a rigidez da parede celular, aumenta a força máxima aplicada pela incorporação de sólidos durante a impregnação.

ATIVIDADE DE ÁGUA

Em geral, o objetivo da desidratção osmótica é maximizar a perda de água, e ao mesmo tempo, minimizar o ganho de soluto por parte do sólido. Contudo, a DO geralmente não é capaz de abaixar a atividade de água a níveis que dispensem técnicas adicionais para conservação de alimentos. Os autores concordam que a desidratção osmótica não deve ser utilizada como único tratamento, pois os valores de atividade de água obtidos com a realização deste tratamento não garantem a estabilidade física, química e microbiológica do alimento. Assim, são necessários outros métodos de conservação para complementar esta técnica, diminuindo a atividade de água até um valor que garanta a estabilidade durante o armazenamento do produto, conforme relatado por vários autores^{17,20,32}. Diferente disto, Martins et al²⁷ desidratando pseudofrutos de caju-do-cerrado conseguiu a estabilidade do seu produto ($A_w < 0,60$) somente com a utilização da desidratção osmótica.

TRATAMENTOS FINAIS

Segundo vários autores que estudaram a combinação de secagem convectiva e desidratção osmótica, as amostras desidratadas osmoticamente requerem menor tempo de secagem que as amostras sem esse pré-tratamento⁴¹. Outra vantagem da desidratção osmótica como pré-tratamento antes da secagem convectiva de alimentos é que ela minimiza os impactos negativos desta última, como perda de aroma,

escurecimento enzimático e perda da cor natural dos alimentos¹⁶. Além disso, também tem sido observado um efeito protetor sobre a estrutura do alimento, gerando produtos mais flexíveis e macios⁵.

Perez et al³, estudando a desidratção osmótica como pré-tratamento antes da secagem convectiva em cupuaçu, observou que houve redução no tempo de secagem quando uma solução binária (sacarose a 40 °Brix) foi usada na solução osmótica. Esta observação é um bom indicativo de redução do custo com energia elétrica na secagem convectiva.

Queji et al² avaliando a secagem após a desidratção osmótica de tomates observaram menor tempo de secagem convectiva. Os tomates que ficaram imersos em solução osmótica apresentaram umidade inicial anterior à secagem convectiva menor e, por isso, foi gasto um menor tempo para a concentração dos sólidos incorporados e das substâncias presentes naturalmente no tomate. Estes autores concluíram que a perda de água e a incorporação de sólidos variaram em cada caso, mas as vantagens como redução de tempo de secagem, manutenção da boa aparência do produto e maior rendimento econômico, estão sempre presentes.

Apesar do uso mais comum ser a desidratção osmótica como pré-tratamento para a secagem convectiva, este processamento também já foi utilizado como pré-tratamento em goiabas minimamente processadas⁴³. Em goiabas minimamente processadas por desidratção osmótica branda, acompanhada de armazenamento em embalagens de polietileno tereftalato e estocadas à 5 °C foi verificado uma vida de prateleira de 24 dias resultando num produto mais estável à contaminação microbiológica e de melhor aceitação pelo consumidor.

Existem estudos que utilizam o tratamento osmótico como pré-tratamento para o congelamento. Em variedade de morangos submetidos ao processo osmótico na presença de íons cálcio e submetidos ao congelamento, foi observado uma maior dureza, melhorando a aparência global e uma maior retenção de água no descongelamento destes produtos²⁰. Outros autores fazendo um estudo semelhante, também em morangos, afirmaram que a melhora na retenção de água nas células vegetais é devido a uma menor quantidade de cristais de gelo provocando menores danos nas células.⁴⁴ Assim, são necessários estudos para avaliar o melhor tratamento final que poderia ser realizado com frutas e vegetais que garantam a sua qualidade microbiológica

e físico-química, suas características físicas e sensoriais desejáveis.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A atividade de água de produtos desidratados osmoticamente é, normalmente, alta ao final do processo, fazendo com que estas frutas e hortaliças sejam consideradas perecíveis. Assim, desidratção osmótica é um pré-tratamento que pode agregar valor no produto final, seja ele refrigerado, congelado ou desidratado mantendo características como cor, pela concentração de pigmentos, e textura, pela manutenção da estrutura celular ou impregnação de solutos em frutas e hortaliças.

REFERÊNCIAS

1. Chitarra MIF, Chitarra ABC. Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio. Lavras: UFLA, 2005.
2. Queji MFD, Pessoa LS. Influência do tratamento osmótico na produção de tomate desidratado. *Rev Bras Tecnol Agroind*. 2011;5(1):282-92.
3. Perez LG, Oliveira FMN, Andrade JS, Moreira Filho M. Cinética de secagem da polpa de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) pré desidratada por imersão-impregnação. *Rev Ciênc Agron*. 2013;44(1):102-6.
4. Torreggiani D, Bertolo G. Osmotic pre-treatments in fruit processing: chemical, physical and structure effects. *J Food Eng*. 2001;49(1-2):247-53.
5. Lenart A. Osmo-convective drying of fruits and vegetables: technology and application. *Dry Technol*. 1996;14(2):391-413.
6. Raoult-Wack AI. Recent advances in the osmotic dehydration of foods. *Trends Food Sci Technol*. 1994;5(8):255-60.
7. Germer SPM, Queiroz MR, Aguirre JM, Barbari SA, Silveira NFA. Reuse of Sucrose Syrup in the Osmotic Dehydration of Peaches. *Dry Technol*. 2012;30(14):1532-40.
8. Oliveira LA, Lordelo FS, Tavares JTQ, Cazetta ML. Elaboração de bebida fermentada utilizando calda residual da desidratção osmótica de abacaxi (*Ananas comosus* L.). *Rev Bras Tecnol Agroind*. 2012; 6 (1): 702-12.
9. Oliveira LA, Lordelo FS, Tavares JTQ, Cazetta ML. Aproveitamento da calda residual da cristalização de jaca (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) para elaboração de bebida fermentada. *Magistra*. 2013; 25 (2): 157-63.
10. Kowalska H, Lenart A. Mass Exchange during osmotic pretreatment of vegetables. *J Food Eng*. 2001; 49 (2-3): 137-40.
11. Lewicki PP, Pawlak G. Effect of drying on microstructure of plant tissue. *Dry Technol*. 2003; 21 (4): 657-83.
12. Puigalli JR, Jomaa W, Jannot Y. Shrinkage and density evolution during drying of tropical fruits: application to banana. *J Food Eng*. 2004; 64 (1): 103-9.
13. Simal S, Deya R, Frau M, Rossello C. Simple modelling o fair drying curves of fresh and osmotically pre-dehydrated apple cubes. *J Food Eng*. 1997; 33 (1-2): 139-150.

14. Barat JM, Fito P, Chiralt A. Modeling of simultaneous mass transfer and structural changes in fruit tissues. *J Food Eng*. 2001; 49 (2-3): 77-85.
15. Paes SS, Stringari G B, Laurindo JB. Effect of vacuum impregnation temperature on the mechanical properties and osmotic dehydration parameters of apples. *Braz Arch Biol Technol*. 2008; 51 (4): 799-806.
16. Ponting JD, Watters GG, Forrey RR, Jackson R, Stanley WL. Osmotic Dehydration of Fruits. *Food Technol*. 1966; 20 (10): 125-8.
17. Egea MB, Silva RSSF, Yamashita F, Borsato D. Optimizing dehydration of apples *Malus Domestica* with fructo-oligosaccharide incorporation. *Braz Arch Biol Technol*. 2012; 55 (5): 751-62.
18. Matussek A, Czukur B, Merész P. Comparison of sucrose and fructo-oligosaccharides as osmotic agents in apple. *Innov Food Sci Emerg Technol*. 2008; 9 (3): 365-73.
19. Pereira LM, Carmello-Guerreiro SM, Hunbinger MD. Effect of calcium salts on the texture, structure and sensory acceptance of osmotically dehydrated guavas. *J Sci Food Agric*. 2007; 87 (6): 1149-56.
20. Buggenhout SV, Grauwet T, Loey AV, Hendrickx M. Use of pectinmethylesterase and calcium in osmotic dehydration and osmodehydrofreezing of strawberries. *Eur Food Res Technol*. 2008; 226 (5): 1145-54.
21. Quiles A, Hernando I, Pérez-Munuera I, Llorca E, Larrea V, Lluch MA. The effect of calcium and cellular permeabilization on the structure of the parenchyma of osmotic dehydration 'granny smith' apple. *J Sci Food Agr*. 2004; 84 (13): 1765-70.
22. Martín-Diana AB, Ricoa D, Frías JM, Barat JM, Henehana GTM, Barry-Ryana C. Calcium for extending the shelf life of fresh whole and minimally processed fruits and vegetables: a Review. *Trends Food Sci Tech*. 2007; 18 (4): 210-8.
23. Ferrari CC, Yassui PY, Carmello-Guerreiro SM, Hubinger MD. Propriedades mecânicas e estrutura celular de melão desidratado osmoticamente em soluções de sacarose ou maltose, com adição de lactato de cálcio. *Ciênc Agrotec*. 2011; 35 (4): 765-73.
24. Rastogi NK, Raghavarao KSMS, Niranjana K, Knorr D. Recent development in osmotic dehydration: methods to enhance mass transfer. *Trends Food Sci Tech*. 2002; 13 (2): 48-59.
25. Dionello RG, Berbert PA, Molina MAB, Pereira RC, Viana AP, Carlesso VO. Secagem de fatias de abacaxi in natura e pré-desidratadas por imersão-impregnação: cinética e avaliação de modelos. *Ciênc Tecnol Alimen*. 2009; 29 (1): 232-40.
26. Borin I, Frascareli EC, Mauro MA, Kimura M. Efeito do pré-tratamento osmótico com sacarose e cloreto de sódio sobre a secagem convectiva de abóbora. *Ciênc Tecnol Alimen*, 2008; 28 (1): 39-50.
27. Martins MCP, Cunha TL, Silva MR. Efeito das condições da desidratação osmótica na qualidade de passas de caju-do-cerrado. *Ciênc Tecnol Alimen*. 2008; 28 (Supl): 158-65.
28. Germer SPM, Queiroz MR, Aguirre JM, Berbari SAG, Anjos VD. Desidratação osmótica de p esegos em função da temperatura e concentração do xarope de sacarose. *Rev Bras Eng Agr c Ambient*. 2011; 15 (2): 161-9.
29. Duarte MEM, Ugulino SMP, Mata Merm, Gouveia DS, Queiroz AJM. Desidratação osmótica de fatias de jaca. *Rev Ci nc Agron*. 2012; 43 (3): 478-83.
30. Vega-Gálvez A, Palacios M, Boglio F, P ssaro C, Jer z C, Lemus-Mondaca R. Deshidratación osmótica de La papaya chilena (*Vasconcellea pubescens*) e influencia de la temperatura y concentración de la solución sobre la cinética de transferencia de materia. *Ci nc Tecnol Alimen*. 2007; 27 (3): 470-7.
31. Queiroz VAV, Berbert PA, Molina MAB, Gravina GA, Queiroz LR. Mecanismos de transfer ncia de massa na desidratação osmótica de goiaba em soluç es de sacarose, sucralose e a c car invertido. *Revista Eng Agr c*. 2010; 30 (4): 715-25.
32. Egea MB, Borsato D, Silva RSSF, Yamashita F. Osmo-dehydrated functional product containing fructo-oligosaccharides: physical, chemical and sensorial characteristics. *Braz Arch Biol Technol*. 2012; 55 (6): 927-36.
33. Riva M, Campolongo S, Leva AA, Maestrelli A, Torreggiani D. Structure-property relationships in osmo-air-dehydrated apricot cubes. *Food Res Int*. 2005; 38 (5): 533-42.
34. Dionello RG, Berbert PA, Molina MAB, Viana AP, Carlesso VO, Queiroz VAV. Desidratação por imersão-impregnação de abacaxi em soluções de sacarose e em xarope de a c car invertido. *Ciênc Tecnol Alimen*. 2007; 27 (4): 787-92.
35. Andrade SAC, Neto BB, Nóbrega AC, Azoubel PM, Guerra NB. Evaluation of water and sucrose diffusion coefficients during osmotic dehydration of jenipapo (*Genipa americana* L.). *J Food Eng*. 2007; 78, (2): 551-5.
36. Porto MAL, Guerra NB, Vasconcelos MAS, Siqueira AMO, Andrade SAC. Otimização da desidratação osmótica de uva Crimson Seedless. *Rev Ciênc Agron*. 2014; 45 (2): 249-56.
37. Mendes GRL, Freitas CH, Scaglioni PT, Schmidt CG, Furlong EB. Condições para desidratação osmótica de laranjas e as propriedades funcionais do produto. *Rev Bras Eng Agríc Ambient*. 2013; 17 (11): 1210-6.
38. Fernandes AG, Maia GA, Souza PHM, Costa JMC, Figueredo RW, Prado GM. Comparação dos teores de vitamina C, carotenoides totais, antocianinas totais e fenólicos do suco tropical de goiaba nas diferentes etapas de produção e influência da armazenagem. *Aliment Nutr*. 2007; 18 (4): 431-8.
39. Campos CDM, Sato ACK, Tonon RV, Hubinger MD, Cunha RL. Effect of process variables on the osmotic dehydration of star-fruit slices. *Ciênc Tecnol Alimen*. 2012; 32 (2): 357-65.
40. Demczuk Junior B, Fachin DT, Ribani RH, Freitas FJS. Degradação da cor e do ácido ascórbico na desidratação osmótica de kiwi. *Boletim CEPPA*. 2008; 26 (2): 229-38.
41. Brandelero RPH. Processamento de Abacaxi por Métodos Combinados [dissertação de mestrado] Londrina (PR): Universidade Estadual de Londrina; 2001.
42. Lewicki PP, Lukaszuk A. Effect of osmotic dewatering on rheological properties of apple subjected to convective drying. *J Food Eng*. 2000; 45 (3): 119-26.
43. Pereira LM, Rodrigues ACC, Sarantópoulos CIGL, Junqueira VCA, Cardello HMAB, Hubinger MD. Vida-de-prateleira de goiabas minimamente processadas acondicionadas em embalagens sob atmosfera modificada. *Ciênc Tecnol Alimen*. 2003; 23 (3): 427-33.
44. Moraga G, Martínez-Navarrete N, Chiralt A. Compositional changes of strawberry due to dehydration, cold storage and freezing – thawing processes. *J Food Process Pres*. 2006; 30 (4): 458-74.

Monitoring the extraneous matters in pulps of tomato, guava, mango and strawberry marketed during the seasons of the year

Monitoramento de matérias estranhas em polpas de tomate, goiaba, manga e morango adquiridas no comércio durante as estações do ano

RIALA6/1622

Márcia Bittar ATUI*, Augusta Mendes da SILVA, Maria Aparecida Moraes MARCIANO, Viviane Acosta FRANCO, Lidia Berenice CHASIN, Antônio Roberto FERREIRA, Maria Isabel Andrekowisk FIORAVANTI, Elaine Cristina de MATTOS, Márcia Dimov NOGUEIRA

*Endereço para correspondência: Núcleo de Morfologia e Microscopia, Centro de Alimentos, Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr. Arnaldo, 355, Cerqueira César, CEP 01246-000, São Paulo/SP, Brasil. E-mail: marcatui@terra.com.br

Agencia financiadora: CNPq e MAPA

Recebido: 11.08.2014 - Aceito para publicação: 17.12.2014

ABSTRACT

Fruit-derived products sold in Brazil and for exportation are required to comply with the quality and safety standards. These products and, among them, the fruit pulps may contain extraneous materials due to the inappropriate conditions or practices during their production, storage and distribution, including filth, decomposed material and miscellaneous materials. This study aimed at evaluating the sanitary conditions (regarding to extraneous materials) of fruit pulps sold in the Great São Paulo, during the four seasons of 2010. This investigation analyzed 115 tomato pulp, 93 guava pulp, 99 strawberry pulp and 89 mango pulp by means of the techniques described in the AOAC, 18th, 2005, Chapter 16 - Extraneous Materials: Isolation. Insect fragments were the most frequent filth category detected in the pulps (in 93 % of guava and strawberry, 77 % of tomato and 48 % of mango samples), followed by the rodent hair (in 24 % of tomato, in 3 % of guava, in 1 % of strawberry and in 0.5 % of mango samples). The occurrence of mites was mostly frequent in strawberry samples (33 %). This study indicated that the majority of the analyzed pulps showed satisfactory sanitary conditions, evidencing that the Good Manufacturing Practices was adopted by the productive sector.

Keywords. fruit pulps, insect fragments, rodent hair, mites.

RESUMO

Os produtos derivados de frutas comercializados no Brasil e os exportados exigem do setor produtivo o atendimento aos padrões de qualidade e segurança. Esses produtos, dentre eles, as polpas de frutas podem conter matérias estranhas em função de condições ou práticas inadequadas de produção, armazenamento ou distribuição, incluindo-se sujidades, material decomposto e materiais diversos. No presente estudo foram avaliadas as condições sanitárias (presença de matérias estranhas) de polpas de frutas comercializadas na Grande São Paulo, durante as quatro estações do ano de 2010. Foram analisadas 115 amostras de polpa de tomate, 93 de polpa de goiaba, 99 de polpa de morango e 89 polpas de manga, empregando-se as técnicas descritas na AOAC, 18 ed, 2005, Capítulo 16 - Matérias Estranhas: Isolamento. Os fragmentos de insetos foram detectados na maior porcentagem de amostras (em 93 % de goiaba e de morango, em 77 % de tomate e 48 % de manga), seguidos de pelos de roedor (24 % em tomate, 3 % em goiaba, 1 % em morango e 0,5 % em manga). Os ácaros foram mais frequentes nas amostras de morango (33 %). No geral, a maioria das polpas analisadas apresentou condições sanitárias satisfatórias, o que indica que as Boas Práticas de Fabricação foram adotadas pelo setor produtivo.

Palavras chaves. polpas de frutas, fragmentos de insetos, pelos de roedor, ácaros.

INTRODUCTION

Fruits play an important role in human health, due to their nutritional value, and they are well accepted because of their aroma and flavor. Currently, there is an overall incentive to increase consumption of products that improve quality of life, including fruits, since they are sources of vitamins, minerals, carbohydrates and fibers. Fruit production is subject to fluctuations owing to several factors such as climatic conditions. Some fruits are likely to be sensitive to crushing and consequently decomposition thus requiring rapid consumption. Industrialization allows the effective use of harvesting by manufacturing byproducts, including fruit pulp, which is used as a raw material in the preparation of jams, sweet paste, nectars and other products¹.

The diversity of fruit-derived products developed and distributed in the Brazilian market and also exported requires adherence to quality and safety standards by the fruit pulp industry so that its products meet current regulations to satisfy the increasingly demanding consumers.

The Brazilian laws implemented to ensure the quality of these products are: Normative Instruction N° 01/2000 of the MAPA (Ministry of Agriculture, Livestock and Supply)², Resolution RDC N° 272/2005 ANVISA/MS (National Agency of Sanitary Surveillance/Ministry of Health)³, Resolution RDC N° 14/2014 ANVISA/MS (National Agency of Sanitary Surveillance/Ministry of Health)⁴, Ordinance N° 326/1997 of the SVS/MS (Secretariat of Health Surveillance/Ministry of Health)⁵, and Resolution RDC N° 218/2005 ANVISA/MS (National Agency of Sanitary Surveillance/Ministry of Health)⁶.

According to the Normative Instruction N° 01/2000 of the MAPA², fruit pulp is the non concentrated, unfermented undiluted product from the edible part of the fruit, obtained from fleshy, healthy and ripe fruit by means of a technological process able to keep the minimum total solids, with physical, chemical and organoleptic characteristics of the fruit. It should not contain dirt, filth, parasites, insect fragments and pieces of non-edible parts of the fruit and plant.

Extraneous materials may be present in the pulps due to inappropriate conditions or practices for production, storage and distribution, including filth, decomposed materials and various materials such as soil, sand, glass and other foreign elements⁷.

Filth is defined as any foreign element to the product resulting from livestock contamination (rodents, insects or birds) or any other objectionable matter due to inadequate handling, processing and distribution⁷.

Among the extraneous materials of biological origin, adult insects and their intermediate stages such as eggs, larvae and pupae are found more frequently⁸. Other extraneous materials of biological origin that can be found in food are mammal hair. Its detection may indicate product contact with animals or their excrement and / or urine. Among mammals, some have a habit of licking themselves, at which time they swallow their own hair and as it is not digested by their digestive system, it is later eliminated in their feces⁹.

Birds can also contaminate foods, being considered vectors, hosts or carriers of various pathogens. Parasites, mites and lice may be present in the feather barbules that come off and may fall into the product. In addition, if *Salmonella* is present in the digestive tract of the bird, it may contaminate the food through its excrements¹⁰⁻¹².

The aim of this study was to evaluate the health conditions of the fruit pulp sold in Greater São Paulo area, during the four seasons, analyzing and identifying the extraneous materials recovered from it.

This study provides occurrence of extraneous materials such as: whole insects, insect fragments, mites and rodent hair in the pulp of guava, tomato, strawberry and mango, in the pulps marketed in the Greater São Paulo area as well as subsidies so that tolerance limits can be set for these materials in the regulatory laws.

This study contributes to data that provide subsidies to assessments of fruit pulp especially because it samples were collected during the seasons, allowing not only evaluate the contamination by extraneous materials and also draw a profile of the quality of the pulps fruit.

MATERIAL AND METHODS

Material

A total of 115 samples of tomato pulp, 93 of guava pulp, 99 of strawberry pulp and 89 of mango pulp, purchased from retail stores in the Greater São Paulo area during the spring, summer, autumn and winter of 2010 were analyzed.

Were analyzed 114 samples acquired in summer season (25 of mango, 29 of strawberry, 32 of tomato and 28 of guava pulp), 66 samples acquired in spring season

Table 1. Percentage of samples containing extraneous materials found while monitoring guava pulp, tomato, strawberry and mango

Pulps	Seasons	IF (%)	RH (%)	Mites (%)
Guava	Summer	93	7	7
	Autumn	90	0	14
	Winter	77	5	9
	Spring	76	0	14
	Mean	84	3	11
Tomato	Summer	77	35	7
	Autumn	60	25	0
	Winter	55	14	4
	Spring	50	23	9
	Mean	61	24	5
Strawberry	Summer	93	0	62
	Autumn	87	0	46
	Winter	72	0	11
	Spring	61	4	11
	Mean	78	1	33
Mango	Summer	48	0	0
	Autumn	38	0	0
	Winter	45	1	0
	Spring	22	1	0
	Mean	38	0,5	0

IF: insect fragment, RH: rodent hair

(21 of mango, 22 of tomato and 21 of guava pulp), 96 samples acquired in fall season (21 of mango, 24 of strawberry, 29 of tomato and 22 of guava pulp) and 89 samples acquired during winter season (20 of mango, 18 of strawberry, 29 of tomato and 22 of guava pulp). Those samples were frozen and presented with individual package ready for consumption.

The glassware and consumables used to perform the techniques are described by the Association of Official Analytical Chemistry (AOAC) Official Methods of Analysis of AOAC International, 18th edition, 2005, chapter 16, Extraneous Materials: Isolation^{7,8}.

Insect fragments and rodent hair standards produced at our own laboratory using the techniques described by Brickey et al¹³, with modifications, were used for the control and verification of the analytical methods. Fragments of cockroaches (Order Blattodea) were used instead of the *Tribolium sp* described by the technique mentioned, and fragments of the *Mus musculus*, obtained from the Animal Facility of the Adolfo Lutz Institute of São Paulo.

Methods

The methods used, according to AOAC 2005, technique 16:10:05 - method 964.23 (a) for guava, mango and tomato pulps, and technique 16:10:06 - method 950.89 (a) for strawberry pulp were validated at the Laboratory of Morphology and Food Microscopy Adolfo Lutz Institute of São Paulo. Some adjustments have been made to the analytical methods as they had a better performance to recover the extraneous materials¹⁴.

During the analytical process, insect fragment and rodent hair patterns produced at our own laboratory using the techniques described by Brickey et al¹³ with modifications were used.

To perform the analysis, blank samples were used as an internal control to check for possible contamination of glassware, sieves and other consumables because insect fragments and rodent hairs may remain adhered to the walls of these samples and result in false-positive samples.

RESULTS AND DISCUSSION

The greater recovery of insect fragments in the samples was in summer: 93 % for guava, 77 % for tomato, 93 % for strawberry and 48 % for mango may have been due to the fact that it is the hottest season of the year. This type of extraneous materials was the most prevalent in the pulps analyzed.

Rodent hair was the second most common extraneous material found in the pulps studied; however, the percentage of samples containing this type of extraneous material was not high. Tomato pulp had the highest average (24 %, considering the seasons) of samples containing rodent hairs among the four pulps studied. In guava this average was 3 %, 1 % in strawberry and 0.5 % in mango).

Whole insects, larvae and mites were found in some samples. Table 1 shows the results obtained for guava, tomato, strawberry and mango pulps.

Guava pulp

Guava pulp had the highest average of samples with insect fragments (84 %) compared to other pulps, and in summer and fall the percentage of positive samples was higher, which may be related to climatic factors, because the rise in temperature results in higher occurrence of insects.

Despite the high percentage of samples containing fragments of insects, this number does not exceed the average of 8 per sample, as shown in Figure 1.

Insects belonging to the Order Hemiptera, which are sucking insects that feed on fruit and nectar, were found in these pulps.

Rodent hairs were found in this pulp, but in a small proportion and number (3% on average).

Mites were found in all seasons, and the highest percentage of positive samples was reported in spring and fall (14 %), but not in large quantities.

The presence of mites in this type of pulp was significant and could be related to the incomplete removal of the fruit peel, since mites are found on their surface.

Despite not having been presented in Table 1, bat hairs were found in 2 samples of guava pulp, and one had a tuft containing over 13 hairs, which may be related to the phytophagous feeding habits of these animals. The occurrence of phytophagous bats is connected with climatic conditions; moreover, these bats are found only in tropical and subtropical regions, such as Brazil¹⁵.

Tomato pulp

The insect fragments found in these pulps may be related to the quality of raw materials, inefficient cleaning and processing failures, indicating that the Good Manufacturing Practices were not adopted (Figure 1).

Tomatoes may be attacked by fruit flies (*Drosophila*) hence their eggs and larvae can be found in the final product. This type of insect is found in fruits and decomposing vegetables, leaving eggs on their surface, and in hot weather they complete their life cycle in 8-10 days¹⁰. In this study, insects of the genus *Drosophila* were found in some samples, in addition to other whole unidentified insects.

A sample acquired in winter contained three insect larvae, but these were not identified.

Rodent hairs were found in greater numbers in tomato pulp when compared to the other fruit pulps studied as showed in Table 1. The prevalence of rodent hairs may be related to how tomatoes are grown – they are a creeping plant, grown in open fields. Another factor that may contribute to these numbers is the harvesting process and industrial production. Usually tomatoes are cultivated in crop rotation with corn – a known source of foods for rodents, thus assisting in their reproduction and development. At the end of cultivation, these rodents and/or their residues (hairs and excreta) remain in the soil and during the mechanical harvesting, fruits are collected in deeper areas, carrying waste and/or rodents present in the soil. This occurrence could be minimized by the use of manual harvesting, as fruit selection and separation is more thoroughly¹⁶.

Producers claim that when tomatoes are sprayed with pesticides, the hairs that are stuck on their epidermis by static force are covered by a thin film of chemicals, and their removing become harder during the cleaning process, and therefore their presence may be detected in the final product¹⁶.

The identification of rodent hairs is important because they are indicators of accidental or fecal contamination. These animals represent a serious problem in all phases of processing, production and storage of food, being potential transmitters of a number of diseases including leptospirosis, salmonellosis, plague (bubonic, pneumonic, septicemic) and viruses. Their presence in food makes it potentially harmful to health and is a cause for the non-compliance with the current legislation⁴.

Strawberry Pulp

Insect fragments were found on average in 78 % of strawberry pulp samples, with the highest percentage of positive samples reported in summer and fall. However, the amount of insect fragments was lower than 10, as shown in Figure 1.

Regarding the samples collected in fall, 87 % of them contained insect fragments, and one sample had 20 insect fragments while another, 16. The sample showing 20 fragments also contained 15 eggs of insects and 7 mites. This sample might have been made with raw material of poor quality. These insect fragments were not identified because they were too small to compare with any identification parameter.

Although aphid insects are considered the worst plague in this type of culture in some parts of Brazil, we did not find them in our study. However, we found other insects such as those belonging to the Order Hemiptera (Coccidia) and also to the Order Thysanoptera (thrips)¹⁷.

The presence of mites in strawberry pulps was significant, ranging from 11 % for the samples collected

in winter and spring, up to 62 % for the samples collected in the summer. Despite the lack of identification and classification of the mites found, in 3 samples we found from 2 to 3 of Oribatid mites per sample. This is a species of soil-living mites and their presence in the pulp can be explained by the fact that strawberry is a creeping plant.

Mites are arthropods of the class Arachnida found in various foods, may originate from soil and areas adjacent to the deposits and be carried by insects, birds and rodents. Mites can cause physical damage and carry fungal spores. Some species are considered potential intermediate hosts of parasitic organisms that infect mammals¹⁷.

The mite species that appears most frequently in this type of culture is the spider mite, *Tetranychus urticae*, causing significant damage and losses, and whose control is difficult to be implemented. Mites appear mainly during fruiting and harvest. They adhere to the fruits' surface and may reduce both their quality and quantity^{18,19}.

One factor that may have contributed to the large amount of mites in this type of pulp may be the fact that phytoseiid predatory mites are used as an alternative for

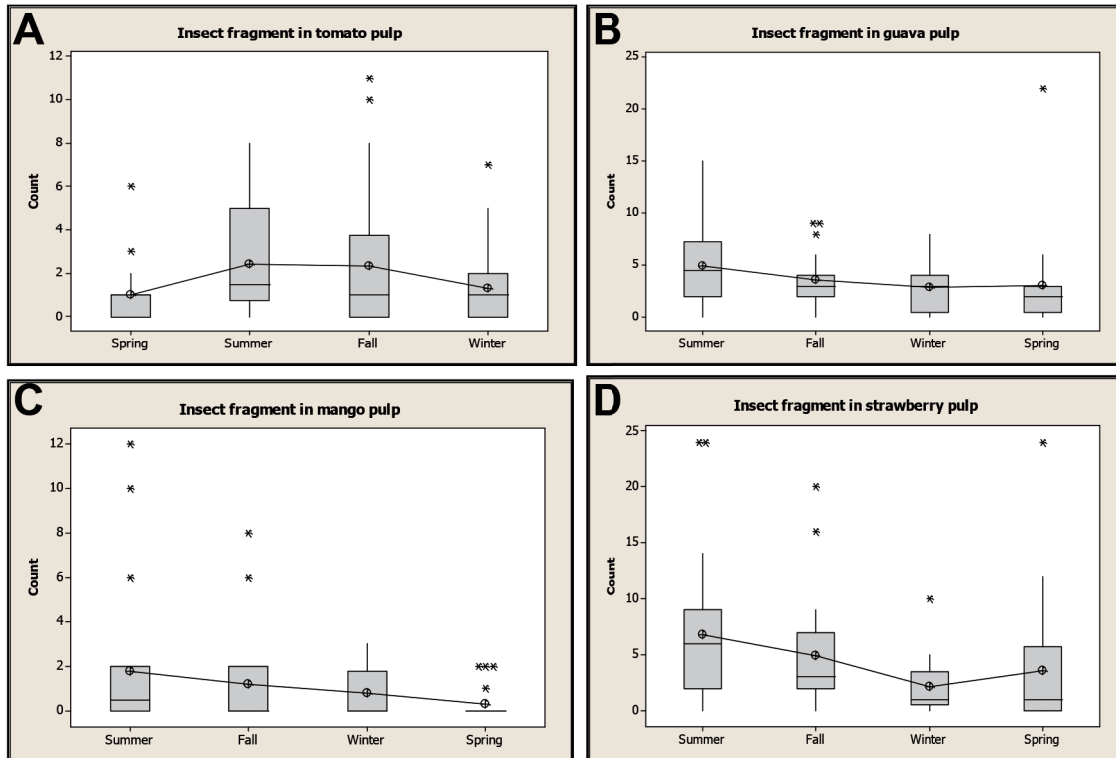


Figure 1. Presence of insect fragments in fruit pulps marketed during the seasons of the year. (A) tomato; (B) guava; (C) mango; (D) strawberry

the biological control of spider mite on strawberry crops, thus resulting in their presence in the final product^{18,19}.

Regarding the presence of rodent hair, its occurrence was not significant in strawberry pulp samples.

Mango pulp

Mango pulp showed the least amount of extraneous materials in comparison with other pulps. This may be related to the pulp processing since total removal of the skin occurs. Among the extraneous materials found, insects of the Order Hemiptera were the most common occurrence, which may be related to their phytophagous diet. Other extraneous materials were recovered, such as bird barbules, bat hairs, eggs, insect fragments and whole insects of other orders (Figure 1).

CONCLUSION

Our study presents an overview of the sanitary conditions of the pulps sold in São Paulo regarding the occurrence of extraneous materials in different seasons. Overall, these results indicate that the fruit pulp industry has adopted the Good Manufacturing Practices.

Even with the adoption of preventive measures, industries claim that the presence of some extraneous materials is inevitable. An example is the occurrence of the rodent hair in tomato pulp, which might be due to how tomatoes are grown thus making it very difficult to be eliminated during the manufacturing process. We believe the same occurs as to the presence of mites in strawberry pulps.

We observed that the highest percentage of samples containing fragments of insects came from those collected in the summer, which may be related to the high temperatures and the insects' life cycle.

This study provided data that can collaborate with the establishment of tolerances for extraneous materials in this type of product.

REFERENCES

1. Correia M. Microscopia alimentar de produtos Industrializados de frutas, comercializados em supermercados de São Paulo, SP [tese de doutorado]. São Paulo (SP): Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo;2000.
2. Brasil. Ministério da Agricultura e Abastecimento. Instrução Normativa nº 1, de 07/01/2000. Regulamento Técnico Geral para fixação dos padrões de identidade e qualidade para polpa de fruta. Diário Oficial [da] União. Brasília, DF, 10 jan. 2000. Seção 1,p.54.
3. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 272, de 22 de setembro de 2005. Regulamento Técnico para produtos de Vegetais, Produtos de Frutas e Cogumelos comestíveis. Diário Oficial [da] União, Brasília, DF, 22 dez. 2005. Seção 1.
4. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 14 de 28 de março de 2014. Dispõe sobre Matérias Estranhas Macroscópicas em alimentos e bebidas, seus limites de tolerância e dá outras providências. Diário Oficial [da] União, Brasília, DF, 31 de março de 2014, Seção 1.
5. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria SVS/MS nº 326, de 30 de julho de 1997. Regulamenta as Condições Higiênico-Sanitárias e de Boas Práticas de Fabricação para Estabelecimentos Produtores/Industrializadores de Alimentos. Diário Oficial [da] União, Brasília, DF, 1 de agosto de 1997. Seção 1.
6. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 218, de 29 de julho de 2005. Dispõe sobre o Regulamento Técnico de Procedimentos Higiênico-Sanitários para Manipulação de Alimentos e Bebidas Preparados com Vegetais. Diário Oficial [da] União. 01 de agosto de 2005.
7. Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis of Association of Official Analytical Chemists.18. ed. Gaithersburg, Method 964.23 A (a) 2011. p.29.
8. Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis of Association of Official Analytical Chemists.18. ed. Gaithersburg, Method 964.23 A (a) 2011. p.30.
9. Vazquez AW. FDA Training Manual for Analytical Entomology in the Food Industry. *In: Gorham JR, editor. Vertebrate pests: Birds, Bats, Rodents. Washington: 1977. p.61-9.*
10. Ziobro GC, Biles V. Regulatory action criteria for filth and other extraneous materials IV. Visual detection of hair in food. *Regul Toxicol Pharmacol.*2000;32:73-7.
11. Jackson WB. Ecology and management of food-industry pests. *In: Gorhan JR, editor. Pest Bird Ecology and Management. Arlington: AOAC; 1991, p.229-236.*
12. Troller JA. Sanitation in food processing. 2ª ed. London (UK): Academic Press; 1993.
13. Brickey PMJr. Extraneous materials in ground cocoa bean products. *J AOAC.*1965;48:543-5.
14. Decker SJ. Extraneous matter in food processing and storage. *Dairy Food Environ Sanit.*1994;14:12-5.
15. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Morcegos em áreas urbanas e rurais: Manual de Manejo e Controle. 1ª ed. Brasília (DF): Ministério da Saúde; 1996.
16. Moretti CL. Proposição de revisão da RDC nº 175 de 8 de julho de 2003 à luz da realidade da cadeia produtiva de tomates para processamento industrial. Brasília (DF): EMBRAPA; 2008.
17. Bernardi D, Araujo ES, Zawadneak MAC, Botton M, Mogor AF, Garcia MS. Aphid Species and Population Dynamics Associated with Strawberry. *Neotrop Entomol.*2013;42(6):628-33.
18. Nogueira MD, Rodrigues RMMS. Vigilância Sanitária: Tópicos sobre Legislação e Análise de Alimentos. *In: Almeida-Muradian LB, organizador. Fiscalização de Alimentos por Análise Microscópica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2007. p.72-80.*
19. Watanabe MA, de Moraes GJ, Gastaldo Jr I, Nicolella G. Controle biológico do ácaro rajado com ácaros predadores fitoseídeos (Acari: Tetranychidae, Phytoseiidae) em culturas de pepino e morango. *Sci Agric.*1994;51(1):75-81.

Avaliação sensorial e da cor objetiva de hambúrgueres congelados formulados com linhaça dourada e derivados

Sensory and objective color evaluation of frozen burgers formulated with golden flaxseed and its byproducts

RIALA6/1623

Daiana NOVELLO^{1*}, Marise Aparecida Rodrigues POLLONIO²

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

²Faculdade de Engenharia de Alimentos, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP.

Recebido: 24.11.2013 - Aceito para publicação: 07.11.2014

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi de elaborar hambúrgueres adicionados de óleo, farinha e semente de linhaça dourada e avaliar as características sensoriais e a cor objetiva durante o período de 90 dias de armazenamento sob congelamento a -18 °C. Os hambúrgueres foram preparados com 5,0 % de óleo, farinha ou semente de linhaça, além da formulação controle. As menores notas para sabor (dia 0) e aroma (dia 60) foram verificadas nas formulações contendo óleo. Constatou-se a ocorrência de maior luminosidade nas formulações com óleo e menor na formulação controle. Em geral, os menores teores de vermelho e maiores de amarelo foram observados após a adição de linhaça e derivados. Concluiu-se que, em geral, a adição de 5,0 % linhaça dourada e de derivados em hambúrgueres bovinos resultou em boa aceitação sensorial pelos consumidores, durante o período de 90 dias de armazenamento; entretanto, foram observadas alterações de cor nos produtos.

Palavras-chave. *Linum usitatissimum* L., alimento funcional, armazenamento, produto enriquecido.

ABSTRACT

This study aimed at elaborating burgers by adding golden flaxseed oil, flour and seed, and to evaluate the sensory characteristics and the objective color during the period of 90 day of frozen storage at -18 °C. The hamburgers were prepared with 5.0 % of oil, flour or seed, and also the control formulation. Lower scores for flavor (day 0) and for aroma (day 60) were observed in the burger formulations containing oil. The highest lightness was detected in formulations made with oil, and the lowest was found in the control formulation. In general, the lowest red contents and the highest yellow ones were observed after adding the golden flaxseed and its byproducts. The addition of 5.0 % golden flaxseed and its byproducts resulted in burgers showing the good sensory acceptance by consumers, during the 90 days of frozen storage; however, color changes were observed in the products.

Keywords. *Linum usitatissimum* L., functional food, storage, enriched product.

INTRODUÇÃO

A carne e produtos cárneos são fontes importantes de muitos nutrientes essenciais. No entanto, alguns dos seus componentes como, por exemplo, a gordura, os ácidos graxos saturados, o colesterol e o sódio têm sido associados a um maior risco de doenças crônicas não transmissíveis¹. Nessa perspectiva, os consumidores vem buscando cada vez mais um consumo alimentar diferenciado, sendo atraídos por alimentos com apelos saudáveis. Um produto com particular interesse pela indústria são os hambúrgueres, por serem amplamente consumidos e apresentarem elevada possibilidade de adição de novos ingredientes².

A linhaça é uma excelente alternativa para suprir a deficiência de ácidos graxos omega 3 (ω -3) nos alimentos processados, uma vez que é a principal fonte de ácido graxo α -linolênico. Esta semente, recentemente, ganhou atenção como um “alimento funcional” por seu perfil nutricional único e pelo potencial de reduzir o risco de doenças cardiovasculares e alguns tipos de câncer³.

Sabe-se que o congelamento desempenha um papel essencial para garantir a segurança dos produtos cárneos. Contudo, existem raras avaliações sobre o efeito do processo de congelamento em hambúrgueres adicionados de ingredientes diferenciados como a linhaça dourada⁴ e, suas consequências na qualidade dos produtos continuam sendo um problema significativo. Destaca-se que o prazo de validade da carne e seus derivados é geralmente determinado pela aparência, textura, sabor, cor, valor nutritivo, dentre outros⁵, os quais podem ser influenciados pelo congelamento, estocagem e um posterior descongelamento. Nesse contexto, para

que novos produtos possam ser oferecidos e aceitos no mercado, são necessários testes constantes que analisem, especialmente, suas características sensoriais e físico-químicas⁶. Diante do exposto, o objetivo desta pesquisa foi elaborar hambúrgueres adicionados de óleo, farinha e semente de linhaça dourada e avaliar suas características sensoriais e cor objetiva durante um período de 90 dias de armazenamento sob congelamento.

MATERIAL E MÉTODOS

Cortes cárneos

Foram utilizados 15 kg de acém e 15 kg de paleta, obtidos em frigoríficos comerciais e transportados refrigerados para o Laboratório de Carnes e Processos da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Os cortes foram subsequentemente removidos das embalagens a vácuo, sendo que toda a gordura externa e os músculos adjacentes foram retirados.

Formulações

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro tratamentos e três repetições.

Foram elaborados hambúrgueres de carne bovina, conforme descrito a seguir: FC: formulação controle, 0 % de linhaça ou derivados; FO: adição de 5,0 % de óleo de linhaça dourada; FF: adição de 5,0 % de farinha e FS: adição de 5,0 % de semente de linhaça dourada. Os teores de linhaça e derivados foram previamente selecionados em ensaios preliminares. Na Tabela 1 estão descritas as formulações dos hambúrgueres de carne bovina, adicionados de linhaça dourada e derivados.

Tabela 1. Formulações de hambúrgueres bovinos adicionados de óleo ou farinha ou semente de linhaça dourada (*Linum usitatissimum* L.)

Formulação/ Ingrediente	FC (g/100g)	FO (g/100g)	FF (g/100g)	FS (g/100g)
Carne bovina	75,85	70,85	70,85	70,85
Gelo em flocos	15,00	15,00	15,00	15,00
Óleo de palma refinado	5,00	5,00	5,00	5,00
Maltodextrina em pó	1,80	1,80	1,80	1,80
Sal refinado	1,50	1,50	1,50	1,50
Alho em pó	0,30	0,30	0,30	0,30
Cebola em pó	0,30	0,30	0,30	0,30
Carragena em pó	0,20	0,20	0,20	0,20
Eritorbato de sódio	0,05	0,05	0,05	0,05
Linhaça e derivados	-	5,00	5,00	5,00

FC: controle; FO: 5,0 % de óleo de linhaça dourada; FF: 5,0 % de farinha de linhaça dourada; FS: 5,0 % de semente de linhaça dourada

Processamento dos hambúrgueres

A carne selecionada à temperatura em torno de 4 °C foi moída em moedor de carnes (C.A.F. máquinas, Modelo 10, Rio Claro/SP, Brasil), em disco de 3 mm. Em seguida, aproximadamente 12 kg de carne (ambos os cortes) foram utilizados para cada uma das 4 formulações. Os seguintes ingredientes foram adicionados a carne e misturados em um processador de alimentos (Filizola, Super Cutter, modelo Sire, São Paulo/SP, Brasil) na seguinte ordem: metade do gelo, condimentos (cebola e alho em pó), eritorbato de sódio e o restante do gelo, sal, carragena, maltodextrina, óleo de palma e o tipo de aditivo de linhaça dourada correspondente (óleo, farinha, ou semente). Após a homogeneização, a formulação foi acondicionada em sacos plásticos de polietileno de baixa densidade (PEBD) e armazenada em freezer, de 0 °C a -1 °C, por aproximadamente 1 hora para facilitar a moldagem. A massa foi moldada em unidades (200 hambúrgueres, em média) de aproximadamente 110 g (10 cm de diâmetro), em hamburgueira manual (Picelli, modelo HP-112/130, Rio Claro/SP, Brasil) e congeladas em câmara frigorífica (-18 °C). As amostras congeladas foram embaladas em sacos plásticos de PEBD, fechados com fita adesiva e guardados em embalagens cartonadas (6 hambúrgueres), codificadas e armazenadas em freezer (-18 °C) durante o período de avaliação de 90 dias.

Cocção dos hambúrgueres

Os hambúrgueres congelados foram grelhados a 200 °C em chapa elétrica, com grelha nos lados superior e inferior (George Foreman Lean Mean Fat Reducing Grilling Machine Jumbo size, GR38SIL Model, Madison/Wisconsin, EUA). A temperatura interna foi controlada por termômetro digital B345 (Micronal, São Paulo/SP, Brasil) com termopar acoplado até que atingisse 75 °C no centro⁷. O tempo de fritura foi em média de 8 a 10 minutos.

Avaliação sensorial

Os testes sensoriais foram conduzidos no Laboratório de Análise Sensorial do Departamento de Tecnologia de Alimentos da UNICAMP, em cabines individuais e com iluminação de cor branca. Participaram da pesquisa 50 provadores, não treinados, em cada bloco de análise. Os julgadores, de ambos os gêneros, com idade entre 18 a 60 anos, foram voluntários presentes entre alunos e funcionários da UNICAMP.

Foram avaliados os atributos aparência, aroma, sabor e textura. As amostras foram analisadas através de

uma escala hedônica estruturada de 9 pontos, variando de desgostei muitíssimo (nota 1) a gostei muitíssimo (nota 9)⁶. Questões de aceitação global e intenção de compra foram aplicadas através de dois pontos específicos entre “sim” compraria a amostra e “não” não compraria a amostra⁸. Cada análise foi realizada especificamente nos dias 0, 30, 60 e 90 após o congelamento (-18 °C) das amostras. Os provadores receberam um pedaço de cada amostra (aproximadamente 10 g), em copos plásticos brancos, codificados com números de três dígitos, em delineamento experimental inteiramente casualizado e balanceado, acompanhados de um copo de água e um biscoito tipo água e sal para serem utilizados entre cada prova. As amostras foram oferecidas de forma monádica sequencial.

Determinação da cor objetiva

Para a leitura da cor objetiva foram utilizados três hambúrgueres de cada tratamento, sendo realizadas três leituras em cada produto, em temperatura ambiente (25 °C). Cada leitura foi resultado da média de três pontos distintos no mesmo lado. Utilizou-se um espectrofotômetro (Hunter-Lab, Colorquest II Model, Reston/VA, EUA) calibrado previamente, operando com iluminante D65, ângulo do observador 10°, no modo RSEX (reflectância especular excluída) e no sistema de cor CIELAB, onde L* representa a luminosidade, oscilando do branco (100 %) ao preto (0 %), (+/-) a*, o eixo vermelho-verde e (+/-) b*, o eixo amarelo-azul. Todas as amostras cruas e grelhadas foram avaliadas mensalmente nos dias 0, 30, 60 e 90, durante o armazenamento sob congelamento (-18 °C).

Questões éticas

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa/Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP (Parecer CEP: N° 274/2009).

Análise estatística

A análise estatística foi realizada por análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste *post-hoc* de Tukey para comparação de médias ao nível de significância de 5 %, utilizando o *software* Statgraphics® Plus, versão 5.1.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliação sensorial

Por meio da Tabela 2 observa-se os resultados da avaliação sensorial dos hambúrgueres para 90 dias de congelamento (-18 °C).

Tabela 2. Avaliação sensorial de hambúrgueres grelhados adicionadas de óleo, farinha ou semente de linhaça dourada, armazenados por 90 dias de congelamento (- 18 °C)

Atributos/ Formulação	Dias de armazenamento			
	0	30	60	90
	Média±DP	Média±DP	Média±DP	Média±DP
Aparência				
FC	7,14±1,50aA	6,98±1,36aA	6,54±1,72aA	6,92±1,41aA
FO	6,92±1,54aA	6,64±1,26aA	6,46±1,75aA	6,92±1,71aA
FF	7,10±1,39aA	6,60±1,76aA	7,08±1,37aA	7,02±1,39aA
FS	6,44±1,75aA	6,00±1,86aA	6,10±1,89aA	6,30±2,05aA
Aroma				
FC	7,21±1,29aA	7,10±1,31aA	7,15±1,46aA	7,11±1,44aA
FO	6,60±1,33aA	6,38±1,72aA	6,28±1,60bA	6,16±1,81bA
FF	6,88±1,45aA	6,44±1,80aA	7,00±1,26abA	6,86±1,60abA
FS	7,70±1,43aA	7,08±1,40aA	7,02±1,25abA	6,74±1,58abA
Sabor				
FC	7,12±1,40aA	6,88±1,45aA	6,82±1,42aA	7,02±1,62aA
FO	6,14±1,58bA	5,32±2,14bA	5,80±1,70bA	5,90±2,10bA
FF	6,54±1,37abA	6,10±2,04abA	6,40±1,75abA	6,28±1,57abA
FS	6,65±1,47abA	6,68±1,46abA	6,44±1,46abA	6,60±1,41abA
Textura				
FC	6,40±1,90aA	6,04±1,65aA	5,80±2,09aA	6,24±1,95aA
FO	6,45±1,41aA	5,92±1,61aA	6,06±1,95aA	6,32±1,87aA
FF	6,37±1,62aA	5,92±1,76aA	6,50±1,78aA	6,76±1,65aA
FS	6,24±2,00aA	5,48±1,89aA	5,72±1,69aA	6,02±1,80aA
Aceitação global positiva (sim)^a (%)				
FC	84,00	76,00	76,00	76,00
FO	50,00	46,00	62,00	60,00
FF	64,00	62,00	72,00	66,00
FS	66,00	64,00	60,00	66,00
Intenção de compra positiva (sim)^a (%)				
FC	84,00	66,00	70,00	72,00
FO	48,00	40,00	54,00	58,00
FF	58,00	54,00	62,00	60,00
FS	60,00	52,00	54,00	56,00

^aBaseado na escala binomial (sim/não) com 50 respostas por bloco de análise; Letras diferentes na linha (maiúsculas) e colunas (minúsculas) indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$); Valores são médias de três repetições; DP: desvio padrão; FC: controle; FO: 5,0 % de óleo de linhaça dourada; FF: 5,0 % de farinha de linhaça dourada; FS: 5,0 % de semente de linhaça dourada

Tabela 3. Parâmetros de cor objetiva L*, a* e b* dos hambúrgueres crus e grelhados adicionados de óleo, farinha ou semente de linhaça dourada, armazenados por 90 dias de congelamento (- 18 °C)

Cor/ Formulação	Dias de armazenamento			
	0	30	60	90
	Média±DP	Média±DP	Média±DP	Média±DP
Produto cru				
L*				
FC	57,01±0,09bA	57,16±0,06bA	56,84±0,04bA	56,94±0,03bA
FO	60,33±0,03aA	60,43±0,06aA	60,40±0,08aA	59,87±0,02aA
FF	54,68±0,08cA	54,66±0,01cA	54,44±0,04cA	54,32±0,05cA
FS	56,49±0,05bA	57,58±0,04bA	57,11±0,08bA	56,94±0,03bA
a*				
FC	19,22±0,01aA	7,85±0,02aB	7,82±0,04aB	7,99±0,04aB
FO	16,71±0,06cA	5,58±0,08cB	4,23±0,06cC	4,27±0,09cC
FF	12,32±0,58dA	7,08±0,04bB	6,32±0,04bB	6,48±0,01bB
FS	18,02±0,78bA	6,81±0,08bB	6,84±0,07bB	6,98±0,08bB
b*				
FC	19,94±0,08cA	16,32±0,01cB	16,54±0,04cB	15,89±0,03cB
FO	21,81±0,05aA	19,29±0,09aB	19,34±0,06aB	19,12±0,01aB
FF	21,01±0,09aA	19,27±0,07aB	19,09±0,08aB	19,81±0,05aB
FS	20,45±0,05bA	18,31±0,08bB	18,27±0,03bB	18,22±0,02bB
Produto grelhado				
L*				
FC	56,51±0,06bA	55,82±0,01bA	55,43±0,07bA	55,24±0,05bA
FO	61,14±0,06aA	59,36±1,04aB	57,32±0,05aC	57,45±0,09aC
FF	54,65±0,07cA	52,20±0,09cB	52,01±0,04cB	52,15±0,05cB
FS	56,52±0,03bA	56,24±0,06bA	56,77±0,07bA	55,99±0,07bA
a*				
FC	6,85±0,07aA	6,09±0,05aB	6,01±0,06aB	6,10±0,02aB
FO	4,58±0,08cA	5,05±0,01bA	5,00±0,09bA	5,01±0,04bA
FF	5,74±0,04bA	5,51±0,01bA	4,71±0,04bB	4,84±0,05bB
FS	5,39±0,05bA	5,36±0,05bA	5,33±0,08bA	5,29±0,03bA
b*				
FC	14,65±0,09cA	14,70±0,04bA	15,01±0,06bA	14,78±0,04bA
FO	17,71±0,09abA	16,81±0,02aAB	17,08±0,03aAB	16,64±0,09aB
FF	18,40±0,09aA	16,55±0,06aB	16,39±0,09aB	15,48±0,03aC
FS	16,58±0,05bA	15,98±0,05aA	15,94±0,03aA	16,26±0,01aA

Letras diferentes na linha (maiúsculas) e colunas (minúsculas) indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$); Valores são médias de três repetições; DP: desvio padrão; FC: controle; FO: 5,0 % de óleo de linhaça dourada; FF: 5,0 % de farinha de linhaça dourada; FS: 5,0 % de semente de linhaça dourada

Não houve diferença significativa entre as formulações nos atributos aparência e textura em 90 dias de armazenamento. A formulação com óleo de linhaça apresentou menores notas que o controle para o atributo aroma nos dias 60 e 90, enquanto que o sabor das amostras foi reduzido em todos os períodos avaliados. Esses resultados concordam com afirmações de Alamanou et al⁹, para os quais o aroma e sabor são, provavelmente, os atributos mais importantes que influenciam nas propriedades sensoriais de produtos cárneos moídos com acréscimo de ingredientes não cárneos. Scheeder et al¹⁰ explicam que esta percepção acentuada no sabor pode ter ocorrido, dentre outros fatores, devido à proporção significativamente maior de ácidos graxos ω -3 em FO, que desempenham um papel como precursores de sabor em reações oxidativas termicamente induzidas¹¹.

A formulação controle obteve a maior porcentagem de relatos positivos para aceitação global e intenção de compra, em 90 dias de armazenamento, sendo que, novamente, FO apresentou a menor aceitação. Segundo Tuorila e Cardello¹², a ocorrência de “*off-flavours*” podem diminuir a probabilidade de “gostar” de um produto e consumi-lo, mesmo com a presença das alegações de saúde de forma convincente.

Cor objetiva

Na Tabela 3 estão descritos os resultados para cor objetiva L^* , a^* e b^* dos hambúrgueres bovinos crus e grelhados adicionados de linhaça dourada, durante o armazenamento (-18 °C).

Nos hambúrgueres crus (dia zero) foram verificados maiores teores de luminosidade em FO, comparado a FC e FS, sendo que os menores teores de L^* foram observados em FF ($p < 0,05$). As amostras com semente (FS) não apresentaram diferença significativa do controle. Ao longo de 90 dias de armazenamento não houve alterações no teor de L^* em nenhuma das formulações.

O teor de vermelho no dia zero foi maior em FC, seguido de FS, sendo que FF apresentou menores valores. Este resultado pode ser atribuído à maior oxidação lipídica dos produtos contendo farinha de linhaça¹³. Segundo Guillevic et al¹⁴, maiores conteúdos de ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) estão associados ao aumento da oxidação lipídica em carnes. Destaca-se que, apesar do óleo de linhaça também apresentar elevados teores de PUFAs, normalmente, adiciona-se vitamina E para evitar o rápido aparecimento de ranço, o que

também pode melhorar sua estabilidade oxidativa¹⁵ e, conseqüentemente, dos hambúrgueres adicionados de FO. Contudo, durante o armazenamento ocorreu diminuição nos teores de a^* , sendo maior em FO. Neste aspecto, a presença de maiores teores de PUFAs no óleo de linhaça e de oxigênio residual durante o armazenamento, podem elevar a degradação da mioglobina para metamioglobina, resultado da oxidação do Fe^{2+} para Fe^{3+} , reduzindo a coloração vermelho brilhante da mioglobina¹⁶.

O conteúdo de b^* (dia zero) apresentou os maiores resultados para FO e FF ($p < 0,05$) e menor para FC, concordando com Bilek e Turhan², que estudaram a adição de farinha de linhaça (3 a 15 %) em hambúrgueres bovinos. Durante o tempo de congelamento, o teor de b^* de todas as formulações apresentou uma diminuição, contudo sem variações após 30 dias.

Nos produtos grelhados (dia zero), o teor de L^* também foi maior em FO ($p < 0,05$) e menor em FF, corroborando com Bilek e Turhan². Não houve modificações nos valores durante o armazenamento de 90 dias nas formulações FC e FS, porém em FO e FF houve diminuição da luminosidade, sendo maior L^* com adição de óleo. Resultados mais elevados de a^* (dia zero) foram verificados em FC e menor em FO, enquanto que durante o armazenamento FO e FS não mostraram modificações e FC e FF apresentaram redução dos valores. Já no teor de b^* (dia zero), FO e FF apresentaram os maiores resultados, e FC o menor valor. Em 90 dias de congelamento, FC e FS não sofreram alterações, porém FO e FF tiveram diminuições de b^* , com destaque para FF (dia 90).

Conforme explicam Bilek e Turhan², o aumento no nível de gordura nas amostras resulta em diluição da mioglobina e, por isso, há uma diminuição de a^* e aumento de L^* nos produtos com mais gordura, o que também foi verificado em FO.

CONCLUSÃO

A adição dos níveis de 5,0 % de linhaça dourada e derivados em hambúrgueres bovinos durante o armazenamento por 90 dias, permitiu, em geral, uma boa aceitação pelos consumidores, entretanto foram observadas alterações de cor nos produtos. Assim, sugere-se a utilização de antioxidantes naturais nos hambúrgueres para que este efeito possa ser reduzido.

REFERÊNCIAS

1. McAfee AJ, McSorley EM, Cuskelly GJ, Moss BW, Wallace JM, Bonham MP et al. Red meat consumption: An overview of the risks and benefits. *Meat Sci.*2010;84(1):1-13.
2. Bilek AE, Turhan S. Enhancement of the nutritional status of beef patties by adding flaxseed flour. *Meat Sci.*2009;82(4):472-7.
3. Ramcharitar A, Badrie N, Mattfeldt-Beman M, Matsuo H, Ridley C. Consumer acceptability of muffins with flaxseed (*Linum usitatissimum*). *J Food Sci.*2005;70(7):504-7.
4. Novello D. Utilização de linhaça dourada (*linum usitatissimum* L.) em produto cárneo bovino reestruturado: efeito sobre a composição de ácidos graxos e aceitação sensorial [tese de doutorado]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2011.
5. Mcmillin KW. Where is MAP going? A review and future potential of modified atmosphere packaging for meat. *Meat Sci.*2008;80(1):43-65.
6. Dutcosky SD. Análise sensorial de alimentos. 3ª ed. Curitiba (PR): Champagnat; 2011.
7. Ariseto AP, Pollonio MAR. Avaliação da estabilidade oxidativa do hambúrguer tipo calabresa, formulado com reduzidos teores de nitrito e diferentes percentagens de gordura, durante armazenamento congelado. *Hig Aliment.*2005;19(136):72-80.
8. Moskowitz HR. Product optimization approaches and applications. *In: Macfie HJ, Thomson DM (Eds.). Measurement of Food Preferences*. London: Blackie Academic and Professional; 1994. p.67-136.
9. Alamanou S, Bloukas JG, Paneras ED, Doxastakis G. Influence of protein isolate from lupin seed (*Lupinus albus. ssp. Graecus*) on processing and quality characteristics of frankfurters. *Meat Sci.*1996;42(1):79-93.
10. Scheeder RL, Casutt MM, Roulin M, Escher F, Dufey PA, Kreuzer M. Fatty acid composition, cooking loss and texture of beef patties from meat of bulls fed different fats. *Meat Sci.*2001;58(3):321-8.
11. Wood JD, Enser M. Factors influencing fatty acids in meat and the role of antioxidants in improving meat quality. *Braz J Nut.*1997;78(1):49-60.
12. Tuorila H, Cardello AV. Consumer responses to an off-flavor in juice in the presence of specific health claims. *Food Qual Prefer.*2002;13(7-8):561-9.
13. Novello D, Pollonio MAR. Teores de colesterol e oxidação lipídica em hambúrguer bovino com adição de linhaça dourada e derivados. *Pesq Agropec Bras.*2013;48(7):805-8.
14. Guillevic M, Kouba M, Mouro J. Effect of a linseed diet on lipid composition, lipid peroxidation and consumer evaluation of French fresh and cooked pork meats. *Meat Sci.*2009;81(4):612-8.
15. Lukaszewicz M, Szopa J, Krasowska A. Susceptibility of lipids from different flax cultivars to peroxidation and its lowering by added antioxidants. *Food Chem.*2004;88(2):225-31.
16. Mancini RA, Hunt MC. Current research in meat color. *Meat Sci.*2005;71(1):100-21.

Óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. como sanitizante natural para controle de bactérias sésseis em superfície utilizada para corte de alimentos

Essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. as natural sanitizer for controlling the sessile bacteria and as antimicrobial on the food-cutting surfaces

RIALA6/1624

Camila Ribeiro ROCHA*, Roberta Torres CARELI, Rayane Patrícia SILVA, Anna Christina de ALMEIDA, Ernane Ronie MARTINS, Eliandra Maria Bianchini OLIVEIRA, Eduardo Robson DUARTE

*Endereço para correspondência: Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Avenida Universitária, 1000, Universitário, Montes Claros, MG, Brasil, CEP 39404-547. E-mail: camilaribeiorocha@yahoo.com.br.
Recebido: 12.09.2014 - Aceito para publicação: 30.12.2014

RESUMO

Objetivou-se neste estudo determinar as concentrações mínimas inibitórias (CMI) e as concentrações bactericidas mínimas (CBM) pela técnica de macrodiluição em caldo do óleo essencial (OE) de *Rosmarinus officinalis* L. sobre as cepas padrões de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella Choleraesuis* e *Pseudomonas aeruginosa*. Avaliou-se também a ação antibacteriana de soluções do OE sobre estes micro-organismos aderidos, por 12 h a 37 °C sob agitação, em superfície de polipropileno utilizada para corte de alimentos. As soluções sanitizantes de OE foram formuladas com base nos valores encontrados nas CBM, para cada estirpe bacteriana separadamente. A ação sanitizante da solução contra as células aderidas à superfície foi avaliada após 20 e 40 minutos de contato. Para *E. coli*, *S. Choleraesuis* e *P. aeruginosa*, o tempo de 20 minutos de contato foi suficiente para a remoção total das células aderidas, e para *S. aureus* houve redução significativa para ambos os períodos avaliados. O OE de alecrim pode ser considerado como alternativa natural para realizar o controle de bactérias patogênicas e contaminantes na indústria de alimentos.

Palavras-chave. adesão bacteriana, bactérias patogênicas, polipropileno, óleos voláteis, sanitizantes naturais, contaminação de alimentos.

ABSTRACT

The objective of this study was to determine the minimum inhibitory concentrations (MIC) and the minimum bactericidal concentrations (MBC) by using broth macro-dilution method in essential oil (EO) of *Rosmarinus officinalis* L. on the standard strains of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella Choleraesuis* and *Pseudomonas aeruginosa*. The antibacterial activity of EO solutions on these bacteria adhered to the polypropylene surface used for cutting food was also evaluated, after 12 h at 37 °C under shaking on. The sanitizers EO solutions were formulated based on MBC findings, separately for each bacterial strain. The sanitizing action of the solutions on the bacterial cells-adhered surface was evaluated after being contacted for 20 and 40 min. For *E. coli*, *S. Choleraesuis* and *P. aeruginosa*, the contact for 20 min was sufficient for inducing complete elimination of adhered cells, and *S. aureus* populations were significantly reduced at both evaluated periods of time. The EO of *R. officinalis* may represent as natural alternative form to carry out the pathogenic and contaminants bacteria control in food industry.

Keywords. bacterial adhesion, pathogenic bacteria, polypropylene, volatile oils, natural sanitizers, food contamination.

INTRODUÇÃO

A contaminação microbiana em superfícies de contato é relevante na indústria de alimentos. Em condições favoráveis, células bacterianas podem aderir e reproduzir e, quando não completamente removidas, podem contribuir para a formação de biofilmes, os quais comprometem a qualidade e segurança dos alimentos¹⁻³.

Na indústria de alimentos, os micro-organismos podem estar aderidos a resíduos orgânicos e inorgânicos presentes na superfície de equipamentos e utensílios, quando o processo de higienização dos materiais não seja aplicado corretamente. Células sésseis, presentes no biofilme, além de reduzir a eficiência e a vida útil de equipamentos, são mais resistentes ao processo de desinfecção. Além disso, as células podem se desprender e contaminar alimentos, promovendo prejuízos econômicos e risco de toxinfecções alimentares⁴.

A sanitização de equipamentos processadores de alimentos é importante para o controle da contaminação cruzada durante a produção. Limpeza e desinfecção são procedimentos que devem ser realizados regularmente, visto que eliminam grande parte dos micro-organismos contaminantes do equipamento. Todas as superfícies de processamento de alimentos são ambientes potenciais para a adesão bacteriana, que pode ocorrer até mesmo quando programas de higiene e sanitização são corretamente aplicados. Desse modo, a escolha de um agente antimicrobiano deve ser cuidadosamente realizada, levando-se em conta os contaminantes microbianos potenciais e tipos de superfícies⁵.

O crescente interesse em compostos antimicrobianos naturais tem aumentado devido a mudanças nas atitudes dos consumidores em relação ao uso de agentes sintéticos de preservação de alimentos, detergentes e sanitizantes que possam causar impacto negativo ao ambiente⁶. A busca por novas substâncias capazes de controlar o crescimento bacteriano é atualmente uma área de pesquisa essencial para garantir a segurança alimentar.

A utilização de óleos essenciais (OE) tem sido uma alternativa promissora aos antimicrobianos utilizados na indústria de alimentos⁷. Os OE são compostos voláteis, naturais, complexos, caracterizados por um forte odor e são formados por plantas aromáticas como metabólitos secundários. Caracterizados como lipofílicos, são capazes de atravessar a parede celular bacteriana e a membrana citoplasmática, rompendo a estrutura das

diferentes camadas de polissacarídeos, ácidos graxos e fosfolípidios⁸.

Tem-se destacado a utilização de substâncias naturais como o OE de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) para controle de contaminação microbiana. Essa planta é um arbusto aromático perene, pertencente à família Labiatae, com um metro de altura, ramos jovens que se tornam lenhosos ao maturar, e flores pequenas, agrupadas em densos ramos terminais. Os principais produtores são Itália, Iugoslávia, Espanha, Grécia, Turquia, França, Portugal, Egito e norte da África. Apesar de cultivada em quase todo o território brasileiro e importada como condimento para o consumo interno, poucos estudos têm sido realizados sobre essa importante planta medicinal para o controle de bactérias contaminantes de alimentos⁹.

As propriedades antioxidantes do alecrim podem ser atribuídas à presença de rosmanol, diterpenos rosmaridifenol e rosmariquinona, enquanto que as propriedades antimicrobianas parecem estar relacionadas com a presença de borneol, pinenos, cineol e cânfora⁹.

O objetivo deste estudo foi avaliar a capacidade antibacteriana de soluções de OE de *Rosmarinus officinalis* L. para os micro-organismos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella Choleraesuis* e *Pseudomonas aeruginosa* aderidos em superfície de polipropileno utilizada para corte de alimentos.

MATERIAL E MÉTODOS

As estirpes bacterianas avaliadas fazem parte da bacterioteca do laboratório de Microbiologia Aplicada do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 8739 e *Salmonella Choleraesuis* ATCC 10708. O OE de *Rosmarinus officinalis* L. foi extraído na empresa Ferquima Indústria e Comércio Ltda., sendo que de acordo com o fornecedor, os componentes majoritários desse óleo foram 1,8-cineol (45,8 %), cânfora (13,9 %) e α -pineno (12,4 %).

Determinação da concentração mínima inibitória (CMI) e da concentração bactericida mínima (CBM)

A determinação da CMI e da CBM do OE de *R. officinalis* L. foi realizada pelo método de macrodiluição em caldo, de acordo com a norma dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactéria de crescimento aeróbio¹⁰. A CMI refere-

se à menor concentração do produto sanitizante capaz de inibir o crescimento do micro-organismo, enquanto a CBM, à menor concentração capaz de causar a morte do micro-organismo¹¹. Foram preparados 2,5 mL de soluções contendo caldo Brain Heart Infusion (BHI), *Tween* 80 a 0,8 % (v/v) e OE de *R. officinalis* L. com concentrações de 960, 480, 240, 120, 60, 30, 15, 7,5 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$. Em seguida, 12,5 μL da suspensão de cada micro-organismo em cultura pura foram inoculadas em cada tubo com as concentrações testadas, sendo em seguida, homogêneos e incubados a 35 °C por 24 h. Após o período de incubação, uma alçada da amostra dos tubos que não apresentaram turvação foi transferida para placas contendo ágar caseína de soja (TSA), as quais foram então incubadas a 35 °C por 24 h para observação de crescimento microbiano¹⁰.

Adesão bacteriana e formação de biofilmes em polipropileno

Cupons de polipropileno, provenientes de placas utilizadas para corte de alimentos, com dimensões de 2,0 x 2,0 x 0,3 cm, foram previamente higienizados a 25 \pm 2 °C antes dos testes de adesão bacteriana e formação de biofilme: os cupons foram lavados em água potável e detergente neutro, posteriormente enxaguados com água destilada, sanitizados com álcool etílico 70 % (v/v), secos a 60 °C por 2 h e esterilizados a 121 °C por 15 min⁵.

Cinco cupons foram transferidos a erlenmeyer que continha 100 mL de caldo nutriente inoculado com cada suspensão bacteriana com população inicial de 10⁵ UFC.mL⁻¹. Esse sistema foi mantido por 12 h a 37 °C sob agitação a 50 rpm¹².

Avaliação de células planctônicas em suspensão

Para verificar o crescimento bacteriano em caldo nutriente após o final do tempo de adesão, realizou-se a quantificação das células planctônicas, portanto, não aderidas aos cupons de polipropileno. Para tanto, alíquotas de 1000 μL de cada amostra foi submetida a diluições decimais seriadas, sendo que alíquotas de 100 μL foram plaqueadas por espalhamento superficial em TSA, e incubadas a 37 °C por 24 h, segundo *Compendium of Methods for the Examination of Foods*¹³.

Efeito antibacteriano do OE sobre células bacterianas sésseis

Após o período de adesão bacteriana de 12

h, os cupons com células sésseis, ou seja, aderidas ao polipropileno, de cada estirpe bacteriana foram tratados com soluções de OE de alecrim. Com o auxílio de pinça esterilizada, os cupons foram retirados da suspensão em caldo nutriente e imersos separadamente em solução salina 0,85 % para a remoção de células planctônicas¹⁴. Em seguida, foram imersos individualmente em solução contendo solução salina 0,85 % (m/v), *Tween* 80 a 0,8 % (v/v) e OE na concentração equivalente a CBM, previamente determinada. As soluções controle foram compostas pelos diluentes descritos acima sem o OE. A ação sanitizante da solução foi avaliada após 20 e 40 min de contato a 25 °C sob condições estáticas. Após o tratamento, as células bacterianas sobreviventes foram quantificadas.

Quantificação de células aderidas

O procedimento para quantificação das células sésseis nos cupons foi realizado após 12 h de adesão e também após o tratamento com as soluções de OE por 20 e 40 min. Cada cupom foi imerso separadamente em solução salina 0,85 % (m/v) para retirar as células planctônicas ou os resíduos da solução sanitizante¹⁴. Em seguida, foram transferidos separadamente para 10 mL de solução salina 0,85 % (m/v) e sonicados por 2 min em banho de ultrassom Altsonic Clean 3IA (Alt[®]) com 40 kHz, para a remoção de células sobreviventes aderidas nas superfícies dos cupons¹⁵. A partir de 1000 μL dessa solução, foram realizadas diluições decimais seriadas sucessivas, as quais foram plaqueadas em TSA e incubadas a 37 °C por 24 h. Após o período de incubação, foi realizada a contagem da população bacteriana presente e os resultados foram expressos em UFC.cm⁻², segundo Careli et al¹⁶.

Análises dos resultados

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado com três repetições por tratamento. Para verificar o efeito antibacteriano do OE sobre as células sésseis, os valores de UFC.cm⁻² foram convertidos em escala logarítmica para atender a pressuposição de normalidade. Esse experimento foi realizado em esquemas de parcelas subdivididas, onde as soluções sanitizantes corresponderam às parcelas e os tempos de contato representaram às subparcelas. Todas as análises foram realizadas a 5 % de probabilidade com o auxílio do pacote estatístico *Statistical Analysis System* (SAS)¹⁷.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Concentração mínima inibitória (CMI) e concentração bactericida mínima (CBM)

Verificou-se que o crescimento de *S. aureus* foi inibido pela menor concentração do OE testada, 7,5 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ (Tabela 1). O OE apresentou efeito bactericida sobre todas as estirpes testadas, sendo necessárias concentrações de 15 $\mu\text{L.mL}^{-1}$, 120 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ e 120 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ para eliminar totalmente células de *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Choleraesuis* e *Escherichia coli*, respectivamente. *Pseudomonas aeruginosa* teve população eliminada quando submetida à solução a 960 μL do OE. mL^{-1} (Tabela 1), sendo este o micro-organismo que apresentou maior resistência às diferentes concentrações do OE de alecrim.

O potencial lipofílico dos componentes do OE desempenha importante papel sobre a camada lipídica da membrana celular bacteriana, causando perda da organização estrutural e integridade¹⁸. De acordo com Cox et al¹⁹, as diferenças na sensibilidade ao OE entre os micro-organismos podem ser atribuídas à variação na taxa de penetração das amostras através da parede da célula e nas estruturas da membrana celular.

Jiang et al²⁰ avaliaram a atividade antimicrobiana do OE de alecrim contra bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus epidermidis*, *S. aureus* e *Bacillus subtilis*), bactérias Gram-negativas (*Proteus vulgaris*, *P. aeruginosa* e *E. coli*) e fungos (*Candida albicans* e *Aspergillus niger*). O OE de alecrim foi mais ativo contra todas as cepas bacterianas e também apresentou atividade antifúngica contra *C. albicans*. Os mesmos autores avaliaram as taxas de sobrevivência e alterações morfológicas de *S. aureus* após tratamento com diferentes concentrações

de OE por citometria de fluxo (FCM) e microscopia de força atômica (AFM). Os resultados indicaram que o OE em concentrações mais baixas, em contato com a superfície das células bacterianas, provocou irregularidades no formato celular tornando a superfície côncava. Foi constatado também que com o aumento da concentração do OE, as paredes celulares foram danificadas gradualmente e, em seguida, ocorreu extravasamento do conteúdo celular. Em estudo realizado por Gachkar et al²¹, o OE de alecrim apresentou atividade antimicrobiana sobre as estirpes *E. coli*, *S. aureus* e *Listeria monocytogenes*, sendo *S. aureus* o micro-organismo mais resistente a ação do OE.

Adesão bacteriana e formação de biofilme em superfícies de polipropileno

O inóculo inicial de cada estirpe bacteriana em caldo nutriente apresentou 5 log UFC. mL^{-1} à temperatura ambiente, sendo que todas as estirpes bacterianas cresceram até 3 ciclos logarítmicos, obtendo-se concentração média de 8 log UFC. mL^{-1} após o tempo final de adesão bacteriana.

A carga microbiana presente nas superfícies utilizadas na indústria de alimentos é um parâmetro importante, capaz de determinar se há formação de biofilme maduro ou somente adesão bacteriana. Segundo Andrade et al²², para ser considerado biofilme, é necessário no mínimo 10⁷ UFC aderidas. cm^{-2} de superfície. Neste estudo, constatou-se que *P. aeruginosa* e *S. aureus* apresentaram a mesma capacidade de formar biofilme em polipropileno, com contagens médias de 7,41 log UFC. cm^{-2} e 7,23 log UFC. cm^{-2} , respectivamente. Entretanto, o número de células de *E. coli* e *S. Choleraesuis* aderidas em polipropileno atingiram contagens médias de 5 log UFC. cm^{-2} (Figura 1).

Tabela 1. Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.)

Micro-organismos	Concentração Mínima Inibitória	Concentração Bactericida Mínima
	($\mu\text{L.mL}^{-1}$)	($\mu\text{L.mL}^{-1}$)
<i>Salmonella Choleraesuis</i>	60	120
<i>Escherichia coli</i>	60	120
<i>Staphylococcus aureus</i>	7,5	15
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	240	960

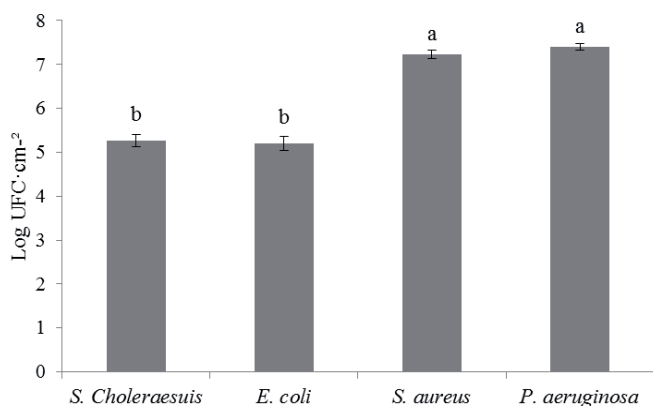


Figura 1. Concentrações médias de bactérias aderidas em superfície de polipropileno para cortes de carne, após 12 h a 37 °C. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan ($P > 0,05$)

Pompermayer e Gaylarde²³ avaliaram a adesão de *S. aureus* e *E. coli*, em culturas mistas, em superfícies de polipropileno imersos em extrato aquoso preparado a partir de carcaça de frango de onde foram isolados, em temperaturas de 12 °C e 30 °C, por um tempo de até 8 h de incubação. Os autores verificaram que *E. coli* apresentou maior adesão nos cupons de polipropileno quando comparado a *S. aureus*, em ambas temperaturas. *E. coli* aderiu melhor a 30 °C, enquanto que células de *S. aureus* mostraram melhor adesão a 12 °C. Parizzi et al²⁴ avaliaram a adesão de *Listeria innocua* L6a e de *S. aureus* ATCC 6538 em cupons de aço inoxidável AISI 304, de policarbonato e de polipropileno. O número de células aderidas sobre as superfícies aumentou com o tempo de contato e a contagem obtida para os dois micro-organismos sobre as superfícies foi entre 10⁵ e 10⁶ UFC. cm⁻² após 12 horas de contato a 30 °C, independentemente do tipo da superfície estudada.

O biofilme bacteriano permite que os micro-organismos sobrevivam em ambientes diversos, sendo a sua fisiologia e comportamento diferentes das células planctônicas²⁵.

Remoção de células sésseis em polipropileno com o OE de alecrim

O estudo de novas ferramentas para o controle e eliminação de biofilmes bacterianos tornou-se um novo interesse de pesquisa, sendo a utilização de OE ou de seus constituintes majoritários uma das alternativas natural²⁶.

A utilização de OE na remoção de biofilmes

bacterianos em superfícies utilizadas na indústria de alimentos é alvo de estudos de diversos autores^{12,14,26}. No entanto, ainda não foi relatada a utilização do OE de alecrim na sanitização de superfícies utilizadas no processamento de alimentos. Porém, há estudos com esse OE durante a sanitização de hortaliças minimamente processadas²⁷, a utilização do extrato de alecrim como antimicrobiano oral contra bactérias planctônicas²⁸ e na inibição e controle de biofilmes fúngicos em superfícies acrílicas de próteses dentárias²⁹.

A eficácia das soluções sanitizantes com OE de alecrim foi avaliada pela quantificação de células viáveis após a sanitização dos cupons de polipropileno contendo as células aderidas dos micro-organismos separadamente (Tabela 2).

As soluções sanitizantes de OE de alecrim foram preparadas nas concentrações encontradas nos testes da CBM. Observou-se que houve redução total das células aderidas nos cupons para *S. Choleraesuis*, *E. coli* e *P. aeruginosa*, não havendo diferença ($P > 0,05$) entre os tempos de 20 e 40 min de contato com as soluções de OE. Verificou-se que 20 min de contato com as soluções sanitizantes nas concentrações avaliadas foram suficientes para a remoção total das células aderidas por esses micro-organismos sobre os cupons de polipropileno.

O tempo de sanitização com a solução de OE de alecrim influenciou na remoção do biofilme formado por *S. aureus* nos cupons. Um efeito de redução celular significativo ($P < 0,05$) foi observado para tratamento sanitizante com maior tempo de contato. Após 40 min houve uma redução das células sobreviventes nos cupons em comparação com as células sobreviventes após 20 min.

O OE de *Rosmarinus officinalis* L. mostrou-se eficiente na sanitização das células aderidas de *S. Choleraesuis*, *E. coli* e no biofilme formado por *P. aeruginosa*. Neste trabalho foram escolhidos os valores da CBM de cada estirpe bacteriana para avaliar o efeito sanitizante frente a células sésseis em polipropileno, devido ao fato de que células em biofilmes são mais resistentes a antimicrobianos³⁰⁻³². Há estudos que consideram que as células aderidas são 500 vezes³⁰ ou 1.000 vezes³³ mais resistentes que as células planctônicas aos mesmos agentes antimicrobianos. Isso indica que mecanismos determinantes dessas resistências podem diferir em células planctônicas e aderidas, e acredita-se que esses mecanismos sejam multifatoriais. Como, com a aplicação das soluções de OE de *Rosmarinus officinalis* L., foi observada a morte da população de *S. Choleraesuis*,

Tabela 2. Número de células aderidas em superfície de polipropileno, após 12 h a 37 °C, expresso em log UFC.cm⁻², após tratamento com soluções contendo óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L

Micro-organismos	Tempos de contato				CV (%)
	20 minutos		40 minutos		
	Controle	<i>R. officinalis</i>	Controle	<i>R. officinalis</i>	
<i>Salmonella Choleraesuis</i>	4,69 A	0,00 B	4,30 A	0,00 B	8,54
<i>Escherichia coli</i>	4,50 A	0,00 B	4,25 A	0,00 B	6,33
<i>Staphylococcus aureus</i>	7,17 A	6,88 B	6,93 AB	6,52 C	1,84
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7,30 A	0,00 B	7,18 A	0,00 B	2,83

Médias seguidas na mesma linha por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5 % de probabilidade. Coeficiente de variação (CV)

E. coli e *P. aeruginosa* em polipropileno, testes adicionais devem ser realizados com a finalidade de encontrar concentrações inferiores das utilizadas ou próximas da CMI, que possuam o mesmo efeito sanitizante.

A solução de OE na concentração 7,5 µL.mL⁻¹ não foi suficiente para a remoção total das células de *S. aureus* na superfície dos cupons de polipropileno, mesmo que observada uma redução significativa ($P < 0,05$) de células sobreviventes viáveis com um maior tempo de contato (Tabela 2). Concentrações superiores devem ser avaliadas para se obter a eliminação total do biofilme formado por estes micro-organismos.

Segundo Simões et al²⁵, a sanitização é a utilização de produtos com ação antimicrobiana com a finalidade de eliminar micro-organismos. O objetivo é reduzir células viáveis restantes na superfície após a limpeza e evitar o crescimento microbiano na superfície antes de reiniciar a produção. O produto sanitizante deve ser eficaz, seguro, de fácil manipulação, e facilmente removido das superfícies, sem deixar resíduos que poderiam prejudicar a saúde e as propriedades sensoriais dos produtos finais.

CONCLUSÃO

As soluções sanitizantes formuladas com o óleo essencial de alecrim mostraram-se eficientes na redução das células aderidas nas superfícies dos cupons de polipropileno após os tratamentos. Isso indica que a utilização desse óleo essencial pode ser uma nova alternativa para a remoção de células aderidas e na forma de biofilmes em superfícies de processamento na indústria de alimentos.

AGRADECIMENTOS

CNPq, FAPEMIG, CAPES e PRPq/UFMG.

REFERÊNCIAS

1. Bower CK, Mc Guire J, Daeschel MA. The adhesion and detachment of bacteria and spores on food-contact surfaces. *Trends Food Sci Technol*.1996;7(5):152-7.
2. Zottola EA. Special techniques for studying microbial biofilms in food systems. In: Tortorello ML, Gendel SM. *Food Microbial Analysis: new technologies*. IFT basic symposium series. New York: Marcell Dekker; 1997. Cap.16, p.315-46.
3. Zottola EA, Sasahara, KC. Microbial biofilms in the food processing industry – Should they be a concern? *Int J Food Microbiol*.1994;23(2):125-48.
4. Oliveira MMM, Brugnera DF, Piccoli RH. Biofilmes microbianos na indústria de alimentos: uma revisão. *Rev Inst Adolfo Lutz*.2010;69(3):277-84.
5. Rossoni EMM, Gaylarde CC. Comparison of sodium hypochlorite and peracetic acid as sanitising agents for stainless steel food processing surfaces using epifluorescence microscopy. *Int J Food Microbiol*.2000;61(1):81-5.
6. Lebert I, Leroy S, Talon R. Effect of industrial and natural biocides on spoilage, pathogenic and technological strains grown in biofilm. *Food Microbiol*.2007;24(3):281-7.
7. Brugnera DF, Oliveira MMM, Piccoli RH. Essential oils of *Cymbopogon* sp. in the control of foodborne pathogenic bacteria. *Alim Nutr*.2011;22(3):339-43.
8. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils: a review. *Food Chem Toxicol*.2008;46(2):446-75.
9. Porte A, Godoy RLO. Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.): Propriedades antimicrobiana e química do óleo essencial. *Bol CEPPA*.2001;19(2):193-210.

10. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico: Norma Aprovada. 6ª ed. Norma NCCLS M7-A6; 2003.
11. Pozzo MD, Viegas J, Santurio DF, Rossatto L, Soares IH, Alves SH, et al. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de condimentos frente à *Staphylococcus* spp isolados de mastite caprina. *Cienc Rural*.2011;41(4):667-72.
12. Oliveira MMM, Brugnara DF, Cardoso MG, Alves E, Piccoli RH. Disinfectant action of *Cymbopogon* sp. essential oils in different phases of biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface. *Food Control*.2010;21(4):549-53.
13. American Public Health Association (APHA). Standard methods for the examination of water and wastewater. 21ª ed. Washington: American Water Works, Water Environment Federation; 2005.
14. Valeriano C, Oliveira TL, Carvalho SM, Cardoso MG, Alves E, Piccoli RH. The sanitizing action of essential oil-based solutions against *Salmonella enterica* serotype Enteritidis S64 biofilm formation on AISI 304 stainless steel. *Food Control*.2012;25(2):673-7.
15. Malheiros PS, Passos CT, Casarin LS, Serraglio L, Tondo EC. Evaluation of growth and transfer of *Staphylococcus aureus* from poultry meat to surfaces of stainless steel and polyethylene and their disinfection. *Food Control*.2010;21(3):298-301.
16. Careli RT, Andrade NJ, Soares NF, Júnior JIR, Rosado MS, Bernardes PC. The adherence of *Pseudomonas fluorescens* to marble, granite, synthetic polymers, and stainless steel. *Cienc Tecnol Aliment*.2009;29(1):171-6.
17. Statistical Analysis System (SAS). SAS/ETS user's guide. Version 9.0 ed. Cary: SAS Institute; 2010.
18. Aiensaard J, Aiumlamai S, Aromde C, Suwimol T, Khunkitti W. The effect of lemongrass oil and its major components on clinical isolate mastitis pathogens and their mechanisms of action on *Staphylococcus aureus* DMST 4745. *Res Vet Sci*.2011; 91(3):e31-7.
19. Cox SD, Mann CM, Markham JL, Bell HC, Gustafson JE, Warmington JR, et al. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *J Appl Microbiol*.2000;88(1):170-5.
20. Jiang Y, Wu N, Fu Y, Wang W, Luo M, Zhao C, et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Rosemary. *Environ Toxicol Pharmacol*.2011;32(1):63-8.
21. Gachkar L, Yadegari D, Rezaei MB, Taghizadeh M, Astaneh SA, Rasooli I. Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. *Food Chem*.2007;102(3):898-904.
22. Andrade NJ, Bridgman TA, Zottola EA. Bacteriocidal activity of sanitizers against *Enterococcus faecium* attached to stainless steel as determined by plate count and impedance methods. *J Food Prot*.1998;61(7):833-8.
23. Pompermayer DMC, Gaylarde CC. The influence of temperature on the adhesion of mixed cultures of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to polypropylene. *Food Microbiol*.2000;17(4):361-5.
24. Parizzi SQF, Andrade NJ, Silva CAS, Soares NFF, Silva EAM. Bacterial adherence to different inert surfaces evaluated by epifluorescence microscopy and plate count method. *Braz Arch Biol Technol*.2004;47(1):77-83.
25. Simões M, Simões LC, Vieira MJ. A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT – Food Sci Technol*.2010;43(4):573-83.
26. Oliveira MMM, Brugnara DF, Nascimento JA, Piccoli RH. Control of planktonic and sessile bacterial cells by essential oils. *Food Bioprod Proc*.2012;90(4):809-18.
27. Azerêdo GA. Potencial de aplicação dos óleos essenciais de orégano (*Origanum vulgare* L.) e alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) como sanitizantes naturais em hortaliças minimamente processadas [tese de doutorado]. Recife, Pernambuco: Universidade Federal de Pernambuco, 2011. 135 pp.
28. Silva MSA, Silva MAR, Higino JS, Pereira MSV, Carvalho AAT. Atividade antimicrobiana e antiaderente in vitro do extrato de *Rosmarinus officinalis* Linn. sobre bactérias orais planctônicas. *Rev Bras Farmacogn*.2008;18(2):236-40.
29. Cruzeiro MES. Produção e quantificação do biofilme de *Candida albicans* em resinas acrílicas tratadas com extratos vegetais [dissertação de mestrado]. Pelotas, Rio Grande do Sul: Universidade Federal de Pelotas, 2013. 91 pp.
30. Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber R, Lappin-Scott HM. Microbial Biofilms. *Annu Rev Microbiol*.1995;49:711-45.
31. Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis*.2002;8(9):881-90.
32. Meyer B. Approaches to prevention, removal and killing of biofilms. *Int Biodeterior Biodegrad*.2003;51(4):249-53.
33. Drenkard E. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbes Infect*.2003;5(13):1213-9.

Resíduos de antibióticos e qualidade microbiológica de leite cru e beneficiado

Residues of antibiotics and microbiological quality of raw and benefited milk

RIALA6/1625

Anna Júlia PORTZ, Emanuel Pereira COUTO, Márcia de Aguiar FERREIRA*

*Endereço para correspondência: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária (FAV), Universidade de Brasília, Asa Norte, Brasília/DF, CEP 70910-900. Tel: 61 3107-7226. E-mail: mafer@unb.br.

Recebido: 02.09.2014 - Aceito para publicação: 07.11.2014

RESUMO

A ausência de resíduos de medicamentos veterinários nos alimentos é uma das exigências para a segurança alimentar e demonstra o respeito às boas práticas ao longo da cadeia agroalimentar. No leite, além dos riscos à saúde dos consumidores, a presença de antibióticos afeta diretamente a produção de derivados por inibir os processos fermentativos. Este estudo avaliou a presença de resíduos de antibióticos em amostras de leite cru (n=10) e beneficiado (n=20) produzido e comercializado no Distrito Federal, utilizando-se SNAP duo* kit tetra-Beta. Foram também realizadas análises microbiológicas para contagem de aeróbios mesófilos, coliformes totais e psicotróficos, além do teste de lactofermentação. Nenhuma amostra apresentou resíduos de tetraciclina e β -lactâmicos, concluindo-se que até o momento desta pesquisa, o leite produzido e beneficiado no Distrito Federal não apresenta perigo químico em relação à presença destes resíduos de antimicrobianos. Entretanto, a qualidade microbiológica do leite cru e pasteurizado foi considerada insatisfatória.

Palavras-chave. β -lactâmicos, laticínios, segurança alimentar.

ABSTRACT

The absence of veterinary drugs residues in food is one of the requirements for food safety and this characteristic indicates the compliance with the good practices along the food chain. In milk, in addition of the risks to consumer health, the presence of antibiotics affects directly the output of dairy products inhibiting the fermentation process. This study evaluated the occurrence of antibiotic residues in raw milk samples (n = 10) and processed milk (n = 20) produced and marketed in the Federal District, using SNAP* duo tetra-Beta kit. Microbiological analyzes for counting aerobic mesophilic, total coliform and psychrotrophic, and the lactofermentation test were performed. No sample showed tetracyclines and β -lactams residues, concluding that at the time of this study, the milk samples produced and processed in the Federal District have no chemical hazard correlated with the occurrence of antimicrobial residues; however the microbiological quality of raw and pasteurized milk was deemed unsatisfactory.

Keywords. β -lactams, dairy products, food safety.

INTRODUÇÃO

O Brasil está entre os 10 maiores produtores no mercado da pecuária leiteira, proporcionando a geração de renda no campo e crescimento significativo na atividade¹. O leite é um produto de grande importância nutricional, cujo consumo é essencial para determinados grupos da população tanto na forma de leite quanto como seus derivados.

A manutenção das características do leite, assim como a sua inocuidade e seu valor nutricional, são motivos de preocupação tanto para a indústria quanto para os órgãos reguladores. Em pesquisas realizadas no Brasil, pode ser observado que uma grande quantidade de matéria-prima chega à indústria com diversos parâmetros alterados, indicando deficiências na produção e oferta de produtos para o consumo abaixo da qualidade estabelecida pela legislação vigente²⁻⁵.

A ausência de resíduos de medicamentos veterinários e contaminantes, em níveis prejudiciais à saúde, nos alimentos, como garantia de segurança alimentar, é um assunto relativamente novo no Brasil, porém muito tem sido discutido e exigido pelo comércio internacional. Os principais países importadores de alimentos possuem e exigem um programa de controle desses resíduos e contaminantes, com limites regulatórios bem definidos.

Os Limites Máximos de Resíduos - LMRs consistem na quantidade máxima de determinada substância que um alimento pode conter, sem prejuízo da integridade orgânica dos seres humanos e animais⁶, e podem ser utilizados como medidas de detecção de não conformidades para tomada de ações regulatórias⁷.

No Brasil, o controle oficial da segurança do leite em relação à presença de resíduos é realizado por meio do Programa Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC-MAPA), que avalia a segurança da cadeia agroalimentar quanto à presença de resíduos de medicamentos veterinários e contaminantes inorgânicos em produtos de origem animal não processados⁶.

A contaminação do leite por substâncias químicas, em especial por antibióticos, também foi verificada por outros autores em pesquisas realizadas em algumas regiões brasileiras^{8,9}. Entretanto, como são escassas as pesquisas publicadas sobre a ocorrência de perigo químico associado à presença de antibióticos em leite no Distrito Federal, o objetivo desse trabalho foi avaliar a presença de resíduos de antibióticos em leites cru e beneficiado, produzidos e comercializados nessa região.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta e tratamento das amostras

Foram coletadas amostras de leite cru (n=10) de latões e tanques de resfriamento de diferentes produtores do Distrito Federal e, de leite pasteurizado (n=10) e Ultra Alta Temperatura (UAT) (n=10) adquiridas no comércio local, totalizando 30 amostras analisadas. As amostras de leite cru foram acondicionadas em frascos estéreis (100 mL) e mantidas refrigeradas até o momento das análises. As amostras de leites beneficiados foram coletadas em suas embalagens originais sendo as de leite pasteurizado, armazenadas e transportadas em caixas isotérmicas. Todas as análises foram realizadas no Laboratório de Análises de Leite e Derivados da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília (FAV/UnB).

As amostras de leite cru e pasteurizado foram analisadas imediatamente após sua chegada ao laboratório, e as amostras de leite UAT foram incubadas a 35°C durante sete dias, conforme preconizado pela Portaria nº 370/1997¹⁰. Após homogeneização por inversão das embalagens (20 vezes), alíquotas de 5,0 mL de cada amostra, foram mantidas congeladas para a pesquisa de resíduos de antibióticos. Para as análises microbiológicas foram realizadas diluições decimais seriadas, em solução salina 0,85 %.

Análises microbiológicas

As análises microbiológicas foram realizadas conforme metodologias preconizadas pela Instrução Normativa Nº 62/2003¹¹. Para a contagem de micro-organismos aeróbios mesófilos as amostras foram semeadas em Ágar Padrão para Contagem (Acumedia Lasing, Michigan - EUA) e incubadas a 35 °C durante 48 h. Os resultados obtidos foram expressos em Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL).

Para a enumeração de micro-organismos do grupo dos coliformes pela técnica de tubos múltiplos, as diluições selecionadas foram semeadas em Caldo Bile Verde Brilhante 2 % Lactose (CBVBL) para coliformes totais com incubação a 35°C durante 24-48 h; a partir dos tubos positivos no CBVBL, as amostras foram semeadas para enumeração de coliformes termotolerantes em Caldos EC e Tripton (Acumedia, Lasing, Michigan, EUA) com incubação a 45 °C durante 24-48 h. Os resultados obtidos foram expressos em Número Mais Provável (NMP/mL).

Para a pesquisa de micro-organismos

psicotróficos as diluições selecionadas foram semeadas em superfície e em duplicata, em Ágar Padrão de Contagem (Neogen/Acumed, Lansing, Michigan, EUA) e incubadas a 10 °C por sete dias. Os resultados foram expressos em Unidades Formadoras de Colônia (UFC/mL).

Análise de lactofermentação

As amostras de leite foram submetidas à prova de lactofermentação, para verificação do tipo de microbiota mesofílica predominante no leite, com base no aspecto, odor e tipo de coágulo formado. Alíquotas de 10 mL do leite foram incubadas a 37 °C, por 24 h para posterior avaliação do tipo de coágulo formado classificando-os como esfacelado, caseoso, gelatinoso ou líquido (sem formação de coágulo)¹².

Análises de resíduos de antibióticos

Para a pesquisa de antibióticos utilizou-se o teste SNAPduo* Beta-Tetra (IDEXX Laboratories, Maine, USA) em todas as amostras, conforme recomendações do fabricante. Esse teste detecta resíduos de penicilina G, tetraciclina, clortetraciclina e oxitetraciclina, em níveis iguais ou inferiores aos limites estabelecidos pelo Mercosul, *Codex Alimentarius* e União Europeia em leite bovino conforme Tabela 1.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as amostras de leite analisadas apresentaram resultados negativos para resíduos de antibióticos. Nas amostras de leite cru, esses resultados podem indicar respeito às boas práticas agropecuárias na produção leiteira quanto ao uso desses medicamentos. De acordo com Andrew et al¹³, se a aplicação de antibióticos ocorrer

apenas no período em que a vaca não está produzindo leite e for respeitado o período de carência indicado pelo fabricante, será baixo o risco de passagem de resíduos de antibióticos para o leite.

Nas amostras de leites beneficiados, a ausência de resíduos de antibióticos pode ser resultado da qualidade da matéria prima nesse aspecto e, indicar eficiência no controle de qualidade das indústrias e da fiscalização. Entretanto, não se deve descartar a possibilidade do efeito de diluição, já que esses leites são provenientes do conjunto de grandes volumes, que poderia resultar em concentrações não detectáveis pelo método utilizado.

Nero et al⁸ analisaram 210 amostras de leite cru coletadas em propriedades leiteiras de quatro regiões do Brasil, sendo 50 de Botucatu (SP), 47 de Viçosa (MG), 50 de Pelotas (RS) e 63 de Londrina (PR), sendo que foram encontradas 24 amostras positivas para β-lactâmicos, sulfonamidas, gentamicina e tilosina, por meio do Kit *Charm test*TM.

Macedo e Freitas¹⁴ encontraram resíduos de antibióticos em 11 amostras de leite, dentre 103 analisadas, provenientes de propriedades leiteiras, usinas de beneficiamento e varejo de Belém (PA). As análises foram realizadas com a utilização dos Kits: BL Snap Test para Tetraciclina, Charm SL Test para análise de beta-lactâmicos e Copan CH ATK, para análise de beta-lactâmicos, tetraciclina e sulfonamidas.

Em pesquisa realizada no Distrito Federal, foram analisadas 19 amostras de leite cru e 95 amostras de leites pasteurizados por meio do kit Eclipse 50, que consiste em um teste qualitativo para a detecção de substâncias inibidoras no leite com base na inibição do crescimento bacteriano, sendo encontrada apenas uma amostra de leite cru positiva para a presença de resíduos de antibióticos¹⁵.

Tabela 1. Nível de detecção do Kit SNAPduo* Beta-Tetra e Limite Máximo de Resíduos (LMR) de antibióticos adotados pelo Mercosul, Codex Alimentarius e União Europeia (EU)

Resíduo	Nível de detecção do SNAPduo* Beta-Tetra	LMR estabelecido pelo Mercosul ²⁴	LMR estabelecido pelo Codex Alimentarius ²⁵	LMR estabelecido pela EU ²⁶
Penicilina G	4 µg/Kg	4 µg/Kg	4 µg/Kg	4 µg/Kg
Tetraciclina	50 µg/Kg	100 µg/Kg	100 µg/Kg	100 µg/Kg
Clortetraciclina	100 µg/Kg	100 µg/Kg	100 µg/Kg	100 µg/Kg
Oxitetraciclina	50 µg/Kg	100 µg/Kg	100 µg/Kg	100 µg/Kg

Tabela 2. Enumeração de micro-organismos indicadores da qualidade higiênica em amostras de leite cru (n=10), leite pasteurizado (n=10) e leite ultra alta temperatura (n=10)

Níveis de contaminação UFC/mL	Aeróbios mesófilos			Psicrotróficos		
	n (%)			n (%)		
	LC	LP	UAT	LC	LP	UAT
< 1,0	0	0	10 (100 %)	10 (100 %)	4 (40 %)	9 (90 %)
10 – 10 ²	0	0	0	0	2 (20 %)	1 (10 %)
1,1 x 10 ² – 10 ³	0	2 (20 %)	0	0	2 (20 %)	0
1,1 x 10 ³ – 10 ⁴	0	3 (30 %)	0	0	0	0
1,1 x 10 ⁴ – 10 ⁵	1 (10 %)	2 (20 %)	0	0	1 (10 %)	0
1,1, x 10 ⁵ – 10 ⁶	1 (10 %)	1 (10 %)	0	0	0	0
>10 ⁶	8 (80 %)	2 (20 %)	0	0	1 (10 %)	0

Níveis de contaminação NMP/mL	Coliformes 30 °C			Coliformes 45 °C		
	n (%)			n (%)		
	LC	LP	UAT	LC	LP	UAT
< 0,3	5 (50 %)	5 (50 %)	10 (100 %)	10 (100 %)	10 (100 %)	10 (100 %)
3,0 – 100	4 (40 %)	1 (10 %)	0	0	0	0
101 – 1100	0	0	0	0	0	0
> 1100	1 (10 %)	4 (40 %)	0	0	0	0

LC: leite cru; LP: leite pasteurizado; UAT: leite ultra alta temperatura

Todas as amostras de leites crus e pasteurizados apresentaram formação de coágulos e, nas amostras de leite UAT, como esperado, não ocorreu formação de coágulos já que esse leite passa por tratamento térmico que destrói 100 % das formas bacterianas vegetativas. A avaliação dos coágulos formados demonstrou que houve predominância de esfacelados (50 % em leite cru e 80 % no pasteurizado), seguido do caseoso (30 % em leite cru e 2 % no leite pasteurizado) e do gelatinoso (20 % em leite cru). A análise de lactofermentação é considerada como qualitativa para a presença de substâncias inibidoras da fermentação, como os antibióticos, pois na ausência de fermentação natural, pode-se suspeitar da presença de inibidores. A partir dos resultados obtidos na pesquisa de antibióticos por meio do teste imunoenzimático SNAPduo*Beta-Tetra e da prova da lactofermentação, observou-se 100 % de resultados coincidentes, já que nenhuma amostra de leite cru e pasteurizado apresentou-se positiva no teste e todas apresentaram formação de coágulo.

Os resultados obtidos nas análises microbiológicas estão contidos na Tabela 2. Como as amostras de leite cru foram coletadas diretamente de latões e de tanques de refrigeração de propriedades leiteiras, foram utilizados os critérios estabelecidos na Instrução Normativa

Nº. 62/2011¹⁶ do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Para as amostras de leite beneficiado foram adotados os critérios contidos na RDC Nº. 12/2001¹⁷ da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

Os resultados demonstraram que 90 % das amostras de leite cru estavam em desacordo com contagens acima de $3,0 \times 10^5$ UFC/mL e todas as amostras de leite UAT apresentaram-se de acordo com os padrões. A contagem média nas amostras de leite pasteurizado foi $1,4 \times 10^5$ UFC/mL. A ANVISA não estabelece parâmetro para aeróbios mesófilos em leite pasteurizado, entretanto esses micro-organismos são importantes indicadores da qualidade higiênico-sanitária em alimentos, e altas contagens no leite indicam práticas de produção inadequadas, conservação em temperaturas altas e podem resultar em redução na vida de prateleira do produto final¹⁸.

O MAPA não estabelece critério para coliformes totais no leite cru refrigerado e nem a ANVISA para o leite pasteurizado. Os micro-organismos do grupo dos coliformes por serem fermentadores da lactose, quando em altas contagens, causam acidez excessiva e perda da qualidade nutricional¹⁸, além de indicarem deficiências na produção e/ou recontaminação. Os resultados

demonstraram que uma amostra de leite cru (10 %) apresentou contagem maior do que 1100 NMP/mL e, que 40 % das amostras de leite pasteurizado apresentaram contagens maiores do que 1100 NMP/mL. Todas as amostras foram negativas para coliformes a 45°C.

Esses resultados são semelhantes aos relatados por outras pesquisas, demonstrando que ainda não se atingiu o padrão de qualidade proposto, tanto para a matéria prima quanto para o leite pasteurizado, e que os altos níveis de contaminação podem representar risco à saúde dos consumidores devido à possibilidade de conter de micro-organismos patogênicos^{5,19-21}.

Na pesquisa de psicrotróficos 40 % das amostras de leite pasteurizado apresentaram contagens que podem ser consideradas em desacordo com o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal²², que recomenda que a contagem de psicrotróficos no leite não deve exceder 10 % da contagem de aeróbios mesófilos observada na amostra, com média de $1,5 \times 10^5$ UFC/mL.

A presença desses micro-organismos no leite pasteurizado pode ser devida a falhas no beneficiamento ou na limpeza dos equipamentos. Psicrotróficos são produtores de enzimas proteolíticas e lipolíticas e responsáveis por processos de deterioração do produto e perdas dos componentes sólidos do leite. Contagens iguais ou maiores de 10^5 UFC/mL são suficientes para promoverem alterações significativas pela presença dessas enzimas, que são termorresistentes, comprometendo a qualidade final do leite e seus derivados²³, sendo que os resultados indicaram uma amostra (10 %) com contagem acima de 10^6 UFC/mL. Observou-se que uma amostra (10 %) de leite UAT apresentou contagem de 10 UFC/mL de psicrotróficos.

CONCLUSÃO

Até o momento dessa pesquisa, o leite produzido e comercializado no Distrito Federal não apresenta perigo químico associado à presença de resíduos de antibióticos. Entretanto, existem falhas na produção do leite cru e no beneficiamento do leite pasteurizado que comprometem a qualidade microbiológica e nutricional, além da possibilidade de representar riscos microbiológicos. As amostras de leite UAT apresentaram melhor qualidade quando comparada às de leite pasteurizado.

REFERÊNCIAS

1. United States Department of Agriculture - USDA. Dairy: World Market and Trade Circular Archives. [acesso 2011 ago. 08]. Disponível em: [http://www.fas.usda.gov/dairy_arc.asp].
2. Tebaldi VMR, Oliveira TLC, Boari CA, Piccoli RH. Isolamento de coliformes, estafilococos e enterococos de leite cru provenientes de tanques de refrigeração por expansão comunitários: identificação, ação lipolítica e proteolítica. *Cienc Tecnol Aliment*. 2008;28(3):753-60.
3. Arruda PM, Cruz AG, Zoellner SS, Silva R, Soares MM, Fernandes VS, et al. Características físico-químicas do leite pasteurizado tipo C e leite Ultra Alta Temperatura comercializados na cidade do Rio de Janeiro. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2007;66(2):126-9.
4. Rocha JS, Buriti FCA, Saad SMI. Condições de processamento e comercialização de queijo-de-minas frescal. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2006;58(2):263-72.
5. Nero LA, Mattos MR, Beloti V, Barros MAF, Pinto JPAN, Andrade NJ, et al. Leite cru de quatro regiões leiteiras brasileiras: perspectivas de atendimento dos requisitos microbiológicos estabelecidos pela Instrução Normativa 51. *Ciênt Tecnol Aliment*. 2005;25(1):191-5.
6. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 42, de 20 de dezembro de 1999. Altera o Plano Nacional do Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal - PNCR e os Programas de Controle de Resíduos em Carne - PCRC, Mel - PCRM, Leite - PCRL e Pescado - PCRP. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 22 dez. 1999. Seção 1, nº 244, p.253-267.
7. Codex Alimentarius. Guidelines for design and implementation of national regulatory food safety assurance programme associated with the use of veterinary drugs in food producing animals. CAC/GL 71/2009. [acesso em 2014 nov. 06]. Disponível em: [<http://www.codexalimentarius.org/standards/list-of-standards/>].
8. Nero LA, Mattos MR, Beloti V, Barros MAF, Franco BDGM. Resíduos de antibióticos em leite cru de quatro regiões leiteiras no Brasil. *Ciênt Tecnol Aliment*. 2007;27(2):391-3.
9. Santos JS, Beck L, Walter M, Sobczak M, Olivo CJ, Costabeber I, et al. Nitrato e nitrito em leite produzido em sistemas convencional e orgânico. *Ciênt Tecnol Aliment*. 2005;25(2):304-9.
10. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 370, de 04 de setembro de 1997. Regulamento Técnico para fixação de Identidade e Qualidade do Leite UHT (UAT). Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 08 set.1997, Seção 1, nº172, p.19700-997.
11. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 18 de setembro de 2003. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água, 2003. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 18 de set.2003. Seção 1, nº 181, p.14-22.
12. Universidade de Brasília (Brasília - Brasil). Análises microbiológicas para leite fluido. Brasília (DF): Universidade de Brasília; 2007. Disponível em: [<http://www.respostatecnica.org.br/dossie-tecnico/downloadsDT/MTk3>].

13. Andrew SM, Moyes KM, Borm AA, Fox LK, Leslie KE, Hogan JS, et al. Factors associated with the risk of antibiotic residues and intramammary pathogen presence in milk from heifers administered prepartum intramammary antibiotic therapy. *Vet Microbiol*. 2009;134(1-2):150-6.
14. Macedo LCS, Freitas JA. Ocorrência de Resíduos de Antimicrobianos em Leite. *Rev Ciên Agrár*. 2009;52:147-57.
15. Silva PHC. Qualidade do leite produzido e beneficiado no Distrito Federal (Brasil) quanto à adequação à Instrução Normativa nº 51/2002 [dissertação de mestrado]. Brasília (DF): Universidade de Brasília; 2010.
16. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. Altera Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, 30 dez. 2011. Seção 1, nº 25, p.6-11.
17. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, 10 jan. 2001. Seção 1, nº7, p. 45-53.
18. Franco BDGM, Landgraf M. *Microbiologia dos Alimentos*. São Paulo: Editora Atheneu, 2005.182p.
19. Zocche F, Bersot LS, Barcellos VC, Paranhos JK, Rosa STM, Raimundo NK. Qualidade microbiológica e físico-química do leite pasteurizado produzido na região oeste do Paraná. *Arch Vet Sci*. 2002;7(2): 59-67.
20. Silva MCD, Silva JVL, Ramos ACS, Melo RO, Oliveira JO. Caracterização microbiológica e físico-química de leite pasteurizado destinado ao programa do leite no Estado de Alagoas. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2008;28(1):226-30.
21. Ataíde WS, Maciel JF, Lima PLA, Lima ARC, Silva FVG, Silva JA. Avaliação microbiológica e físico-química durante o processamento do leite pasteurizado. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2008;67(1):73-7.
22. Brasil. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Aprovado pelo Decreto nº 30.691, de 29 de março de 1952, alterado pelo Decreto nº 1.255, de 25 de junho de 1962, alterado pelo Decreto nº 1.812, de 09 de fevereiro 1996. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, 08 de fevereiro de 1996. Seção 1, p.2241-43.
23. Sorhaug T, Stepaniak L. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products: Quality aspects. *Trends Food Sci Tech*. 1997;8:35-41.
24. Mercosul. MERCOSUL/GMC/RES nº 75/94. Limites Máximos de Resíduos de Princípios Ativos de Medicamentos Veterinários em Produtos de Origem Animal. [acesso 2014 out. 17]. Disponível em: [http://www.mercosul.int/msweb/Normas/normas_web/Resoluciones/PT/9475.PDF].
25. Codex Alimentarius. Veterinary Drugs Details. [acesso 2014 out. 17]. Disponível em: [<http://www.codexalimentarius.net/vetdrugs/data/vetdrugs/details.html?id=6>] e [<http://www.codexalimentarius.net/vetdrugs/data/vetdrugs/details.html?id=12>].
26. União Europeia. Regulamento (UE) nº 37/2010 da Comissão, de 22 de dezembro de 2009. Relativo a substâncias farmacologicamente activas e respectiva classificação no que respeita aos limites máximos de resíduos nos alimentos de origem animal. [acesso 2014 out. 17]. Disponível em: [http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-5/reg_2010_37/reg_2010_37_pt.pdf].

Controle de qualidade externo nos laboratórios de tuberculose do estado de São Paulo, Brasil

External quality control of the tuberculosis laboratory network of São Paulo state, Brazil

RIALA6/1626

Heloisa da Silveira Paro PEDRO^{1*}, Gleize VILLELA², Andréa Gobeti Vieira COELHO³, Susilene Maria Tonelli NARDI¹, Regina Ruivo Ferro e SILVA⁴, Leonilda Chiari GALLE⁵, Maria de Lourdes M. SHIKAMA⁶, Andréa Rezende LEITE⁷, Rodrigo Friozi POVINELLI¹, Jaqueline Otero SILVA⁸, Maria Helena Leme FERRAZ⁹, Lucilaine FERRAZOLI¹⁰

*Endereço para correspondência: ¹Laboratório de Micobactérias, Núcleo de Ciências Biomédicas, Centro de Laboratórios Regionais – São José do Rio Preto, Instituto Adolfo Lutz, Rua Alberto Sufredini Bertoni, 2325, 1º andar, Maceno, São José do Rio Preto, SP, CEP 15060-020, Tel/Fax: (017) 3224-1423. E-mail: hsppedro@ial.sp.gov.br

²Laboratório de Micobactérias, Núcleo de Ciências Biomédicas, Centro de Laboratórios Regionais – Campinas, Instituto Adolfo Lutz

³Laboratório de Micobactérias, Núcleo de Ciências Biomédicas, Centro de Laboratórios Regionais – Santos, Instituto Adolfo Lutz

⁴Laboratório de Micobactérias, Núcleo de Ciências Biomédicas, Centro de Laboratórios Regionais – Santo André, Instituto Adolfo Lutz

⁵Laboratório de Micobactérias, Núcleo de Ciências Biomédicas, Centro de Laboratórios Regionais – Presidente Prudente, Instituto Adolfo Lutz

⁶Laboratório de Micobactérias, Núcleo de Ciências Biomédicas, Centro de Laboratórios Regionais – Sorocaba, Instituto Adolfo Lutz

⁷Laboratório de Micobactérias, Núcleo de Ciências Biomédicas, Centro de Laboratórios Regionais – Taubaté, Instituto Adolfo Lutz

⁸Laboratório de Micobactérias, Núcleo de Ciências Biomédicas, Centro de Laboratórios Regionais – Ribeirão Preto, Instituto Adolfo Lutz

⁹Laboratório de Micobactérias, Laboratório Municipal da Região Sudeste, São Paulo

¹⁰Núcleo de Tuberculose e Micobacterioses, Centro de Bacteriologia, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo/SP

Recebido: 23.09.2014 - Aceito para publicação: 24.11.2014

RESUMO

Os objetivos deste estudo foram de avaliar a qualidade técnica de laboratórios públicos e conveniados ao Sistema Único de Saúde (SUS) que fazem baciloscopia da tuberculose (TB) e de apresentar os dados do Controle de Qualidade Externo (CQE) realizado na rede de laboratórios de TB do estado de São Paulo, Brasil. Neste contexto, foi realizado o estudo descritivo retrospectivo do CQE de 198 laboratórios supervisionados no biênio 2009-2010. A concordância entre os resultados das baciloskopias executadas nos laboratórios supervisionados e de supervisores foi de 99,4%; e as porcentagens relativas de resultados falso-positivos e falso-negativos foram, respectivamente, de 1,9% e 0,4%. A comparação entre a qualidade dos esfregaços realizados por laboratórios públicos e conveniados mostrou que os públicos apresentaram qualidade superior (valor-p<0,05). Este estudo mostrou que 74,2% dos laboratórios foram aprovados no CQE; e o desempenho dos laboratórios conveniados foi inferior ao dos públicos. Estes dados reforçam a importância de manter programa de CQE de baciloscopia e de capacitação dos profissionais, considerando-se ser este um exame diagnóstico muito utilizado e relevante no país.

Palavras-chave. controle de qualidade, tuberculose pulmonar, microscopia.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the technical quality of acid-fast bacilli (AFB) smears procedure for tuberculosis (TB), which is performed in public and private laboratories (labs) affiliated to the Brazilian Healthcare System, and to report the results of the external quality assessment (EQA) performed in the TB laboratory network of State São Paulo. For such purpose, a retrospective descriptive study of EQA was conducted in 198 supervised labs for a two-year period (2009-2010). The correlation among the AFB smears results from the supervised labs and the supervisors was 99.4%; and the percentages of false-positive and false-negative results were 1.9% and 0.4%, respectively. Comparing the smears performance between the public and private labs, the public labs showed higher quality (p-value<0.05). This study showed that 74.2% of the evaluated labs were approved in the EQA, and that the private labs performance got low-ranking when compared to the public labs results. These findings reinforce the importance of conducting both the CQE programs for AFB smears performance and the technicians and professionals training program as this diagnostic assay is relevant and widely used in Brazil.

Keywords. quality control, pulmonary tuberculosis, microscopy.

INTRODUÇÃO

O Programa Nacional de Controle da Tuberculose (PNCT) tem como objetivo geral reduzir a morbidade, a mortalidade, a transmissão da tuberculose (TB) e cumprir as metas internacionais de controle da doença estabelecidas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e, pactuadas pelo governo brasileiro, de descobrir 70 % dos casos de TB estimados e curar no mínimo 85 % destes. Para o controle efetivo da TB, um importante componente do programa são as ações de diagnóstico e acompanhamento da TB pulmonar, desenvolvidas pela rede de laboratórios que realizam a baciloscopia do escarro^{1,2}.

A Rede Nacional de Laboratórios para o Diagnóstico da Tuberculose é organizada de forma hierárquica, conforme seu nível de complexidade técnica e organizacional. A rede é composta por laboratórios que executam exames de baixa, média e alta complexidade, sendo classificados respectivamente como Laboratórios Locais (LL), Laboratórios de Referência Regional (LRR) e Laboratórios de Referência Estaduais (LRE). No estado de São Paulo, o Instituto Adolfo Lutz Central é LRE para TB e seus 12 Centros de Laboratórios Regionais, localizados estrategicamente nas principais cidades do estado constituem os LRR^{3,4}.

A baciloscopia do escarro é o exame básico para o diagnóstico da TB por ser de execução rápida e de baixo custo, permitindo a pronta interrupção da cadeia de transmissão e o acompanhamento da eficácia do tratamento⁵. Apesar de sua fácil execução, a falta de uma padronização na execução da técnica ou diferentes fatores envolvidos com a qualidade de corantes e reagentes influenciam no resultado final dos exames⁶⁻⁹, sendo necessário um mecanismo efetivo para garantir a qualidade da baciloscopia de toda a rede de laboratórios.

Com o objetivo de melhorar a eficácia dos serviços e a confiabilidade dos resultados, tem sido recomendada a implementação do Sistema de Garantia da Qualidade (SGQ) em todos os laboratórios que fazem baciloscopia de TB⁷.

O SGQ é composto pelo Controle de Qualidade Interno (CQI), que consiste no controle de qualidade dos corantes, reagentes e verificação de equipamentos; Melhoria da Qualidade (MQ), que envolve capacitação dos profissionais, organização e padronização das técnicas e o Controle de Qualidade Externo (CQE)³.

O CQE é realizado por três métodos: teste de

proficiência feito por meio de painéis com lâminas de baciloscopias; releitura cega das lâminas pelos laboratórios de referência e visita aos laboratórios participantes^{7,10,11}. No Brasil, o CQE é realizado por meio da releitura das lâminas e comparação entre os resultados obtidos pelos laboratórios participantes e laboratórios supervisores³ e visita técnica aos laboratórios, que permite ao supervisor conhecer a realidade dos laboratórios com respeito a instalações, qualidade das atividades práticas e condições de biossegurança, indicando ações preventivas e corretivas quando necessário¹².

Com intuito de reforçar e expandir as ações do SUS para o controle de TB e acelerar o alcance das metas no Brasil, o governo brasileiro iniciou um projeto (aprovado pelo Fundo Global para Controle da TB) atingindo 57 municípios das 11 maiores regiões metropolitanas. Uma das principais ações do projeto foi fortalecer o CQE realizado pelos Laboratórios de Referência com a contratação de monitores para a execução das releituras das lâminas e visitas técnicas¹³.

Com este estudo tem-se por objetivo apresentar os resultados do CQE realizado na rede de laboratórios de TB do estado de São Paulo, Brasil, no biênio 2009 e 2010 e avaliar a qualidade técnica dos laboratórios públicos e conveniados ao SUS que fazem baciloscopia da TB.

MATERIAL E MÉTODOS

Rede de laboratórios

O estudo foi realizado a partir da análise retrospectiva dos CQE executados por supervisores de oito Centros de Laboratórios Regionais do Instituto Adolfo Lutz (CLR de Campinas, Santos, São José do Rio Preto, Santo André, Presidente Prudente, Sorocaba, Taubaté e Ribeirão Preto) localizados no interior do Estado de São Paulo (atendendo a uma população de 36.454.258 habitantes, nas regiões de abrangência)¹⁴ e por supervisores contratados pelo Projeto do Fundo Global para CQE no município de São Paulo. Ao todo foram avaliados 198 laboratórios públicos (municipais, estaduais e federais) ou conveniados ao SUS (denominados LL), no biênio 2009 a 2010, com um total de 17.647 baciloscopias avaliadas.

Seleção das lâminas

O CQE foi realizado de acordo com o protocolo

descrito no Manual Nacional de Vigilância Laboratorial da Tuberculose³. Foram solicitadas as lâminas coradas pelo método de Ziehl-Neelsen e cópias dos registros referentes a três meses da rotina diagnóstica de cada LL.

O tamanho da amostra do CQE foi definido adotando as recomendações internacionais para baciloscopia de escarro, para uma sensibilidade de 80 % e especificidade de 100 %, intervalo de confiança de 95 %, adequado ao índice de positividade da baciloscopia dos laboratórios avaliados⁷. Assim, foi determinada uma amostragem aleatória de 80 lâminas para cada laboratório supervisionado³.

Avaliação das lâminas

O CQE da baciloscopia padronizado no estado de São Paulo consiste na releitura cega de baciloscopias selecionadas aleatoriamente, entre as lâminas examinadas na rotina. Após releitura, os resultados são comparados com os obtidos pelo LL e feita uma qualificação do grau de concordância das leituras. Os resultados são informados ao laboratório supervisionado por meio de um relatório detalhado, contendo as principais deficiências técnicas observadas, e recomendações para as ações corretivas³.

São avaliados, também, aspectos macroscópicos dos esfregaços, como homogeneidade, cobertura de 2/3 da lâmina e espessura, sem espaços vazios, nem espesso nem delgado (considerado satisfatório) e a coloração, que deve estar sem precipitados de corante e uniforme (considerada satisfatória). De acordo com a avaliação das características técnicas, as lâminas são consideradas adequadas quando o valor da média da porcentagem do esfregaço satisfatório somada ao valor da média da porcentagem de coloração satisfatória for maior que 80 % e inadequadas quando o valor desta soma for inferior a 80 %³.

Para a avaliação das concordâncias/discordâncias nos resultados, as diferenças dos resultados no número de cruces em lâminas positivas não são consideradas discordâncias significativas para o diagnóstico do paciente. São classificadas como discordantes as lâminas falso-negativas (FN), e as lâminas falso-positivas (FP), e o índice de concordância esperado é de 100 %³.

Análise dos dados

Os dados de todos os CQE realizados pelos

laboratórios supervisores foram transportados para uma planilha do Excel Windows XP Professional e analisadas as variáveis de interesse, considerando frequência e média. Foram analisados os dados referentes à análise macroscópica e microscópica dos esfregaços, coloração e leitura (nº de lâminas FP e FN e nível de concordância dos resultados).

A análise de concordância de leitura entre os laboratórios (supervisor e supervisionado) foi realizada pelo método Kappa, como proposto por Landis e Koch¹⁵. Para as análises comparativas de proporções foram usados o teste do qui-quadrado de Pearson e o exato de Fisher conforme apropriado para variáveis categóricas. Foi considerado como limite para significância estatística o valor- $p \leq 0,05$. Para as análises descritivas utilizaram-se frequências simples e cálculos para os testes diagnósticos.

A análise estatística foi realizada utilizando os *softwares* estatísticos Epi-Info 2002 (versão 3.5.1) e BioStat 2009.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz, em dezembro de 2011 (nº 031/2011).

RESULTADOS

Na Tabela 1 são apresentados os resultados da avaliação da qualidade das baciloscopias, em relação à confecção do esfregaço e coloração das lâminas. Do total de 17.647 baciloscopias avaliadas, 10.381 (58,8 %) foram de laboratórios públicos e 7.266 (41,2 %) de laboratórios conveniados. A qualidade dos aspectos macroscópicos e microscópicos das baciloscopias foi satisfatória em 65,8 % (11.223/17.061) e a coloração satisfatória em 82,8 % (14.582/17.599) das lâminas examinadas. Do total de 5.838 esfregaços insatisfatórios, as falhas técnicas mais frequentes foram a falta de homogeneidade ou a espessura muito fina dos esfregaços. Em relação à coloração, as falhas técnicas mais frequentes foram as descolorações inadequadas e a presença de cristais de fucsina (Tabela 1). A comparação entre qualidade dos esfregaços realizados por laboratórios públicos e conveniados mostrou que o laboratório público apresentou qualidade superior, (valor- $p < 0,05$), com apenas 26,8 % (2.781/10.381) de esfregaços insatisfatórios quando comparados aos 42,1 % (3.057/7.266) obtidos nos laboratórios conveniados ao SUS (Tabela 1).

Tabela 1. Avaliação da qualidade técnica dos esfregaços e da coloração das baciloscopias realizadas pelos laboratórios públicos e conveniados ao SUS que foram supervisionados no biênio 2009-2010, no estado de São Paulo, Brasil

Avaliação técnica	Laboratórios supervisionados			P
	Nº (%) lâminas avaliadas			
	Total n=17.647	Públicos n= 10.381 (%)	Conveniados n= 7.266 (%)	
Esfregaço				
Satisfatório*	11.223	7.014 (62,5)	4.209 (37,5)	<0,001
Não satisfatório	5.838	2.781 (47,7)	3.057 (52,3)	
Não homogêneo	2.777	1.065 (38,4)	1.712 (61,6)	
Espesso	412	251 (60,9)	161 (39,1)	
Delgado	2.649	1.465 (55,3)	1.184 (44,7)	
Coloração**				
Satisfatório	14.582	8.890 (61,0)	5.692 (39,0)	<0,001
Não satisfatório	3.017	1.443 (47,8)	1.574 (52,2)	
Descoloração inadequada	1.482	674 (45,5)	808 (54,5)	
Cristais de fucsina	1.383	726 (52,5)	657 (47,5)	
Aquecimento excessivo	152	43 (28,3)	109 (71,7)	

*Em 586 lâminas a avaliação quanto a qualidade do esfregaço não pode ser realizada nos laboratórios públicos, pois os esfregaços foram feitos a partir do sedimento tratado para cultura; ** Em 48 lâminas a avaliação quanto a coloração nos laboratórios públicos não estava disponível

A concordância conjunta de todos os laboratórios supervisionados nos resultados das baciloscopias foi de 99,4 % (Tabela 2).

Durante o período avaliado foram encontrados 99 erros de concordância qualitativa (erro=0,6 %), sendo 31 erros de FP e 68 erros de FN. A porcentagem relativa de FP foi de 1,9 % e a de FN foi de 0,4 % (Tabela 2). A comparação entre os laboratórios públicos e conveniados quanto ao erro mostrou que os laboratórios conveniados apresentaram o dobro de FN e FP (Tabela 2).

Considerando os resultados das baciloscopias realizadas pelo laboratório supervisor como “padrão ouro”, a taxa de sensibilidade foi de 96 % e especificidade de 99,8 %. O valor preditivo positivo (VPP) foi 98,1 %, e

o valor preditivo negativo (VPN) foi 99,6 %.

Para a avaliação da concordância quantitativa em cruces (realizada a partir da contagem do número de bacilos expresso em cruces), foram excluídas 2.347 lâminas do total de lâminas do CQE, por não possuírem a informação disponível. Os resultados da concordância quantitativa baseada na releitura de 15.401 lâminas estão mostrados na Tabela 3. As lâminas 1+ apresentaram maior concordância (76,2 %), seguidas pelas lâminas de 3+ (75,8 %) e 2+ (69,5 %). A menor concordância foi encontrada nas lâminas contendo 1-9 bacilos/campo (44,1 %). O resultado de concordância total de contagem bacilar (97,1 %) foi considerado bom, de acordo com método Kappa (0,76 %).

Tabela 2. Concordância entre os resultados das baciloscopias dos LL e resultados da releitura pelos Laboratórios Supervisores. Biênio 2009-2010, estado de São Paulo, Brasil

Avaliação	nº (%)* de lâminas avaliadas por laboratórios supervisionados		
	Total	Públicos	Conveniados
	Nº (%)*	n= 10.381 (%)	n=7.266 (%)
Concordância	17.548 (99,4)	10.337 (99,6)	7.211 (99,2)
Erro	99 (0,6)	44 (0,4)	55 (0,8)
Falso Positivo	31 (1,9)	12 (1,2)	19 (2,7)
Falso Negativo	68 (0,4)	32 (0,4)	36 (0,5)

*Percentual relativo; LL= Laboratórios conveniados

Tabela 3. Avaliação da concordância quantitativa das lâminas baseada nos resultados em número de cruzeiros obtidos pelos LL e pelos Laboratórios Supervisores

Laboratório supervisionado Contagem de bacilos	Laboratório Supervisor Contagem de bacilos						Concordância Quantitativa (%)
	Nº Total	Negativo*	1 a 9 BAAR	1+	2+	3+	
Negativo	14.012	13.948	29	21	10	4	99,8
1 a 9 BAAR	92	11	67	5	6	3	44,1
1+	530	9	49	398	64	10	76,2
2+	444	4	5	87	280	68	69,5
3+	323	1	2	11	43	266	75,8
Total	15.401	13.973	152	522	403	351	97,1

*Negativo= nenhum BAAR/100 campos; 1 a 9 BAAR/100 campos; 1+ = 10 a 99 BAAR/100 campos; 2+ = 1 to 9 BAAR/campo em pelo menos 50 campos; 3+ = >10 BAAR/campo em pelo menos 20 campos; **A análise quantitativa foi baseada na releitura de 15.401 lâminas

Do total de 198 laboratórios supervisionados neste estudo, 147 foram considerados aprovados (74,2 %) no CQE realizados no período, isto é, apresentaram 100 % de concordância na releitura das lâminas. A comparação entre o desempenho (concordância na releitura e confecção do esfregaço) dos laboratórios públicos e laboratórios conveniados mostrou diferença significativa, com resultados mais concordantes obtidos dos laboratórios públicos (valor- $p < 0,05$).

No biênio estudado, foram realizados 120 capacitações/treinamentos para os profissionais dos laboratórios supervisionados e 169 visitas técnicas devido a problemas técnicos detectados pelo CQE.

DISCUSSÃO

Uma das prioridades do plano de combate à TB tem sido a avaliação do desempenho laboratorial por meio do CQE das baciloskopias, executado pelos laboratórios de referência da rede de TB¹⁶.

O Protocolo do CQE da baciloscopia usado atualmente no Brasil foi elaborado em 2007, baseado nas recomendações do Consenso Global⁷, e no estado de São Paulo o CEQ, foi padronizado pelo método da releitura cega das lâminas³.

A releitura cega das lâminas por laboratórios de referência é considerada o melhor método para avaliar o desempenho de um laboratório, detectando problemas técnicos que necessitam de ações corretivas, além de

incentivar a melhoria técnica e motivar os profissionais envolvidos⁷.

Considerando que a qualidade técnica satisfatória deve ser ≥ 80 %, a média percentual de 82,8 % da qualidade da coloração encontrada neste estudo está dentro dos limites aceitáveis, entretanto a confecção dos esfregaços ficou abaixo do valor recomendado (65,8 %). A qualidade técnica das baciloskopias realizadas por laboratórios conveniados foi bastante inferior quando comparada com laboratórios públicos, com apenas 37,5 % dos esfregaços satisfatórios e 39,0 % de esfregaços com coloração satisfatória.

Em estudo realizado na Argentina em 2004¹⁰, foi encontrado um valor mais alto na análise da qualidade da coloração (97,3 %), mas a confecção do esfregaço apresentou valor similar (65,3 %), indicando que embora seja de simples execução, a confecção do esfregaço requer atenção especial. No presente estudo, os problemas técnicos observados com maior frequência foram o esfregaço não homogêneo e delgado e na coloração foram descoloração inadequada e presença de cristais de fucsina. Essas dificuldades técnicas devem ser corrigidas, uma vez que espaços vazios na lâmina podem levar a resultados falsos negativos e cristais de fucsina a resultados falsos positivos. Além disso, a má qualidade do esfregaço pode resultar em aumento da estimativa de erros e dificultar a leitura de lâminas positivas. Outro fator que influencia na qualidade da coloração, são as concentrações dos corantes. Nas visitas técnicas

realizadas, observamos que muitos laboratórios utilizam corantes adquiridos comercialmente, em concentrações diferentes das recomendadas (dados não mostrados). Por essa razão, é imprescindível que seja informado no relatório de avaliação do CQE as principais deficiências técnicas observadas, as possíveis causas e recomendações para as ações corretivas³.

Embora 34,2 % dos esfregaços tenham sido considerados insatisfatórios na avaliação técnica, a concordância conjunta das baciloscopias de todos os laboratórios supervisionados foi alta (99,4 %) no período avaliado por este estudo. Resultados similares foram encontrados estudo na Argentina em 2007¹⁷ e Cuba em 2008¹⁸.

A porcentagem relativa de FP e FN neste estudo foi baixa, 1,9 % e 0,4 % respectivamente, quando comparada aos valores encontrados por outros autores^{10,19,20}. Apesar destes erros não serem elevados, a detecção de um FP é considerada um erro grave, exigindo uma investigação imediata das causas do erro, pois pode ocasionar um tratamento desnecessário para indivíduos que não têm TB³.

A detecção de um FN indica que o laboratório apresentou um erro significativo e também não está aprovado no controle de qualidade³. O protocolo estabelecido no Brasil recomenda aos avaliadores investigarem as possíveis causas de erro como, microscópio, corantes, técnicas de esfregaço, coloração e leitura, erros de numeração e transcrição dos resultados. Embora no período avaliado tenham sido realizadas 120 capacitações/treinamentos para os profissionais dos laboratórios supervisionados e 169 visitas técnicas, visando a melhoria técnica dos laboratórios, os resultados deste estudo mostraram que é necessário um investimento ainda maior em treinamentos e capacitações, especialmente para aos laboratórios conveniados.

A taxa de sensibilidade encontrada nesse estudo foi maior que o valor esperado e de especificidade ficou muito próxima do valor esperado. O VPP ficou acima do valor encontrado por Kuznierz et al¹⁰ e o VPN foi similar. Apesar do VPP alto encontrado, há ainda a possibilidade de ocorrência de resultados falso-positivos e erros.

Os resultados da concordância quantitativa em cruces mostraram que as lâminas de 1+ e 3+ apresentam maior concordância na releitura. As baciloscopias contendo 1-9 bacilos/campo apresentaram resultados de concordância de 44,1 %, sendo o número mais baixo. Esse valor pode ser justificado pela pequena quantidade

de bacilos presentes no esfregaço e limitação inerente à própria técnica devido a dificuldade de se realizar leituras dos mesmos campos microscópicos em dois momentos distintos²¹, mesmo que exista uma padronização que determine o posicionamento inicial do primeiro campo microscópico a ser analisado³. No entanto, a concordância dos resultados de contagem bacilar foi considerada alta de acordo com método Kappa (0,76 %).

Este estudo mostrou uma diferença estatisticamente significativa entre a avaliação das lâminas obtidas de laboratórios públicos e laboratórios conveniados do SUS. Os resultados dos laboratórios públicos apresentaram maior concordância nas leituras das baciloscopias que os conveniados (valor- $p < 0,05$).

No passado recente, a baciloscopia era realizada por laboratórios públicos, organizados em rede hierarquizada, de forma a manter a padronização e o controle de qualidade, segundo as diretrizes estabelecidas pelo PNCT¹⁶. No entanto, nos últimos anos, vem ocorrendo um processo de descentralização da baciloscopia, para laboratórios privados e/ou conveniados ao SUS. Estes laboratórios, em sua maioria, iniciam a realização dos exames sem treinamento prévio dos técnicos e sem serem incluídos no programa de CQE. Além disso, as dificuldades técnicas observadas nos laboratórios da rede privada podem também ser devido ao fato dos técnicos realizarem diferentes atividades no laboratório e acumularem diferentes funções.

Os resultados deste estudo mostram a importância de manter um programa de CQE da baciloscopia e treinamentos dos técnicos, preferencialmente antes de iniciarem a rotina de baciloscopia, para que não haja perda da qualidade dos exames, pois a baciloscopia ainda é muito utilizada no país.

Este estudo avalia pela primeira vez no Brasil o desempenho dos laboratórios públicos e conveniados ao SUS que realizam a baciloscopia, o que certamente irá nortear novas ações para melhoria contínua dos laboratórios nacionais que realizam este serviço.

AGRADECIMENTOS

A toda a equipe técnica que realiza baciloscopia da TB e colabora para que o CQE seja realizado a cada ano, atendendo com profissionalismo a todas as solicitações dos Laboratórios de Referência.

REFERÊNCIAS

1. Barreira D, Grangeiro A. Avaliação das estratégias de controle da tuberculose no Brasil. *Rev Saúde Pública*. 2007; 41(supl 1):4-8.
2. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de Controle da Tuberculose. Manual de recomendações para o controle da Tuberculose no Brasil. Brasília (DF): Ministério da Saúde; 2010.
3. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual nacional de vigilância laboratorial da Tuberculose e outras Micobactérias. Brasília (DF): Ministério da Saúde; 2008.
4. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Portaria nº 2.031/GM em 23 de setembro de 2004. Dispõe sobre a organização do Sistema Nacional de Laboratórios de Saúde Pública [Internet site]. Disponível [http://dtr2001.saude.gov.br/sas/PORTARIAS/Port2004/GM/GM-2031.htm]. Acesso 30 Maio 2011.
5. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Tuberculose: guia de vigilância epidemiológica. Brasília (DF): Ministério da Saúde; 2002.
6. Lanata CF, Black RE. Lot quality assurance sampling techniques in health surveys in developing countries: advantages and current constraints. *World Health Stat Q*. 1991; 44:133-9.
7. Aziz MA. External quality assessment for AFB smear microscopy. Washington (DC): APHL; 2002.
8. Selvakumar N, Prabhakaran E, Rahman F, Chandu NA, Srinivasan S, Santha T, et al. Blinded rechecking of sputum smears for acid-fast bacilli to ensure quality and usefulness of re-staining of smears to assess false-positive errors. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2003;7:1077-82.
9. Gilpin C, Kim SJ, Lumb R, Rieder HL, Van Deun A, Working Group on Sputum Smear Microscopy. Critical appraisal of current recommendations and practices for tuberculosis sputum smear microscopy. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2007;11:946-52.
10. Kuszniarz GF, Latini OA, Sequeira MD. Quality assessment of smear microscopy for acid-fast bacilli in the Argentine tuberculosis laboratory network, 1983-2001. *J Tuberc Lung Dis*. 2004;8:1234-41.
11. Vieira FD, Salem JI, Ruffino-Netto A, Camargo AS, Ferro e Silva RR, Moura LCC, et al. Methodology for characterizing proficiency in interpreting sputum smear microscopy results in the diagnosis of tuberculosis. *J Bras Pneumol*. 2008;34:304-11.
12. Rieder HL, Van Deun A, Kam KM, Kim SJ, Chonde TM, Trébuq A, et al. Priorities for tuberculosis technology services in Low-Income Countries. 2nd ed. Paris: International Union Against Tuberculosis and Lung Disease; 2007.
13. The Global Fund. Fighting Tuberculosis. The global tuberculosis epidemic [Internet site]. Available: <http://www.theglobalfund.org/en/about/diseases/tuberculosis/>. Accessed 14 Ago 2013.
14. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Cidades [Internet site]. Disponível: [http://cidades.ibge.gov.br/xtras/uf.php?lang=&coduf=35&search=sao-paulo]. Acesso 14 Ago 2013.
15. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*. 1977; 33:159-74.
16. Galesi VMN, Santos LAR. Tuberculose: a cura em estado de alerta. *Prática Hospital*. 2004;6:67.
17. Imaz MS, Sequeira MD, Red de Laboratorios Provinciales de Tuberculosis en Argentina. Diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis en Argentina: resultados de una encuesta nacional. *Cad Saúde Pública*. 2007;23:885-96.
18. Romero MRM, García G, Cardoso EM. Evaluación de los indicadores de calidad de la baciloscopia de tuberculosis en los laboratorios provinciales de diagnóstico de Cuba. *Arch Venez Farmacol Ter*. 2008;27:110-3.
19. Mundy CJF, Harries AD, Banerjee A, Salaniponi FM, Gilks CF, Squire SB. Quality assessment of sputum transportation, smear preparation and AFB microscopy in a rural district in Malawi. *Inter J Tuberc Lung Dis*. 2002;6:47-54.
20. Van Deun A, Portaels F. Limitations and requirements for quality control of sputum smear microscopy for acid-fast bacilli. *Int J Tuberc Lung Dis*. 1998;2:756-65.
21. Paramasivan CN, Venkataraman P, Vasanthan JS, Rahman F, Narayanan PR. Quality assurance studies in eight State tuberculosis laboratories in India. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2003;7:522-7.

Análise laboratorial de bolos destinados para público infantil e comparação com as informações nutricionais contidas nos rótulos e adequação à legislação

Laboratory analysis of cakes for children and comparison with the nutritional information included in the label and their adequacy to the legislation

RIALA6/1627

Bruna dos Anjos PEDERZOLI*, Andressa de Assis LOURENÇO, Fabiana Torma BOTELHO

*Endereço para correspondência: Laboratório de Bromatologia, Faculdade de Nutrição, Universidade Federal de Pelotas, Rua Gomes Carneiro, 01, sala 236, Pelotas/RS. CEP 96010-610. Telefone: 53 3227-5262. E-mail: brunapederzoli@gmail.com
Recebido: 10.10.2014 - Aceito para publicação: 30.12.2014

RESUMO

A Resolução nº 360 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabelece o regulamento sobre rotulagem nutricional e de sua obrigatoriedade em alimentos embalados. Os conteúdos declarados não devem ultrapassar 20 % para mais ou para menos do valor real. Neste trabalho foi determinada a composição nutricional de bolos destinados ao público infantil. Os dados obtidos foram comparados com as informações contidas no rótulo, e sua adequação com a legislação brasileira foi averiguada. Foram analisados bolos de 13 diferentes sabores e de três marcas (A, B e C). Umidade, cinzas e sódio foram determinados seguindo-se as metodologias estabelecidas pelo Instituto Adolfo Lutz. As determinações de lipídeos, proteínas e fibras foram executadas seguindo os métodos da Association of Official Analytical Chemists; e os valores de carboidratos foram obtidos por diferença. Dos 13 bolos analisados, nenhum demonstrou conformidade com a legislação em todos os nutrientes. As maiores inconformidades foram detectadas nas amostras da marca B e nos nutrientes fibra e sódio. Os valores de fibras e de sódio foram, respectivamente, inferiores e superiores àqueles mencionados nos rótulos. É relevante a fidedignidade das informações nutricionais de produtos, para que os rótulos sirvam como ferramenta de apoio nas escolhas destes pelos consumidores.

Palavras-chave. composição físico-química, sódio, fibras, legislação, nutrientes.

ABSTRACT

The Brazilian Health Surveillance Agency settles the regulation to the nutritional characteristics labeling and on the mandatory article in all of the packed products by means of the Resolution nº 360. The asserted contents declared in the label should not exceed < 20 % or > 20 % of the actual value. This study evaluated the physico-chemical composition of cakes for children, and these data were compared with the nutritional information on the label and their adequacy to the Brazilian regulation was investigated. Cake samples of 13 different flavors and from three brands (A, B and C) were analyzed. Humidity, ashes and sodium were determined following the methods established at Adolfo Lutz Institute. The lipids, proteins and fibers determinations were performed following the Association of Official Analytical Chemists methodology. Carbohydrates contents was obtained by calculating the difference. Of the analyzed samples, none of them complied with the legislation in all of the nutrients. The brand B and the fiber and sodium nutrients were the mostly noncompliant findings. Concerning the fiber and sodium contents, they were usually smaller and greater, respectively, than those values reported in the labels.

Keywords. Physics- chemical composition, sodium, fibers, legislation, nutrients.

INTRODUÇÃO

As informações nutricionais contidas nos rótulos dos alimentos têm como intuito identificar a qualidade e quantidade de nutrientes nos produtos alimentícios, constituindo um elemento fundamental para a saúde pública. Além disso, também tem o objetivo de garantir o direito à informação do cidadão-consumidor, auxiliar na seleção e aquisição de alimentos saudáveis e auxiliar na promoção de escolhas alimentares apropriadas aos consumidores sendo, portanto, necessário que tais informações sejam seguras¹.

A Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) da ANVISA nº 360², que aprova o regulamento técnico sobre rotulagem nutricional de alimentos embalados, torna obrigatória a rotulagem nutricional. Segundo essa resolução, a tolerância máxima admitida em relação aos nutrientes declarados no rótulo é de 20 % para mais ou para menos.

Câmara et al¹ avaliaram estudos de outros autores relacionados à rotulagem nutricional de alimentos, como leite longa vida, azeite de oliva, produtos diet, queijos, carnes, produtos importados, dentre outros. Os resultados, frente a legislação específica sobre rotulagem de alimentos, apontaram um grande número de inadequações, principalmente em relação aos valores declarados nas informações nutricionais.

De acordo com o artigo 6º da Lei 8078/90 do Código de Proteção e Defesa do Consumidor³, é por meio dos rótulos dos alimentos que se tem acesso a informações como quantidade, características nutricionais, composição, qualidade e riscos que os produtos podem apresentar. É válido destacar que a tolerância máxima permitida de acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) pode ser considerada alta e acabar desrespeitando o Código de Defesa do Consumidor, uma vez que implica afirmar que os consumidores não têm acesso à quantidade exata dos nutrientes dos alimentos¹.

A alimentação é um dos fatores que contribui para o aparecimento de doenças crônicas não transmissíveis associadas à obesidade, como exemplo o *Diabetes Mellitus* tipo 2 e a hipertensão, sendo que cabe aos consumidores realizarem escolhas alimentares saudáveis com o auxílio das informações nutricionais contidas no rótulo, como forma de reduzir o risco de tais doenças em crianças e futuros adultos⁴.

Considerando que alimentos infantis, como bolos industrializados em porções individuais, podem ser selecionados pelos pais como opções de lanches para seus filhos, muitas vezes com base nas informações contidas na rotulagem, o objetivo deste estudo foi determinar a composição físico-química de bolos destinados ao público infantil e comparar com a informação nutricional contida no rótulo, assim como a adequação com a legislação brasileira de rotulagem nutricional.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizada uma pesquisa em todos os supermercados das cidades de Rio Grande e Pelotas, no Rio Grande do Sul, com o objetivo de conhecer as marcas de bolos individuais com apelo infantil nas embalagens, onde foram identificadas três marcas disponíveis no mercado.

As três marcas diferentes foram denominadas como marca A, B e C, sendo oito sabores da marca A, três sabores da marca B e dois sabores da marca C, totalizando 13 bolos diferentes, onde os sabores foram identificados com valores numéricos de 1 a 13. Foram adquiridos 39 bolos nos supermercados visitados e encaminhados ao laboratório onde foram realizadas as análises físico-químicas, no período de abril a junho de 2014.

Para o preparo das amostras, utilizou-se um bolo de 40 ou 45g, conforme a quantidade na embalagem. Cada bolo foi triturado para homogeneização e posteriormente colocado em sacos plásticos hermeticamente fechados e identificados até a realização das análises físico-químicas.

A determinação de umidade foi feita por secagem direta em estufa a 105 °C e os resultados de cinzas foram obtidos por meio de incineração à temperatura de 500-550 °C em mufla, descritas pelas normas do Instituto Adolfo Lutz⁵. Para determinação de lipídeos utilizou-se o método de Soxhlet, a determinação de proteína foi realizada a partir do método Kjeldhal (fator de conversão: 5,7)⁶ e fibra bruta pelo método gravimétrico, seguindo os métodos descritos pela Association of Official Analytical Chemists⁷. Os carboidratos foram calculados por diferença (% umidade + % cinzas + % lipídeos + % proteína + % fibra - 100 = carboidratos). A determinação de sódio, sob a forma de Cloreto de sódio (NaCl), foi realizada por calcinação seguida de titulação com nitrato de prata, de acordo com metodologia do Instituto Adolfo Lutz⁵. O valor energético foi determinado a partir da soma do produto da multiplicação dos teores de proteína

por 4 kcal/g, lipídios por 9 kcal/g e carboidrato por 4 kcal/g, segundo a RDC nº 360 da ANVISA². Todas as análises foram realizadas em triplicata, utilizando três lotes diferentes de cada sabor de bolo e para cada lote as análises foram realizadas em duplicata, onde os resultados obtidos foram submetidos ao cálculo de média.

Os resultados obtidos com as análises de composição nutricional foram comparados com as informações nutricionais contidas nos rótulos e com os limites estabelecidos de acordo com a RDC nº 360 da ANVISA², de 20 % para mais ou para menos na diferença entre os valores declarados na rotulagem nutricional do produto e os encontrados na análise. Os valores que ultrapassaram tais limites foram considerados em desacordo com a legislação vigente.

RESULTADOS

Das 13 amostras analisadas, nenhum bolo estava de acordo com a legislação brasileira² em todos os nutrientes analisados, sendo que todas as marcas tiveram amostras com inadequações em relação a algum nutriente declarado no rótulo (Tabela 1 e 2).

A partir da Tabela 1, pode-se observar que em relação as três marcas, a marca A apresentou inadequações apenas no nutriente fibras, em seis sabores dos oito analisados. Na Marca B, ocorreram inadequações no conteúdo de carboidratos e lipídeos de dois sabores e de fibras em todos os três analisados. Já na Marca C, apenas um sabor dos dois analisados mostrou inadequações no conteúdo de lipídeos e fibras.

Apesar de alguns nutrientes apresentarem inconformidades, no cálculo do valor energético e conteúdo de proteínas não houve inadequações entre as análises realizadas e as informações contidas nos rótulos dos bolos. Embora os valores analisados de proteínas estejam de acordo com a informação contida no rótulo, uma marca apresentou percentual máximo permitido pela legislação (20 %) (Tabela 1).

Em relação ao macronutriente carboidrato, apenas uma marca apresentou inconformidade com a legislação, sendo que dois sabores, dos três disponíveis por essa marca, apresentaram valores superiores. Já em relação ao conteúdo de lipídeos, foi possível constatar que três amostras apresentaram valores inferiores nas análises quando comparados aos valores declarados no rótulo (Tabela 1).

Tabela 1. Diferença (%) entre valores rotulados e analíticos da composição nutricional em 40 g de bolos considerando ± 20 % de tolerância e avaliação da concordância (AC) entre o valor rotulado

Amostra	Valor				Fibra		
	Energético* (%)	Carboidratos* (%)	Proteínas* (%)	Lipídeos* (%)	Bruta* (%)	AC	
Marca A	1	0,5	8,01	13,85	14,39	11,32	A
	2	4,04	3,93	12,99	18,75	31,13	D
	3	4,55	1,37	8,67	15,31	10	A
	4	14,25	17	10,84	10	83,01	D
	5	4,89	1,33	6,35	10,39	85	D
	6	0,59	0,81	13,85	5,85	76,08	D
	7	1,40	0,83	2,15	7,50	92,74	D
	8	8,33	3,39	5,5	16,42	85,45	D
Marca B	9	7,78	21,35	13,63	38,33	92,5	D
	10	2,34	17,8	20	16,40	91,66	D
	11	8,98	52,81	12,27	29,60	87,5	D
Marca C	12	5,05	1,6	1,6	27,57	90	D
	13	5,58	8,64	10,37	4,84	14,44	A

*Os dados obtidos correspondem às médias de seis repetições de cada sabor de bolo.

A = Acordo; D = Desacordo. Dados em desacordo estão em negrito

Já em relação ao nutriente sódio (Tabela 2), das 13 amostras analisadas, apenas quatro amostras (30,76 %) estavam de acordo com a legislação vigente em relação ao teor de sódio. Entre as marcas, cinco amostras da marca A (3, 4, 5, 6, e 8), duas amostras da marca B (10 e 11) e uma amostra da marca C (13) apresentaram valores superiores aos 20 % da tolerância estabelecida pela legislação, variando de 23,92 % até 46,61 %.

Fibras e sódio foram os nutrientes com maior número de inconformidades dentre as amostras. Os resultados encontrados nas análises de fibras foram inferiores aos contidos nos rótulos, tendo em vista que os valores foram maiores do que os 20 % permitidos pela legislação, variando de 31,13 % a 92,74 %. Enquanto que a maioria dos resultados encontrados de sódio nas análises foi maior do que aos declarados nos rótulos dos bolos.

DISCUSSÃO

Philippi, Rigo e Lorenzano⁸, analisando diferentes tabelas nacionais e internacionais concluíram que para um mesmo grupo de alimentos, os teores de carboidratos, lipídeos, proteínas, fibras e energia diferem, o que certamente influencia no cálculo final de uma dieta, tanto para macro, quanto para micronutrientes. A exemplo também está o estudo de Rodrigues et al⁹, que detectou que dentre 26 amostras de batata-palha, foram encontrados nutrientes (carboidrato, proteína, lipídeo, fibra e sódio) em quantidade superior ou inferior aos valores declarados nos rótulos das embalagens, ultrapassando a margem de erro superior a 20 % para algum tipo de nutriente. Em relação ao sódio, o erro foi de até 51 % acima do tolerado em 67 % das marcas.

Outros trabalhos que também analisaram a

Tabela 2. Diferença (%) entre valores rotulados e analíticos de sódio em 40 g de bolos considerando ± 20 % de tolerância e avaliação da concórdia (AC) entre o valor rotulado

Amostra	Sódio rotulado (mg)	Média de Sódio analítico (mg)*	% de diferença	AC	
Marca A	1	112,66	126,36	12,16	A
	2	91,55	100,02	9,25	A
	3	108	140,57	30,15	D
	4	101,33	148,56	46,61	D
	5	112,66	145,38	29,04	D
	6	112,66	164,40	45,92	D
	7	95,11	67,92	28,58	D
	8	112	138,80	23,92	D
Marca B	9	62	68,36	10,25	A
	10	50	66	32	D
	11	64	86,28	34,81	D
Marca C	12	148	160,04	8,13	A
	13	143	198,90	39,09	D

*Os dados obtidos correspondem às médias de seis repetições de cada sabor de bolo
A = Acordo; D = Desacordo. Dados em desacordo estão em negrito

composição dos alimentos e compararam os resultados com a informação nutricional declarada no rótulo de produtos alimentícios, também encontraram diferenças entre os valores que estavam declarados nos rótulos e os valores que foram encontrados em análises laboratoriais^{9,10}.

Silva e Dutra¹¹, compararam informações contidas na rotulagem nutricional de preparados instantâneos tipo “Sopão” e verificaram que entre 21 amostras analisadas de sete marcas de sopão sabor carne, apenas duas amostras apresentaram conformidade em todos os componentes da informação nutricional avaliados e os resultados de lipídeos e sódio apresentaram maior porcentagem em desacordo com a legislação vigente.

De acordo com os resultados de Sauerbronn¹², que analisou 10 amostras de massa alimentícia de diferentes marcas, a maioria dos resultados analíticos dos macronutrientes estavam em desacordo, distante de 20 % tolerado. Quanto aos valores de sódio, 50 % das amostras possuíam valor declarado para teor de sódio em desacordo com a legislação vigente.

Segundo Mello et al¹⁰, que avaliaram três marcas de barras de cereais com sabor banana com chocolate, encontrou-se diferenças acima do valor estipulado pela RDC nº 360 da ANVISA². Tais barras tiveram percentuais de inadequações de 79 %, 80 % e 84,4 % no nutriente fibra quando comparados ao rótulo do produto. Ainda que, barras de cereais sejam associadas pelos consumidores à produtos saudáveis, constituídas de formulações balanceadas com fibras alimentares. Estes altos percentuais de inadequações podem ser explicados devido ao método adotado no estudo de Mello et al¹⁰, para determinação de fibra bruta, podendo ocorrer perdas de fibras no decorrer do processamento. Em relação ao conteúdo de fibras analisado no presente estudo, os valores encontrados correspondem à fibra bruta e não especificamente à fibra alimentar. Esse fato se deve pelos diferentes métodos adotados para análise de fibras, sendo que o utilizado neste estudo está sujeito a possíveis perdas de fibras solúveis ao decorrer do processamento. A determinação de fibra alimentar solúvel e insolúvel pelo método enzimático gravimétrico seria a mais apropriada, não sendo possível a realização devido ao maior custo com kits enzimáticos.

Resultados similares ao presente estudo foram encontrados em análises realizadas pelo Instituto Brasileiro de Defesa do Consumidor (IDEC), que pesquisou o conteúdo de sódio em 291 alimentos industrializados como bolos, bolachas recheadas, pães,

salsichas, mortadelas e linguiças. Dentre 90 marcas, 27 apresentaram variação de mais de 20 %, para mais ou para menos no conteúdo de sódio declarado em seus rótulos¹³.

O presente estudo corrobora com resultados de outros estudos, mostrando as inconformidades existentes em relação à rotulagem nutricional em diferentes produtos alimentícios, mostrando a falta de informações seguras na rotulagem nutricional dos bolos destinados ao público infantil, colocando em dúvida o grau de importância que as empresas dão aos seus produtos e aos consumidores.

Esses bolos, muitas vezes, são selecionados pelos pais como opções de lanches para seus filhos, que podem fazer suas escolhas alimentares baseadas nas informações nutricionais, tais como as fibras. Além disso, torna-se preocupante os valores superiores que foram encontrados em relação à quantidade de sódio, visto que a Organização Mundial da Saúde (OMS) estabelece limites de consumo diário para crianças, limitando o máximo de 2 g de sódio ou 5 g de sal, limites que devem ser ajustados, levando em conta a idade, peso e necessidades calóricas de cada criança, já que a pressão arterial sistêmica elevada na infância, possui associação significativa com o mesmo problema na vida adulta¹⁴.

A preocupação com as informações nutricionais corretas dos produtos alimentícios tem preocupado órgãos como a ANVISA que buscou integrar a realização de um grupo de trabalho sobre rotulagem nutricional juntamente ao Conselho Federal de Nutricionistas (CFN)¹⁵, com o objetivo de melhorar as informações expressas nos rótulos dos alimentos, facilitando a compreensão dos consumidores pois entende-se que o rótulo é importante ferramenta de comunicação entre os produtos e consumidores e que estes podem auxiliar na promoção da saúde da população brasileira.

CONCLUSÃO

Entre as 13 amostras de bolos analisadas, nenhuma apresentou conformidade com a legislação vigente em todos os nutrientes analisados. Os nutrientes fibras e sódio foram os que apresentaram maiores inconformidades, sendo que a maioria obteve resultados inferiores no conteúdo de fibras e superiores no conteúdo de sódio, do que os apresentados nos rótulos.

Ressalta-se a importância da indústria em se adequar à legislação vigente sobre rotulagem nutricional, garantindo a fidedignidade das informações

disponibilizadas para que os consumidores possam utilizar os rótulos como ferramenta de apoio em suas escolhas alimentares.

REFERÊNCIAS

1. Câmara MCC, Marinho CLC, Guilam MC, Braga AMCB. A produção acadêmica sobre a rotulagem de alimentos no Brasil. *Rev Panam Saude Publica*.2008;23(1):52-8.
2. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – ANVISA. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 360 de 23 de dezembro de 2003. Regulamento Técnico Sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos. Diário Oficial da União República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 2003.
3. Brasil. Ministério da Justiça. Código de Defesa do Consumidor (CDC). Lei nº 8 078/90 de 11 de setembro de 1990. Acessado em 21 jul. 2014. Disponível em: [http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l8078.htm]
4. Leal VS, Lira PIC, Oliveira JS, Menezes RCE, Sequeira LAS, Neto MAA, et. al. Excesso de peso em crianças e adolescentes no Estado de Pernambuco, Brasil: prevalência e determinantes. *Cad Saúde Pública*.2012; 28(6):1175-82.
5. 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.
6. Food and Agriculture Organization – FAO. Organização Mundial de Saúde - OMS. Necessidades de energia e de proteínas. Informe de um Comitê Especial Misto FAO/OMS. Roma, 1973, 138p.
7. Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists (method 920.39,C). Arlington: AOAC, c. 33. p. 10-2, 1995.
8. Philippi ST, Rigo N, Lorenzano C. Estudo comparativo entre tabelas de composição química de alimentos para avaliação de dietas. *Rev Nutr*.1995; 8(2):200-13.
9. Rodrigues HF, Silva LFM, Ferreira KS, Nogueira, FS. Avaliação de rotulagem nutricional composição centesimal e teores de sódio e potássio em batatas-palha. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2010; 69(3):423-7.
10. Mello AV, Cassimiro, TAS, Pospishek VS, Villarim WLF, Pereira IRO, Abreu ES. Avaliação da composição centesimal e da rotulagem de barras de cereais. *E-Scientia*. 2012; 5(2): 41-8.
11. Silva AM, Dutra MBL. Rotulagem de preparados instantâneos tipo “sopão”. *Rev Alim Nutr*.2012; 23(1):51-4.
12. Sauerbronn ALA. Análise laboratorial da composição de alimentos processados como contribuição ao estudo da rotulagem nutricional obrigatória de alimentos e bebidas embalados no Brasil [dissertação de mestrado]. Rio de Janeiro (RJ): Fundação Oswaldo Cruz, 2003.
13. Instituto Brasileiro de Defesa do Consumidor. IDEC. Revista do IDEC. Julho de 2014. Acesso em 21 jul. 2014. Disponível em: [http://www.idec.org.br/uploads/revistas_materias/pdfs/189-alimentos1.pdf]
14. World Health Organization - WHO. Guideline: Sodium intake for adults and children. Geneva; 2012.
15. Conselho Federal de Nutricionistas - CFN. Junho de 2014. Acessado em 17 ago. 2014. Disponível em: [<http://www.cfn.org.br/eficiente/sites/cfn/ptbr/site.php?secao=noticias&pub=1944>]

Avaliação da qualidade microbiológica de queijos do tipo Minas padrão de produção industrial, artesanal e informal

Microbiological evaluation of Minas type cheeses from industrial, artisanal and informal manufacturing

RIALA6/1628

Amanda Laryssa Borges do Carmo AMORIM, Emanuel Pereira COUTO, Angêla Patrícia SANTANA, Jaqueline Lamounier RIBEIRO, Márcia de Aguiar FERREIRA*

*Endereço para correspondência: Laboratório de Análises de Leite e Derivados, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, *Campus* Universitário Darcy Ribeiro, Brasília, Brasil, CEP 70910-900. Tel.: (61)3107-7226. E-mail: mafer@unb.br

Recebido: 05.09.2014 - Aceito para publicação: 13.11.2014

RESUMO

Os objetivos deste estudo foram de avaliar a qualidade microbiológica de queijos do tipo Minas padrão, produzidos de forma industrial com inspeção federal, artesanal com inspeções estadual e municipal (a partir de leite não pasteurizado) e informal (produção caseira), bem como de analisar os hábitos de consumo desse tipo de queijo no Distrito Federal, Brasil. As amostras (n = 21) foram submetidas a análises para a pesquisa de coliformes a 30 °C e 45 °C, *Staphylococcus coagulase* positiva, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. Os resultados foram avaliados de acordo com a RDC 12/2001 da ANVISA; 57,14 % das amostras de queijos industriais, 100 % das informais e 100 % das artesanais estavam em desacordo quanto às contagens de *Staphylococcus coagulase* positiva. As contagens de coliformes a 45 °C estavam em desacordo em 71,42 % das amostras de queijos informais e 14,28 % das industrializadas e artesanais. Nenhuma amostra foi positiva para *L. monocytogenes* ou *Salmonella* spp. Um questionário simplificado sobre o consumo de queijo Minas foi aplicado a 50 pessoas no momento da compra e houve indicação de 47 % de preferência ao sabor de queijos informais. Em virtude destes queijos não serem inspecionados e não seguirem padrões de produção, representam um risco à saúde pública.

Palavras-chave. coliformes, *Staphylococcus coagulase* positiva, *Listeria* spp.

ABSTRACT

This study aimed at evaluating the microbiological quality of Minas type cheeses, manufactured in industrial scale under federal inspection, artisanal production (from unpasteurized milk) under state and municipal inspections and informal (home production). Also the Minas type cheeses consumption habits among the population of Distrito Federal, Brazil were assessed. Microbiological quality was evaluated in 21 samples by performing the following analyses: coliforms counts at 30 °C and 45 °C, enumeration of coagulase-positive *Staphylococcus* and detection of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. According to the RDC 12/2001 from ANVISA, 57.14 % of industrial, 100 % of informal and 100 % of artisanal samples were noncompliant in the coagulase-positive *Staphylococcus* counts. In addition, 71.42 % of informal samples and 14.28 % of artisanal and informal cheeses showed coliforms counts at 45 °C above the permitted one. No sample was positive for *L. monocytogenes* and *Salmonella* spp. A simplified questionnaire regarding Minas cheese consumption was applied to 50 persons at purchase time, and 47 % of the interviewees preferred the taste of informal cheeses. Nevertheless, the informal cheeses are not inspected and do not follow the production standards; therefore they represent a risk to the public health.

Keywords. coliforms, coagulase-positive *Staphylococcus*, *Listeria* spp.

INTRODUÇÃO

Os queijos são, em geral, produtos muito manipulados e, por este motivo, passíveis de contaminação, especialmente de origem microbiológica. O consumo de queijos contaminados pode ocasionar diversas doenças de origem alimentar, desde zoonoses (brucelose, tuberculose) até intoxicações alimentares. Queijos produzidos a partir de leite cru, ou produzidos em condições de higiene insatisfatórias, podem se tornar impróprios para o consumo¹.

Dentre os queijos mais produzidos no Brasil, está o queijo tipo Minas e suas variedades mais importantes: frescal e padrão. Os queijos tipo Minas padrão industrializados são elaborados a partir de leite pasteurizado, em indústria laticinista, com serviço de inspeção, e devem atender aos requisitos de qualidade e identidade, estabelecidos pela Portaria No. 146, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA²; os queijos artesanais são produzidos a partir de leite cru, em queijarias³ e devem atender aos padrões estabelecidos pela Lei 20.549, de Dezembro de 2012, de âmbito do estado de Minas Gerais⁴; e os queijos ditos informais, não passam por controle de qualidade, não são inspecionados e geralmente são comercializados em feiras ou por ambulantes, sem os cuidados necessários na produção e conservação.

Pesquisas demonstram problemas na qualidade desses tipos de queijos, constatando altos níveis de contaminação microbiana, geralmente atribuídas à manipulação excessiva, à falta de boas práticas, ao alto teor de umidade que favorece o desenvolvimento de micro-organismos indesejáveis e à forma de produção, entre outras causas^{5,6}.

São escassos os dados sobre a qualidade higiênica e sanitária de queijo tipo Minas padrão proveniente de diferentes formas de produção (industriais, informais e artesanais) na região do Distrito Federal. Assim, a presente pesquisa teve como objetivo avaliar a qualidade microbiológica desse tipo de queijo comercializado na região e identificar as preferências dos consumidores.-

MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas 21 amostras de queijo tipo Minas padrão (sete de fabricação industrial, sete de produção informal e sete artesanais) em supermercados, feiras permanentes, padarias e lojas especializadas do Distrito

Federal, sendo mantidas refrigeradas e transportadas para o Laboratório de Análises de Leite e Derivados, da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, da Universidade de Brasília (FAV/UnB).

As amostras foram semeadas para contagem de Coliformes Totais (CT), Coliformes Termotolerantes (CTt) e *Staphylococcus* coagulase positiva, conforme preconizado pela Instrução Normativa No. 62 de 2003, do MAPA⁷. Para a detecção de *Salmonella* spp., a metodologia empregada foi a descrita por Wehr e Frank⁸. Na pesquisa de *Listeria monocytogenes*, inicialmente utilizou-se o método BAM/FDA contido em Silva et al⁹, até a fase de plaqueamento seletivo diferencial em Palcam *Listeria* Selective Agar, para isolamento das colônias suspeitas e típicas; a identificação foi realizada por técnica de PCR (Polimerase Chain Reaction), segundo o protocolo proposto por Kérouanton et al¹⁰, no Laboratório de Microbiologia de Alimentos da FAV/UnB. Os *primers* utilizados foram os descritos abaixo, sendo que o surgimento de bandas de 274 pb e 370 pb indicava amostras positivas para *Listeria monocytogenes* e de banda de 370 pb indicava amostra positiva para *Listeria* spp.

LIP1	5'-GATACAGAAACATCG- GTTGGC-3'	274 bp (gene flagelina L.
LIP2A	5'-GTGTAATCTTGATGC- CATCAGG-3'	monocytogenes)
Prs-F	5'-GCTGAAGAGATTGC- GAAAGAAG-3'	370 bp (<i>Listeria</i> sp.) fosforibosil-
Prs-R	5'-CAAAGAAACCTTG- GATTTGCGG-3'	pirofosfato sintetase

Sendo gene *Lip* específico para *Listeria monocytogenes* e o gene *prs* comum ao gênero *Listeria*.

Ainda, foi realizada uma pesquisa de campo na qual foram entrevistados 50 consumidores (25 homens e 25 mulheres) por meio de um questionário simplificado, no qual, além de dados de identificação (sexo e idade), constavam questões que abordavam: o hábito de consumir queijos do tipo Minas padrão; se afirmativo, com que frequência (diária, semanal, mensal); forma de aquisição do produto (mercados, feiras, ambulantes, outros); opinião sobre qual tipo considerava mais saboroso; e, conhecimento sobre diferenças de produção

entre queijos industrializados, artesanais e informais. As entrevistas foram realizadas nos estabelecimentos em que foram coletadas as amostras de queijos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram adotados os critérios microbiológicos estabelecidos para queijos de alta umidade, referentes a amostras indicativas, com base no anexo I da RDC N.º 12/2001¹¹ e descritos abaixo.

Coliformes 45 ° C (NMP/g).....	5,0 x 10 ³
<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva (UFC/g).....	1,0 x 10 ³
<i>Listeria</i> spp./25g.....	ausência
<i>Salmonella</i> spp./25g.....	ausência

Extraído da RDC No. 12/2001 da ANVISA

Essa resolução não estabelece critérios para enumeração de CT nesse tipo de queijo, entretanto esses micro-organismos quando presentes em altas contagens indicam condições de higiene insatisfatórias na fabricação, falhas no beneficiamento da matéria prima e/ ou recontaminação. Com relação aos CT, observou-se que 17 amostras (81 %) apresentaram contagens que variaram de 23 a 1,1 x 10⁴ NMP/g, sendo que em 11 (52,3 %) as contagens foram maiores ou iguais que 1,1 x 10³ NMP/g (uma de queijo industrializado, cinco de artesanais e cinco de informais). Brant et al¹² analisaram 40 amostras de queijo Minas artesanal do Serro e constataram que 80 % das amostras apresentaram coliformes a 35 °C acima de 5x10³ NMP/g.

Os resultados das análises de queijo tipo Minas padrão industrializado demonstraram uma amostra (14,28 %) com contagem de CTt acima do estabelecido. Esses micro-organismos são indicadores de provável contaminação de origem fecal em alimentos, sendo *E. coli* a principal bactéria indicadora deste tipo de contaminação e, sua presença em altas contagens pode representar risco à saúde dos consumidores¹³. Quatro amostras (57,14 %) apresentaram contagens de *Staphylococcus* coagulase positiva iguais ou maiores do que 5,0 x 10³ UFC/g, portanto, em desacordo com a legislação vigente; que podem indicar manipulação excessiva e inadequada, além de representar risco potencial pela possibilidade de serem *S. aureus* enterotoxigênicos. Nenhuma amostra apresentou desenvolvimento de *L. monocytogenes* ou de

Salmonella spp.

Nos resultados obtidos nas análises de amostras de queijos tipo Minas padrão artesanais, observou-se: uma amostra (14,28 %) com enumeração de CTt de 3,0 x 10⁴ NMP/g; 100 % em desacordo com o limite estabelecido para *Staphylococcus* coagulase positiva sendo que as contagens variaram de 3,1 x 10³ UFC/g a 4,7 x 10⁵ UFC/g; também nessas amostras, não foram detectadas a presença de *L. monocytogenes* ou de *Salmonella* spp.

O queijo tipo Minas padrão artesanal é produzido a partir de leite cru, ou seja, sem passar por tratamento térmico, sendo que sua produção consiste em uma atividade tradicional em vários municípios mineiros, além de uma importante atividade geradora de renda. O governo estadual de Minas Gerais, no intuito de resguardar a produção artesanal do queijo Minas, elaborou e publicou a Lei n.º 14.185, de 31 de janeiro de 2002, que dispõe sobre o processo de produção do queijo Minas artesanal e definiu normas de fabricação, de embalagem e de transporte do queijo artesanal, além da obrigatoriedade de certificação de qualidade dos produtores e o cadastramento oficial das queijarias⁵.

O fermento utilizado é o “pingo”, que é retirado na segunda etapa da cura, após a salga. Dentre os micro-organismos que podem estar presentes no “pingo” estão *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, e *Streptococcus*. Entretanto, a microbiota existente nesse soro utilizado como fermento, por ser extremamente variável, pode conter inclusive, diversos micro-organismos patogênicos como *Streptococcus agalactiae* e leveduras, além de diversos deteriorantes^{12,14}.

Nos resultados obtidos nas análises das amostras de queijos tipo Minas padrão provenientes de produção informal, observou-se que cinco amostras (71,42 %) apresentaram contagens de CTt acima do estabelecido pela legislação que, variaram de 3,0 x 10⁴ NMP/g a 1,6 x 10⁵ NMP/g; 100 % das amostras apresentaram elevadas contagens de *Staphylococcus* coagulase positivas que, variaram de 2,5 x 10⁶ UFC/g a 1,75 x 10⁷ UFC/g. Assim como nas amostras de queijos tipo Minas padrão de fabricação industrial e artesanal, não foram detectadas as presenças de *Salmonella* spp. ou de *L. monocytogenes* nas amostras de queijo provenientes de fabricação informal. Geralmente, o leite utilizado na fabricação de queijos informais (tanto frescal, quanto padrão) não passa por nenhum processo que vise eliminar sujidades ou contaminações, e a manipulação é excessiva e por vezes realizada por pessoas sem nenhum conhecimento e/ou cuidado de higiene. O momento da ordenha também

pode ser um importante ponto de contaminação, uma vez que, provavelmente, não há a adequada higienização dos tetos dos animais antes do procedimento.

Na pesquisa realizada para identificar o perfil dos consumidores e, as principais motivações para a aquisição dos diferentes tipos de queijos avaliados, a maioria dos entrevistados (55 %) relatou ter o hábito de consumir queijo diariamente, 38 % semanalmente, 7 % raramente ou não consumiam; 61,70 % alegaram comprar os produtos industrializados em mercados, entretanto destes, 47 % afirmaram preferir o sabor dos informais adquiridos em feiras ou de ambulantes. O queijo tipo Minas padrão informal foi considerado o mais saboroso pela maioria dos entrevistados (68 %), o que demonstra que as condições em que é comercializado não é fator condicionante para o consumidor deixar de comprar esse tipo de produto. Apenas três entrevistados declararam conhecer a diferença entre queijos artesanais e informais.

No momento dessa pesquisa, os queijos artesanais comercializados no DF apresentaram o maior custo por Kg (média de R\$ 28,00), sendo o seu comércio restrito a lojas especializadas. Entretanto, verificou-se que eram procedentes de outros estados, e com carimbo de inspeção estadual (SIE) ou de inspeção municipal (SIM), ou seja, sua comercialização no DF é irregular. Os preços médios, por kg, dos queijos industrializados e informais, foram de R\$ 27,00 e R\$ 15,00, respectivamente.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos permitem concluir que o queijo tipo Minas padrão industrializado, comercializado no Distrito Federal, apresenta melhor qualidade higiênica e sanitária, quando comparado com os de fabricação artesanal e os informais. Estes dois últimos apresentaram 100 % das amostras impróprias para o consumo em um ou mais critérios microbiológicos, indicando condições insatisfatórias de produção e/ou comercialização.

A pesquisa realizada com consumidores indicou que a maioria prefere o sabor dos queijos informais comercializados em feiras e desconhece a procedência e o risco associado a esses produtos. Considera-se importante que os órgãos de fiscalização adotem medidas que informem e conscientizem os produtores, os comerciantes e os consumidores de forma a coibir a comercialização de produtos que possam representar riscos à saúde pública.

REFERÊNCIAS

1. Leite BM. Aspectos epidemiológicos e econômicos da certificação de propriedades leiteiras como livres de brucelose e tuberculose bovina [dissertação de mestrado]. Brasília (DF): Universidade de Brasília; 2012.
2. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. Portaria nº 146 de 07 de março de 1996. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, 11 mar.1996. Seção 1,nº48.p.3977-8.
3. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. Resolução No. 7, de 28 de novembro de 2000. Critérios de Funcionamento e de Controle da Produção de Queijarias. Seção 1,nº1.p.78-80.
4. Minas Gerais. Lei nº 20549, de 18 de dezembro de 2012. Dispõe sobre a produção e a comercialização dos queijos Artesanais de Minas Gerais. Diário do Executivo, 19 de dez. de 2012.
5. Resende MFS. Queijo Minas artesanal da Serra da Canastra: influência da altitude e do nível de cadastramento das queijarias nas características físico-químicas e microbiológicas. [dissertação de mestrado]. Belo Horizonte (MG) Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais;2010.
6. Zocche F, Bastos CP, Bassani MT, França RC, Lima AS, Silva WP. Estafilococos coagulase positiva em queijos Minas Frescal e Minas Padrão comercializados em Pelotas, Rio Grande do Sul. Bol CPPA. 2012;30(1):119-24.
7. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. Instrução Normativa nº 62 de 26 de agosto de 2003. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. Diário Oficial [da] União, Brasília, DF, 18 de set.2003. Seção 1,nº181.p.14-22.
8. Wher HM, Frank JF. Standard methods for the examination of dairy products. American Public Health Association, 17th ed., Washington;2004.
9. Silva N, Junqueira VCA, Silveira NFA, Taniwaki MH, Santos RFS, Gomes RAR. Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos, 3^a ed., São Paulo: Livraria Varela; 2007.552p.
10. Kérouanton A, Laetitia P, Groul J, Tam Dao T, Brisabois A. Evaluation of a multiplex PCR assay as an alternative method for *Listeria monocytogenes* serotyping. J Microbiol Meth. 2010;80(2):134-7.
11. Brasil. Resolução RDC nº 12 de 2 de janeiro de 2001 da ANVISA do Ministério da Saúde. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 10 jan. 2001. Seção 1, nº 59, p.45-53.
12. Brant LMF, Fonseca LM, Silva MCC. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo-de-minas artesanal do Serro-MG. Arq Bras Med Vet Zootec. 2007;59(6):1570-4.
13. Franco BDGM, Landgraf M. Microbiologia dos Alimentos. São Paulo: Editora Atheneu,2005.182p.
14. Lima CDLC, Lima LA, Cerqueira MMOP, Ferreira EG, Rosa CA. Bactérias do ácido láctico e leveduras associadas com o queijo-de-minas artesanal produzido na região da Serra do Salitre, Minas Gerais. Arq Bras Med Vet Zootec. 2009;61(1):266-72.

Primeiro relato de *Salmonella enterica* e *Campylobacter* spp. isolados de Garibaldi (*Chrysomus ruficapillus*) e Canário-da-terra (*Sicalis flaveola*) silvestres

First report on the *Salmonella enterica* and *Campylobacter* spp. isolation from wild birds Garibaldi (*Chrysomus ruficapillus*) and Canário-da-terra (*Sicalis flaveola*)

RIALA6/1629

Priscila Alves DIAS^{1*}, Daiane Elisa WILSMANN¹, Júlia Grün HEINEN¹, Carine Dahl CORSINI², Cecília CALABUIG³, Cláudio Dias TIMM¹

*Endereço para correspondência: ¹Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Campus Capão do Leão, prédio 34, CEP 96010-900, Pelotas/RS, Brasil. Tel: (53)3275-7561. E-mail: dias.alvespri@gmail.com

²Departamento de Patologia Animal, Faculdade de Veterinária, UFPel

³Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA)

Recebido: 03.09.2014 - Aceito para publicação: 28.10.2014

RESUMO

Algumas espécies de aves silvestres têm sido identificadas como reservatórios de *Campylobacter* e *Salmonella*, as quais atuam como propagadoras desses micro-organismos; entretanto, não há estudo sobre o papel das aves silvestres na transmissão desses agentes patogênicos no Brasil. O objetivo do presente trabalho foi de verificar a presença desses agentes patogênicos em aves silvestres que se alimentam em lavouras orizícolas. Vinte e três Garibaldis (*Chrysomus ruficapillus*), uma Rolinha-picuí (*Columbina picui*) e um Canário-da-terra (*Sicalis flaveola*) foram capturados com redes de neblina. As amostras de fezes das aves foram coletadas com o uso de zaragatoas e foram processadas para efetuar pesquisa de *Campylobacter* spp. e *Salmonella enterica*. Oito (32 %) amostras de fezes de *C. ruficapillus* foram positivas para *Campylobacter* e seis (24 %) foram positivas para *Salmonella enterica*. Cinco (20 %) amostras coletadas de *C. ruficapillus* e uma de *S. flaveola* foram positivas para *Salmonella*. *C. ruficapillus* e *S. flaveola* mostraram ser reservatórios de *Campylobacter* e *Salmonella* e, conseqüentemente, podem atuar como potenciais disseminadores destes patógenos. Este é o primeiro registro de isolamento de *Campylobacter* e *Salmonella* de amostras de fezes de *C. ruficapillus* e *S. flaveola* silvestres.

Palavras-chave. aves silvestres, orizicultura, *Salmonella*, *Campylobacter*.

ABSTRACT

Some species of wild birds have been identified as reservoirs of *Campylobacter* e *Salmonella*, they may exert as disseminators of these microorganisms. However, in Brazil, there is no study on the role of wild birds in the transmission of these two pathogens. This study aimed at searching the occurrence of *Campylobacter* and *Salmonella* in wild birds that feed in the rice paddies. By using mist nets 23 garibaldis (*Chrysomus ruficapillus*), one rolinha-picuí (*Columbina picui*) and one canário-da-terra (*Sicalis flaveola*) were captured. The birds stool samples were collected using swabs, and they were processed for searching *Campylobacter* spp. and *Salmonella enterica*. Eight (32 %) fecal samples collected from *C. ruficapillus* were *Campylobacter*-positive and six (24 %) were positive to *Salmonella enterica*; five (20 %) samples collected from *C. ruficapillus* and one (4%) from *S. flaveola* were positive to *Salmonella enterica*. The two birds *C. ruficapillus* and *S. flaveola* showed to be reservoirs of *Campylobacter* and *Salmonella*, and they can be potential transmitters of these pathogens. This study is the first report on the isolation of *Campylobacter* and *Salmonella* from wild birds *C. ruficapillus* and *S. flaveola*.

Keywords. wild birds, rice crops, *Salmonella*, *Campylobacter*.

INTRODUÇÃO

Campylobacter e *Salmonella* são importantes patógenos envolvidos em surtos de doenças de origem alimentar, transmitidos principalmente por produtos avícolas. *Campylobacter* é essencialmente apatogênico para as aves, tornando-as potenciais transmissores deste patógeno¹. A maior parte das campilobacterioses humanas provém de alimentos contaminados, porém outras vias de infecções ainda devem ser estudadas. Bactérias do gênero *Salmonella* têm sido isoladas de diversos alimentos e responsabilizadas por surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) em humanos². No Brasil, *Salmonella* foi o principal agente etiológico identificado em 8.663 casos de surtos de DTA notificados ao Ministério da Saúde entre 2000 e 2011³.

As aves silvestres são consideradas reservatórios de *Campylobacter* e *Salmonella*; devido à sua grande mobilidade, podem atuar como propagadoras de micro-organismos patogênicos para aves domésticas utilizadas para consumo humano, através da contaminação direta ou de alimentos e água^{4,5}. Os humanos estão expostos a fezes contaminadas de animais domésticos e silvestres durante atividades ao ar livre, como caminhadas, acampamentos e piqueniques. Também pode ocorrer contaminação indireta via fômites, como sapatos e roupas⁶.

As lavouras de arroz da região sul do Brasil criaram um sistema de áreas úmidas sazonais de estrutura e dinâmica previsíveis, das quais algumas espécies de aves se beneficiaram, explorando os recursos existentes nesses banhados artificiais⁷. Estas aves estão em contato muito próximo com os seres humanos e podem contaminar com suas fezes as aguadas e os silos de armazenamento de grãos de arroz. Além disso, os animais domésticos em contato com fezes de aves contaminadas podem passar a albergar os patógenos e veiculá-los para os humanos.

Em animais de produção o estudo sobre micro-organismos patogênicos é bastante difundido, pois apresentam impacto sobre a economia, porém a microbiota de aves silvestres tem sido pouco estudada, há poucos trabalhos sobre a ocorrência de bactérias de importância em saúde pública, particularmente no Brasil, sendo a maioria realizados com animais oriundos do tráfico e/ou cativo. Considerando a escassez de informações quanto à ocorrência de micro-organismos patogênicos nas aves silvestres, ou seja, de vida livre, que utilizam as lavouras orizícolas para descanso, alimentação e/ou reprodução, o trabalho teve como objetivo verificar a presença de *Samonella* e *Campylobacter* nessas aves.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram capturadas 25 pequenas aves silvestres próximo a lavouras de arroz na região sul do Rio Grande do Sul. Para a captura das aves, foram utilizadas quatro redes de neblina de 12 metros. As aves foram identificadas em gênero e espécie de acordo com o Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos (CBRO)⁸.

Foram coletadas amostras de fezes da região da cloaca com o uso de zaragatoas estéreis, as quais foram mantidas em meio de transporte Cary Blair (Himedia, Mumbai, Índia), acondicionadas em caixas isotérmicas com gelo e imediatamente encaminhadas ao laboratório. Após a coleta, as aves foram soltas.

Para o isolamento de *Campylobacter*, o material das zaragatoas foi diretamente semeado na superfície de ágar Columbia Blood Agar Base (Acumedia, Lansing, Michigan). A incubação foi feita a 42 °C por 48 horas em atmosfera de microaerofilia. O meio foi adicionado de 0,4 % (m/v) de carvão ativado, 5 % (m/v) de suplemento antioxidante FBP (piruvato de sódio, bissulfato de sódio, sulfato de ferro)⁹ e 1 % (m/v) de mistura de antibióticos Campilofar® (vancomicina 2,9 mg; anfotericina B 5,8 mg; cefalotina 4,35 mg; polimixina B 725UI; trimetoprima 1,45 mg; Cefar Diagnóstica LTDA, São Paulo, Brasil) para inibir o crescimento da microbiota acompanhante. A atmosfera de microaerofilia foi gerada através de uma modificação sugerida por Filgueiras e Hofer¹⁰ da técnica de passivação do cobre descrita por Attebery e Finegold¹¹. Adaptada proporcionalmente a uma jarra de 2,5 L, esta técnica consiste em triturar 2,8 g de Sonrisal (Sanofi-Winthrop Farmacêutica), colocar em uma base de placa de Petri e, sobre este, colocar 7,1 g de palha de aço (BombriL) embebida em solução acidulada de sulfato de cobre. Com este preparo, obtêm-se uma concentração final de 85 % N₂, 10 % CO₂ e 5 % O₂.

As colônias típicas, com brilho d'água e espriadas, foram coradas pela técnica de coloração de Gram e observadas em microscópio ótico. Os isolados com morfologia de bastonetes delgados, em forma de S ou de asa de gaivota foram testados quanto à produção das enzimas catalase e oxidase.

Para pesquisa de *Salmonella*, as zaragatoas foram colocadas em tubos de ensaio com 10 mL de Água Peptonada Tamponada (APT, Acumedia). O material foi incubado para pré-enriquecimento e demais procedimentos para pesquisa de *Salmonella*, conforme recomendado por U.S. Food and Drug Administration – FDA¹².

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Rio Grande e a captura das aves silvestres foi autorizada pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio).

RESULTADOS

Foram capturadas 23 aves da espécie *Chrysomus ruficapillus*, uma *Columbina picui* e uma *Sicalis flaveola*. Oito (32 %) amostras de fezes de *C. ruficapillus* foram positivas para *Campylobacter* e seis (24 %) para *Salmonella enterica*; cinco amostras de *C. ruficapillus* e uma de *S. flaveola* foram positivas para *Salmonella*. Duas aves da espécie *C. ruficapillus* albergavam ambos os micro-organismos.

DISCUSSÃO

Gonçalves et al¹³ isolaram *Salmonella* de 1,7 % (2/117) das aves silvestres estudadas. Embora os autores tenham estudado também animais de vida livre, apenas dois papagaios (*Amazona aestiva*), pertencentes à ordem Psittaciforme, provenientes de cativeiro (tráfico animal), foram positivos para a bactéria. Em estudo semelhante, Lopes et al¹⁴ também isolaram *Salmonella* (3/182) em Psittaciformes. Santos et al¹⁵, caracterizando a microbiota cloacal de 51 aves de espécies diferentes da família Cracidae, cativos no RS, não encontraram *Campylobacter* ou *Salmonella*. Em nosso estudo, aves positivas pertenciam à ordem Passeriforme e encontravam-se livres na natureza, sendo este o primeiro registro de isolamento de *Campylobacter* e *Salmonella* de *C. ruficapillus* e *S. flaveola* silvestres.

As aves presentes em arrozais do sul do Rio Grande do Sul compreendem uma parcela da avifauna registrada em áreas úmidas da região. Muitas das espécies mais frequentes e abundantes aparentemente se ajustaram ao cultivo do arroz em função de características idiossincráticas resultantes de adaptações para o forrageio em áreas úmidas rasas e esparsamente vegetadas, explorando eficientemente o cultivo e chegando em alguns casos, como o *C. ruficapillus*, a serem considerados pragas agrícolas⁷. O grande número dessas aves nestes ambientes agrícolas, onde toneladas de alimentos são produzidos e estocados, contando com presença permanente de pessoas envolvidas com a atividade, faz com que o contato direto e indireto entre

aves e humanos seja bastante intenso.

As aves, ao se alimentarem nas lavouras, defecam sobre as plantas e os grãos que serão colhidos e utilizados na alimentação humana. Os silos, locais onde os grãos de arroz são armazenados após a colheita, podem ser contaminados durante o período em que são abertos para serem abastecidos, quando as aves têm acesso ao seu interior, onde buscam os grãos para se alimentarem. Animais domésticos que entrem em contato com as fezes de aves silvestres portadoras de *Campylobacter* e *Salmonella* podem se contaminar e transmitir os patógenos para o homem e outros animais. Há ainda o risco dos trabalhadores rurais entrarem em contato direto com as fezes contaminadas no exercício das suas atividades.

Este estudo demonstrou que *C. ruficapillus* e *S. flaveola* são reservatórios de *Campylobacter* e *Salmonella* e podem, conseqüentemente, ser potenciais disseminadores destes patógenos para o ambiente, animais domésticos, o homem e seus alimentos.

REFERÊNCIAS

1. Germano PML, Germano MIS. Agentes bacterianos de toxinfecções. In: Germano PML, Germano, MIS. Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos. 2ª Edição. São Paulo: Editora Varela; 2003, p. 215-75.
2. Centers for Disease Control and Prevention [CDC]. Vital Signs: Incidence and Trends of Infection with Pathogens Transmitted Commonly Through Food - Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 U.S. Sites, 1996--2010. *Morb Mortal Wkly Rep*. 2011;60(22):749-55.
3. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis. Unidade de Doenças de Veiculação Hídrica e Alimentar, 2011. Vigilância Epidemiológica das Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar - VEDTHA. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/10_passos_para_investigacao_surtos.pdf].
4. Kapperud G, Rosef O. Avian wildlife reservoir of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni*, *Yersinia* spp. and *Salmonella* spp. in Norway. *Appl Environ Microbiol*. 1983;375-80.
5. Rosef O, Kapperud G, Lauwers S, Gondrosen B. Serotyping of *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* and *Campylobacter lariidis* from domestic and wild animals. *Appl Environ Microbiol*. 1985;49(6):1507-10.
6. Tsiodras S, Kelesidis T, Kelesidis I, Bauchinger U, Falagas ME. Human infection associated with wild birds. *J Infect*. 2008;56(2):83-98.
7. Dias RA, Burger MI. A assembléia de aves de áreas úmidas em dois sistemas de cultivo de arroz irrigado no extremo sul do Brasil. *Ararajuba*. 2005;13(1):63-80.
8. Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos [CBRO]. Listas das Aves do Brasil, 10ª ed., 2011. Disponível em: [<http://www.cbro.org.br>].

9. George HA, Hoffmann PS, Krieg NR, Smibert RM. Improved media for growth and aerotolerance of *Campylobacter fetus*. *J Clin Microbiol*. 1978;8:36-41.
10. Filgueiras ALL, Hofer E. Ocorrência de *Campylobacter* termofílico em diferentes pontos de uma estação de tratamento de esgotos na cidade do Rio de Janeiro. *Rev Microbiol*. 1989;20:303-8.
11. Attebery HR, Finegold SM. A miniature anaerobic jar for tissue transport or for cultivation of anaerobes. *Am J Clin Pathol*. 1970;53:383-8.
12. Andrews WH, Jacobson W, Hammack T. *Salmonella*. U.S. Food and Drug Administration, Bacteriological analytical manual, Chapter 5, 2011. Disponível em: [<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070149.htm>].
13. Gonçalves GAM, Almeida SM, Camossi LG, Langoni H, Andreatti Filho RL. Avaliação sorológica de *Parainfluenzavirus* tipo 1, *Salmonella spp.*, *Mycoplasma spp.* e *Toxoplasma gondii* em aves silvestres. *Cienc Anim Bras*. 2013;14(4):473-80.
14. Lopes ES, Cardoso WM, Albuquerque AH, Teixeira RSC, Salles RPR, Bezerra WGA, et al. Isolation of *Salmonella spp.* in captive Psittaciformes from zoos and a commercial establishment of Fortaleza, Brazil. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2014;66(3):965-8.
15. Santos HF, Flôres ML, Lara VM, Silva MS, Battisti L, Lovato LT. Microbiota cloacal aeróbia de cracídeos cativos no Rio Grande do Sul e sua susceptibilidade a antimicrobianos. *Pesq Vet Bras*. 2010;30(12):1077-82.

Avaliação de diferentes alíquotas de enxaguadura para a contagem pelo método direto de *Campylobacter* spp. em carcaças de frango resfriadas

Evaluation of the different rinse volumes for performing the direct technique for *Campylobacter* spp. enumeration in chilled broiler carcasses

RIALA6/1630

Thalyta Marina BENETTI^{1*}, Wanda Moscalewski ABRAHÃO^{2,3}, Isabelle Dangui FERRO⁴, Renata Ernlund Freitas MACEDO⁴, Tereza Cristina Rocha Moreira de OLIVEIRA¹

*Endereço de correspondência: ¹Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, Pr 445 Km 380, Campus Universitário, Caixa Postal 6001, Londrina - PR / Brasil. Tel: +55 41 9919 8113; +55 43 3371 5968. E-mail: benetti.thalyta@gmail.com

²Seção de Microbiologia de Alimentos, Laboratório Central do Estado do Paraná, Curitiba, PR, Brasil.

³Departamento de Farmácia, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil.

⁴Pós-graduação em Ciência Animal, Escola de Ciências Agrárias e Medicina Veterinária, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, São José dos Pinhais, PR, Brasil.

Recebido: 05.09.2013 – Aceito para publicação: 23.12.2014

RESUMO

O método direto de detecção e contagem de *Campylobacter* spp. em carne de frango é de fácil execução, porém os volumes de 100 µL e de 400 µL, preconizados em algumas metodologias, muitas vezes impossibilitam a contagem de colônias pela ocorrência de crescimento confluinte ou de microbiota contaminante. O objetivo do presente estudo foi de avaliar os diferentes volumes de enxaguadura de carne de frango com a finalidade de minimizar a interferência da microbiota contaminante, sem comprometer a sensibilidade do método. Os volumes de enxaguadura de 5, 10, 50, 100 e 400 µL foram testados utilizando-se os meios seletivo diferenciais ágar carvão cefoperazona desoxicolato modificado (mCCDA) e ágar Bolton modificado. A presença de *Campylobacter* spp. foi confirmada por métodos fenotípicos e por PCR. No entanto, a estratégia de utilização de volumes menores do que 100 µL de enxaguadura não melhoraram o isolamento e a contagem de colônias de *Campylobacter*, porque houve diminuição da sensibilidade do ensaio. A provável solução para minimizar a interferência da microbiota contaminante seria desenvolver novos meios seletivos ou incorporá-los aos antimicrobianos já existentes.

Palavras-chave. *Campylobacter* spp., quantificação, método direto, carcaça de frango refrigerada.

ABSTRACT

The direct method for detecting and enumerating *Campylobacter* spp. in chicken meat is easy to perform, but the volumes of 100µL and 400µL, as recommended in some methodologies, are often unable to achieve the colonies counts due to the occurrence of confluent growth or microbial contaminants. This study aimed at evaluating the different volumes for rinsing chicken meats in order to minimize the interference of microbial contaminants, without compromising the sensitivity of direct methodology. Rinse volumes of 5, 10, 50, 100 and 400µL were tested using the modified charcoal cefoperazone deoxycholate agar (mCCDA) and modified Bolton agar. The presence of *Campylobacter* was confirmed by phenotypic methods and PCR assay. However, the strategy of using less than 100 µL of rinse volumes did not improve the isolation and enumeration of *Campylobacter* colonies, because it reduces the sensitivity of the assay. Thus, a possible solution to minimize the interference of microbial contaminants would be in developing new selective media or incorporate them into other existing antimicrobial drugs.

Keywords. *Campylobacter* spp., quantification, direct method, chilled broiler carcasses.

INTRODUÇÃO

A alta prevalência de *Campylobacter* spp. em frangos de corte levou à necessidade de implementação de estratégias para impedir a contaminação da carne de frango por esse patógeno em todos os níveis da cadeia de produção. A detecção e enumeração de *Campylobacter* spp. em carne de frango são essenciais para reduzir os riscos de contaminação¹.

Campylobacter spp. são micro-organismos fastidiosos que requerem temperatura de crescimento e meios de cultivo seletivos específicos, além de atmosfera de incubação em microaerofilia. A quantificação de *Campylobacter* spp. em carne de frango é necessária nas avaliações de risco que exige métodos quantitativos confiáveis. A quantificação deve ser realizada antes do enriquecimento (método direto) com a sementeira da enxaguadura da carne de frango em meios seletivos específicos².

Estudos associaram as dificuldades na contagem de *Campylobacter* em carne de frango à sua baixa competitividade frente à microbiota contaminante e à incapacidade dos agentes antimicrobianos adicionados aos meios seletivos de eliminar esta contaminação. Além da interferência da microbiota contaminante da carne de frango, é comum verificar colônias de *Campylobacter* sobrepostas umas às outras, assim como, espalhadas sobre o Ágar carvão cefoperazona desoxicolato modificado (mCCDA) o que torna difícil a contagem de colônias. O volume da enxaguadura utilizado no método direto pode, portanto, dificultar a contagem desse patógeno^{3,4}.

O objetivo deste trabalho foi avaliar diferentes volumes de enxaguadura de carne de frango com a finalidade de minimizar a interferência da microbiota contaminante no isolamento e contagem de *Campylobacter* spp., sem comprometer a sensibilidade do método direto.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem

Quarenta amostras de carcaças de frango resfriadas produzidas no Estado do Paraná foram coletadas, na sua embalagem original, em diferentes estabelecimentos comerciais da cidade de Curitiba, Paraná. As amostras foram representativas de oito marcas diferentes, com cinco unidades amostrais cada. Após a coleta as amostras foram encaminhadas sob refrigeração

ao laboratório e analisadas ao seu recebimento.

Após a retirada asséptica da embalagem original, dos miúdos, dos pés e da cabeça, as carcaças foram pesadas e colocadas em sacos estéreis. O enxágue das carcaças foi realizado com adição de água peptonada tamponada a 0,1 % (Oxoid, Inglaterra) na proporção de 1 mL para cada grama de peso da carcaça, com fricção de toda a superfície do frango por aproximadamente dois minutos. Alíquotas da enxaguadura foram utilizadas para os testes de detecção e de enumeração de *Campylobacter* spp.

Método Direto de Detecção e Contagem de *Campylobacter* (ISO 10272-2:2006)

Alíquotas de 5, 10, 50, 100, e 400 µL da enxaguadura foram semeadas em duplicata para placas de Ágar mCCDA (CM 739) (Oxoid, Inglaterra), suplementado com cefoperazone (16,0 mg/L) e anfotericina B (5,0 mg/L) (SR 155E) (Oxoid, Inglaterra) e para placas de Ágar Bolton modificado, preparado conforme descrito por Franchin et al⁵. As placas foram incubadas a 37 °C durante 4 horas com posterior incubação a 41,5 ± 0,5 °C por 48 horas em microaerofilia por injeção de atmosfera modificada (5 % O₂, 10 % CO₂, 85 % N₂) (Air Liquide, Brasil) durante 20 segundos.

A confirmação da presença de *Campylobacter* foi realizada, inicialmente, pela observação ao microscópio da morfologia típica em preparações a fresco das colônias isoladas ou confluentes coradas com solução de azul de metileno 1 % (Laborclin, Brasil), e em esfregaços corados pelo Gram (Laborclin, Brasil). Se a morfologia característica foi observada nas preparações microscópicas, as colônias foram reisoladas em Ágar Tripticase de Soja (TSA) suplementado com 5 % de sangue de carneiro desfibrinado (Newprov, Brasil), incubado a 36 ± 1 °C durante 24 e 48 horas sob microaerofilia.

A identificação fenotípica foi realizada com as provas de catalase, oxidase, hidrólise hipurato, indoxil acetato, e avaliação da sensibilidade ao ácido nalidíxico e cefalotina (Oxoid, Inglaterra). Paralelamente, foi realizada a identificação empregando o sistema API Campy® (Biomerieux, França) de acordo com as instruções do fabricante, e confirmadas em nível de gênero por PCR (reação de cadeia polimerase) em Tempo Real.

A quantificação foi realizada considerando o volume da enxaguadura empregado, de acordo com as seguintes equações: Q = n x 2,5, quando utilizado a alíquota de 400 µL, Q = n x 10, Q = n x 20, Q = n x 100, Q = n x 200, para as alíquotas respectivas de 100, 50, 10

Tabela 1. Resultados das contagens de *Campylobacter* pelo método direto utilizando 100 e 400 µL da enxaguadura da carcaça de frango

Amostras Positivas	Método Direto (UFC/g)	
	400µL	100µL
01	>6,3 x 10 ²	> 2,5 x 10 ³
03	> 6,3 x 10 ²	1,4 x 10 ²
12	> 6,3 x 10 ²	1,0 x 10 ²
15	> 6,3 x 10 ²	8,0 x 10 ²
18	> 6,3 x 10 ²	> 2,5 x 10 ³
20	> 6,3 x 10 ²	> 2,5 x 10 ³
23	> 6,3 x 10 ²	1,1 x 10 ³
27	2,5 x 10 ¹	6,0 x 10 ¹
29	2,3 x 10 ²	1,3 x 10 ²
30	> 6,3 x 10 ²	> 2,5 x 10 ³
31	> 6,3 x 10 ²	> 2,5 x 10 ³
34	> 6,3 x 10 ²	> 2,5 x 10 ³

e 5 µL, onde *n* correspondeu ao número total de colônias características presentes na placa com confirma o fenotípica. O resultado foi expresso em UFC/g.

Identifica o molecular do gênero *Campylobacter* por PCR em Tempo Real

A identifica o molecular do gênero *Campylobacter* nos isolados identificados bioquimicamente foi realizada por PCR em Tempo Real, utilizando o método TaqMan. A extra o do DNA foi realizada utilizando o sistema reagente NewGene Prep e NewGene Preamp, disponibilizado pela Simbios Tecnologia (Canoas, Brasil). As amplia es por PCR em Tempo Real foram realizadas em um volume final de aproximadamente 30 µL contendo 28 µL de TaqMan Kit Master Mix *Campylobacter* (Simbios Tecnologia, Brasil) este composto por tampão, dNTP's, água ultrapura, *primers* e sonda, 0,32 µL de Taq polimerase e 2 µL de DNA. As condi es de rea o foram: aquecimento a 95  C durante 3 minutos, 40 repeti es de 95  C por 15 segundos e 60  C por 1 minuto. Em todas as rea es de PCR foram utilizados DNA de *C. jejuni* ATCC 33291, como controle positivo, e água ultrapura e tampão do Kit Master Mix com a enzima Taq polimerase, como controles negativos. As leituras da fluorescência foram realizadas pelo equipamento 7300 Real-Time PCR (Applied Biosystems, EUA) a cada ciclo de amplia o e, posteriormente, analisadas pelo Sequence Detection Software (SDS) v 1.3 (Applied Biosystems, EUA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Algumas discussões nos últimos 10 anos têm sido realizadas sobre a melhor metodologia para detec o e quantifica o de *Campylobacter* a partir de carne de frango. Embora vários métodos tenham sido desenvolvidos nos últimos 30 anos não existe um consenso sobre qual metodologia seria a mais adequada para garantir a sensibilidade e a reprodutibilidade dos resultados⁶⁻⁸.

No presente trabalho, 12 (30,0 %) das 40 amostras de carne de frango analisadas foram positivas para *Campylobacter* spp. pelo método direto, quando volumes de 100 e 400 µL de enxaguadura foram utilizados (Tabela 1). A contagem de colônias, no entanto, foi possível de ser realizada em apenas seis e duas das 12 amostras positivas quando volumes de 100 e 400 µL de enxaguadura foram utilizados, respectivamente. Nas demais amostras as colônias estavam confluentes e a contagem impossível de ser realizada. Quando volumes de 5, 10 e 50 µL foram utilizados, somente foi possível a detec o e contagem de *Campylobacter* em 4, 3 e 1 das 12 amostras positivas, respectivamente.

Todas as colônias com morfologia típica de *Campylobacter* nas prepara es microscópicas foram identificadas como *Campylobacter* pelas provas fenotípicas e pela PCR em Tempo Real e, não houve divergência na identifica o entre as provas fenotípicas e

o sistema API Campy® (Biomérieux).

O método de PCR tem sido utilizado como técnica de detecção do gênero *Campylobacter* em alimentos por superar muitos dos problemas associados com os métodos tradicionais de cultivo. As espécies de *Campylobacter* são frequentemente difíceis de cultivar, e extremamente suscetíveis ao estresse ambiental e as condições ao que o alimento é submetido. A metodologia de PCR têm a maior taxa de detecção entre os métodos de identificação biológica, e sob condições otimizadas mostra também alta especificidade⁶.

Embora o método direto ISO 10272-2 preconize a utilização de 100 µL de enxaguadura para o isolamento e contagem de *Campylobacter* spp. em alimentos, esse volume impossibilitou a contagem devido a confluência das colônias ou crescimento muito grande de microbiota contaminante. Assim sendo, a solução para minimizar ou solucionar a interferência da microbiota contaminante ou a confluência de colônias de *Campylobacter* não seria a diminuição do volume da enxaguadura, mas provavelmente desenvolver novos meios seletivos ou incorporar aos já existentes outros antimicrobianos.

Franchin et al⁹ propuseram a utilização de volumes de 400 µL de enxaguadura porque, segundo a experiência desses autores, muitas amostras de carne de frango apresentam contagem baixa de *Campylobacter*, e para que o método tenha sensibilidade suficiente volumes de 400 µL precisam ser utilizados. No presente estudo não foi encontrado amostras de carne de frango com contagens baixas detectadas somente após a utilização de volumes de 400 µL.

A dificuldade na contagem de *Campylobacter* spp. em carne de frango tem sido relacionada à sua baixa competitividade frente a microbiota contaminante e à incapacidade dos agentes antimicrobianos utilizados nos meios seletivos de inibir essa microbiota. A estratégia de utilização de volumes menores que 100 µL de enxaguadura, testada no presente trabalho, facilitou a contagem porque houve menor interferência da microbiota contaminante no desenvolvimento de *Campylobacter*, porém a diminuição do volume também diminuiu consideravelmente a sensibilidade do método direto.

No presente trabalho, o ágar Bolton modificado, indicado por Franchin et al⁹, foi utilizado em paralelo ao ágar mCCDA, preconizado na metodologia ISO 10272-2. A cor escura do mCCDA, a coloração acinzentada das colônias de *Campylobacter* e as bordas das colônias

pouco definidas nesse meio dificultaram a visualização e a distinção entre colônias típicas e atípicas. Esse fato exigiu a necessidade de realizar preparações microscópicas das colônias de todas as amostras analisadas. Essa dificuldade já havia sido previamente descrita por Habib et al¹⁰ e Franchin et al⁸. O Ágar Bolton modificado foi escolhido para ser utilizado em paralelo ao mCCDA porque as colônias típicas de *Campylobacter* apresentaram bordas bem definidas de coloração marrom sob um fundo claro devido à redução do corante 2,3,5-trifeniltetrazólio, o que facilitou a triagem de colônias típicas de *Campylobacter*. No presente trabalho, embora colônias típicas de *Campylobacter* tenham sido mais facilmente triadas no meio de Ágar Bolton, foi necessário também realizar preparações microscópicas das colônias para confirmação morfológica de *Campylobacter* em todas as amostras analisadas.

O Ágar Bolton não mostrou frequência maior de isolamento, apesar de permitir uma melhor visualização das colônias de *Campylobacter*. Sete das doze amostras positivas foram identificadas exclusivamente pelo Ágar mCCDA e três pelo Ágar Bolton. A presença de *Campylobacter* foi confirmada em duas amostras em ambos os meios de cultura. Assim sendo, a necessidade de se utilizar no mínimo dois diferentes meios seletivos para o isolamento de *Campylobacter* foi confirmada.

CONCLUSÃO

O método direto de detecção e contagem de *Campylobacter* em carne de frango, empregado na rotina dos laboratórios de análise, é de fácil execução, porém precisa de adequações. A utilização de volumes menores de 100 µL de enxaguadura não pode ser utilizada porque diminui consideravelmente a sensibilidade do método.

AGRADECIMENTOS

Ao Laboratório Central do Estado do Paraná (LACEN), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Universidade Estadual de Londrina (UEL) pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de doutorado concedida à Thalyta Marina Benetti.

REFERÊNCIAS

1. Ahmed R, León-Velarde CG, Odumeru JA. Evaluation of novel agars for the enumeration of *Campylobacter* spp. in poultry retail samples. *J Microbiol Methods*.2012;88:304-10. Disponível em: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22226753].
2. Hutchison ML, Walters LD, Allen VM, Mead GC, Howell M. Measurement of *Campylobacter* numbers on carcasses in British poultry slaughterhouses. *J Food Prot*.2006;69:421-4. Disponível em: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16496586].
3. Habib I, Sampers I, Uyttendaele M, Berkvens D, Zutter LD. Performance characteristics and estimation of measurement uncertainty of three plating procedures for *Campylobacter* enumeration in chicken meat. *Food Microbiol*.2008;25:65-74. Disponível em: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17993378].
4. Medeiros VM, Bricio SML, Filgueiras ALL, Clementino MCM. Use of Bolton broth for selective enrichment and comparative analysis of its performance with direct plating methodology for isolating *Campylobacter* spp. from chilled chicken carcasses. *Rev Inst Adolfo Lutz*.2012;71:456-61. Disponível em: [http://revistas.bvs-vet.org.br/rialutz/article/view/5255/4519].
5. Franchin PR, Aidoo KE, Batista CRV. Sources of poultry meat contamination with thermophilic *Campylobacter* before slaughter. *Braz J Microbiol*.2005;36:157-62. Disponível em: [http://www.scielo.br/pdf/bjm/v36n2/arq11.pdf].
6. Oliveira TCRM, Barbut S, Griffiths MW. A robotic DNA purification protocol and real-time PCR for the detection of *Campylobacter jejuni* in foods. *J Food Prot*.2005;68:2131-5. Disponível em: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16245718].
7. ISO. International Organization for Standardization - ISO 10272 Microbiology of Food and Animal Feeding Stuff - Horizontal Method for Detection and Enumeration of *Campylobacter* spp. - Part 2: Enumeration Method. ISO, Geneva, Switzerland, 2006.
8. Richardson LJ, Cox NA, Bailey JS, Berrang ME, Cox, JM, Buhr RJ, et al. Evaluation of TECRA broth, Bolton broth, and Direct Plating for recovery of *Campylobacter* spp. from Broiler Carcass Rinsates from Commercial Processing Plants. *J Food Prot*.2009;72:972-77. Disponível em: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19517723].
9. Franchin PR, Ogliari PJ, Batista CRV. Frequency of thermophilic *Campylobacter* in broiler chickens during in industrial processing in a Southern Brazil slaughterhouse. *Br Poult Sci*.2007;48:127-32. Disponível em: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17453803].
10. Habib I, Uyttendaele M, De Zutter L. Evaluation of ISO 10272:2006 standard versus alternative enrichment and plating combinations for enumeration and detection of *Campylobacter* in chicken meat. *Food Microbiol*.2011;28:1117-23. Disponível em: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21645809].

COLABORADORES

Agradecimentos aos relatores

O Corpo Editorial agradece a todos os relatores abaixo relacionados que, com seu trabalho voluntário e anônimo ao longo de 2014 contribuíram para o bom andamento das atividades e elevação do nível dos artigos publicados pela Revista.

- **Adelaide Del Pino Beleia** Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Tecnologia de Alimentos. Londrina, PR
- **Adriana Aparecida Buzzo Almodovar** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Medicamentos, Cosméticos e Saneantes, Núcleo de Ensaio Biológicos e de Segurança. São Paulo, SP
- **Adriana Palma de Almeida** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Contaminantes, Núcleo de Contaminantes Orgânicos. São Paulo, SP
- **Adriano Gomes da Cruz** Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Departamento de Tecnologia de Alimentos. Campinas, SP
- **Alceu Afonso Jordão Junior** Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Departamento de Clínica Médica. Ribeirão Preto, SP
- **Alcina Maria Liserre** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Alimentos, Núcleo de Microbiologia. São Paulo, SP
- **Alexandre Tourino Mendonça** Universidade Vale do Rio Verde. Três Corações, MG
- **Ana Maria Centola Vidal Martins** Centro Universitário de Rio Preto. São José do Rio Preto, SP
- **Ana Maria Ramalho de Paula** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Alimentos, Núcleo de Microbiologia. São Paulo, SP
- **Ana Paula Guedes Frazzon** Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Biociências, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia. Porto Alegre, RS
- **Anderlise Borsoi** Universidade Tuiuti do Paraná. Curitiba, PR
- **Anderson Junger Teodoro** Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Química, Departamento de Tecnologia de Alimentos. Rio de Janeiro, RJ
- **Andrea Troller Pinto** Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva. Porto Alegre, RS
- **Angela Correa de Freitas Almeida** Universidade Estadual do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia. Rio de Janeiro, RJ
- **Aurélia Santos Faraoni** Universidade Federal de Sergipe. São Cristóvão, SE
- **Berta Maria Heinzman** Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Farmácia Industrial. Santa Maria, RS
- **Cecilia Cristina Marques dos Santos** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Laboratórios Regionais, Núcleo de Ciências Químicas e Bromatológicas. São José do Rio Preto, SP
- **Christiane Maciel Vasconcellos Barros De Rensis** Universidade Norte do Paraná. Londrina, PR
- **Christiane Soares Pereira** Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Departamento de Bacteriologia. Rio de Janeiro, RJ
- **Claudia Madalena Cabrera Mori** Universidade de São Paulo, Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. São Paulo, SP
- **Cristiane Gattini Sbampato** Universidade Vale do Rio Verde. Três Corações, MG
- **Daniele Leal** Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba, SP
- **Demônio Tadeu Lima Ferreira** Faculdade Assis Gurgacz. Cascavel, PR

- **Dennis Armando Bertolini** Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Análises Clínicas. Maringá, PR
- **Derlene Attili de Angelis** Universidade Estadual de Campinas, Coleção Brasileira de Micro-organismo de Ambiente e Indústria. Campinas, SP
- **Djalva Maria da Nobrega Santana** Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro,
- **Edeltrudes Oliveira Lima** Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Ciências Farmacêuticas. João Pessoa, PB
- **Edna Froeder Arcuri** Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite. Juiz de Fora, MG
- **Elayse Maria Hachich** Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. São Paulo, SP
- **Eliana Badiale Furlong** Universidade Federal do Rio Grande, Escola de Química e Alimentos, Laboratório de Ciência de Alimentos. Rio Grande, RS
- **Elsa Helena Walter de Santana** Universidade Norte do Paraná. Londrina, PR
- **Erika Grasiela Marques de Menezes Barbosa** Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina. Ribeirão Preto, SP
- **Erika Madeira Moreira da Silva** Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde. Vitória, ES
- **Ester Yoshie Yosino da Silva** Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnológicos. Brasília, DF
- **Felipe Diehl** Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, RS
- **Fernanda Fidelis Gonsales** Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. São Paulo, SP
- **Fernando Henrique Andrade Nogueira** Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Farmácia. Natal, RN
- **Fillipe de Oliveira Pereira** Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Educação e Saúde, Unidade Acadêmica de Saúde. Cuité, PB
- **Gabriela de Godoy Cravo Arduino** Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo. Avaré, SP
- **Geraldo Marcio da Costa** Universidade Federal de Lavras, Departamento de Medicina Veterinária, Lavras, MG
- **Gerson Antônio Pianetti** Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Departamento de Produtos Farmacêuticos, Belo Horizonte, MG
- **Gina Maria Bueno Quirino Cardozo** Instituto de Tecnologia de Alimentos. Campinas, SP
- **Gisely Cristiny Lopes** Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Farmácia. Maringá, PR
- **Gladis Aver Ribeiro** Universidade Federal de Pelotas, Instituto de Biologia, Departamento de Microbiologia e Parasitologia. Capão do Leão, RS
- **Graciele da Silva Campelo Borges** Universidade Federal da Paraíba, Centro de Tecnologia. João Pessoa, PB
- **Heloisa Werneck de Macedo** Universidade Federal Fluminense, Faculdade de Medicina, Departamento de Patologia. Niterói, RJ
- **Herminia Yohko Kanamura** Universidade Federal de Alfenas, Departamento Patologia e Parasitologia. Alfenas, MG
- **Isabella Fernandes Delgado** Fundação Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, RJ
- **Ismael Rockenbach de Miranda** Universidade Federal da Paraíba, Centro de Tecnologia e Desenvolvimento Regional, Departamento de Tecnologia de Alimentos. João Pessoa, PB
- **Ivo Mottin Demiate** Universidade Estadual de Ponta Grossa, Setor de Ciências Agrárias e de Tecnologia, Departamento de Engenharia de Alimentos, Ponta Grossa, PR
- **Jacinto da Costa Silva Neto** Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Histologia e Embriologia. Recife, PE

- **Jane Martha Graton Mikcha** Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Análises Clínicas. Maringá, PR
- **Joelma Pereira** Universidade Federal de Lavras, Departamento de Ciência dos Alimentos, Laboratório de Grãos, Raízes e Tubérculos. Lavras, MG
- **Joice Sifuentes dos Santos** Universidade Norte do Paraná. Londrina, PR
- **Jorge Luiz Fortuna** Universidade do Estado da Bahia, Departamento de Educação, Laboratório de Microbiologia. Teixeira de Freitas, BA
- **José Ricardo Gonçalves** Instituto de Tecnologia de Alimentos, Centro de Tecnologia de Carnes. Campinas, SP
- **José Ricardo Jensen** Instituto Butantan, Centro de Pesquisa e Formação em Imunologia, Laboratório de Imunogenética. São Paulo, SP
- **José Torquato de Queiroz Tavares** Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas. Cruz das Almas, BA
- **Juliana Mariotti Guerra** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Patologia, Núcleo de Patologia Quantitativa. São Paulo, SP
- **Karina Correia da Silveira** Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Nutrição. Recife, PE
- **Karla Silva Ferreira** Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Laboratório de Tecnologia de Alimentos. Campos dos Goytacazes, RJ
- **Lúcia Maria Lopes de Almeida Guedes Diefenbach** Laboratório Central de Saúde Pública, Divisão de Análise de Produtos, Seção de Microscopia e Triagem. Porto Alegre, RS
- **Lúcia Rosa de Carvalho** Universidade Federal Fluminense, Centro de Ciências Médicas, Faculdade de Nutrição. Niterói, RJ
- **Luciana Maria Ramires Esper** Universidade Federal Fluminense, Faculdade de Farmácia, Departamento de Bromatologia, Laboratório de Controle Microbiológico de Alimentos. Niterói, RJ
- **Luciana Pereira Lobato** Universidade Federal de Sergipe. Lagarto, SE
- **Lucilene Granuzzio Camossi** Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Piracicaba, SP
- **Luísa Patrícia Fogaroli de Carvalho** Universidade José do Rosário Vellano, Faculdade de Ciências Médicas, Hospital Universitário Alzira Velano. Alfenas, MG
- **Maisa Ribeiro Pereira Lima Brigagão** Universidade Federal de Alfenas, Instituto de Ciências Exatas. Alfenas, MG
- **Marcelo de Oliveira Lima** Instituto Evandro Chagas. Ananindeua, PA
- **Márcia de Aguiar Ferreira** Universidade de Brasília, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária. Brasília, DF
- **Marcia Regina Beux** Universidade Federal do Paraná, Centro Politécnico, Departamento de Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas. Curitiba, PR
- **Marcos dos Santos Lima** Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sertão Pernambucano. Petrolina, PE
- **Maria Auxiliadora de Brito Rodas** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Alimentos, Núcleo de Química, Física e Sensorial. São Paulo, SP
- **Maria da P. Spinola Miranda** Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Farmácia, Departamento de Análises Bromatológicas. Salvador, BA
- **Maria da Penha Piccolo** Universidade Federal do Espírito Santo, Centro Universitário Norte do Espírito Santo, Departamento de Ciências da Saúde. São Mateus, ES
- **Maria de Fátima Henriques Carvalho** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Contaminantes, Núcleo de Contaminantes Inorgânicos. São Paulo, SP
- **Maria Helena Martini** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Laboratórios Regionais, Núcleo de Ciências Químicas e Bromatológicas. Campinas, SP

- **Maria Luiza Bazzo** Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Análises Clínicas, Laboratório de Biologia Molecular e Micobactérias. Florianópolis, SC
- **Maria Regina Branquinho** Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Departamento de Microbiologia, Setor de Biologia Molecular. Rio de Janeiro, RJ
- **Maria Regina Reis Amendoeira** Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Toxoplasmose. Rio de Janeiro, RJ
- **Maria Walderez Szeszs** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Parasitologia e Micologia, Núcleo de Micologia. São Paulo, SP
- **Maricê Nogueira de Oliveira** Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas. São Paulo, SP
- **Marilena dos Anjos Martins** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Parasitologia e Micologia, Núcleo de Micologia. São Paulo, SP
- **Marilene Fernandes de Almeida** Prefeitura do Município de São Paulo, Centro de Controle de Zoonoses, Laboratório de Zoonoses e Doenças Transmitidas por Vetores. São Paulo, SP
- **Mário Tavares** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Laboratórios Regionais, Núcleo de Ciências Químicas e Bromatológicas. Santos, SP
- **Marta Suely Madruga** Universidade Federal da Paraíba, Centro de Tecnologia, Departamento de Tecnologia Química e Alimentos. João Pessoa, PB
- **Martha Zavariz de Miranda** Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisa de Trigo. Passo Fundo, RS
- **Mirthes Ueda** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Imunologia. São Paulo, SP
- **Myrna Sabino** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Contaminantes, Núcleo de Contaminantes Orgânicos. São Paulo, SP
- **Nádia Regina Rodrigues** Universidade de Campinas, Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas, Divisão de Análise de Resíduos. Campinas, SP
- **Paula Dias Bevilacqua** Universidade Federal de Viçosa, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Departamento de Veterinária. Viçosa, MG
- **Paulo Afonso Lopes** Instituto Militar de Engenharia. Rio de Janeiro, RJ
- **Pedro Ysmael Cornejo Mujica** Universidade Federal do Tocantins, Laboratório de Tecnologia de Carnes, Pescados e Derivados. Palma, TO
- **Raquel Gouvêa** Universidade Federal Fluminense, Centro de Ciências Médicas, Departamento de Tecnologia de Alimentos. Niterói, RJ
- **Rejane Weissheimer Abreu** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Alimentos, Núcleo de Química, Física e Sensorial. São Paulo, SP
- **Renata Pereira Lopes Moreira** Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Química. Viçosa, MG
- **Rita Goreti Amaral** Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO
- **Rodrigo Caciano de Sena** Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia, Diretoria de Metrologia Científica e Industrial, Divisão de Metrologia Química, Laboratório de Análise Inorgânica. Duque de Caxias, RJ
- **Rosana Marina Peralta** Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Bioquímica. Maringá, PR
- **Rupércio Alvares Cañado** Greensky Consultoria e Assessoria Alimentícia. Curitiba, PR
- **Ruth Estela Gravato Rowlands** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Alimentos, Núcleo de Microbiologia. São Paulo, SP
- **Simone Cristina Marques** Universidade Federal de Lavras, Departamento de Biologia. Lavras, MG
- **Taciana Fernandes Souza Barbosa Coelho** Instituto Evandro Chagas. Ananindeua, PA

- **Tatiana Pacheco Nunes** Universidade Federal de Sergipe, Departamento de Tecnologia de Alimentos. São Cristovão, SE
- **Terezinha de Jesus Andreoli Pinto** Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Farmácia. São Paulo, SP
- **Valéria Adriana Pereira Martins** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Medicamentos, Cosméticos e Saneantes, Núcleo de Ensaio Físicos e Químicos em Medicamentos. São Paulo, SP
- **Vera Lucia Pereira Chioccola** Instituto Adolfo Lutz, Centro de Parasitologia e Micologia. São Paulo, SP
- **Zelyta Pinheiro de Faro** Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória. Vitória de Santo Antão, PE

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

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

1. CATEGORIA DE ARTIGOS

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

Informações Complementares:

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

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

Informações complementares:

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

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

Informações complementares:

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

1.4 NOTAS CIENTÍFICAS: São relatos sucintos destinados à rápida divulgação de eventos relevantes de uma pesquisa experimental que justifique a publicação de resultados parciais.

Informações complementares:

- Devem ter até 06 laudas impressas, excluindo resumos, tabelas, figuras e referências.
- As tabelas, figuras, gráficos e fotos, limitadas a 02 no conjunto, devem incluir apenas os dados imprescindíveis. As figuras não devem repetir dados já descritos em tabelas. Devem ser apresentadas em arquivo separado.
- As referências bibliográficas, limitadas a 10, devem incluir apenas aquelas estritamente pertinentes e relevantes à problemática abordada. Deve-se evitar a inclusão de número excessivo de referências numa mesma citação. Citações de documentos não publicados e não indexados na literatura científica (teses, relatórios e outros) devem ser evitadas.
- Os resumos em português e em inglês (*abstract*) devem ter até 200 palavras e devem ter entre 3 a 6 palavras-chave (*keywords*).
- Sua apresentação deve acompanhar as mesmas normas exigidas para artigos originais, porém na forma de texto único.

1.5 RELATOS DE CASO: São textos que contemplam principalmente a área médica, em que o resultado é anterior ao interesse de sua divulgação ou a ocorrência dos resultados não é planejada.

Informações complementares:

- Devem ter até 03 laudas impressas, excluindo resumos, tabelas, figuras e referências.
- As tabelas, figuras, gráficos e fotos, limitadas a 02 no conjunto, devem incluir apenas os dados imprescindíveis. As figuras não devem repetir dados já descritos em tabelas. Devem ser apresentadas em arquivo separado.
- As referências bibliográficas, limitadas a 10, devem incluir apenas aquelas estritamente pertinentes e relevantes à problemática abordada. Deve-se evitar a inclusão de número excessivo de referências numa mesma citação. Citações de documentos não publicados e não indexados na literatura científica (teses, relatórios e outros) devem ser evitadas.
- Os resumos em português e em inglês (*abstract*) devem ter até 200 palavras e devem ter entre 3 a 6 palavras-chave (*keywords*).
- Devem apresentar Introdução, Relato de caso, Discussão e Conclusão, na forma de texto único.

1.6 RESUMOS DE TESES E DISSERTAÇÕES: São aceitos resumos de teses e dissertações até um ano após a defesa.

Informações complementares:

- Devem ter até 400 palavras e devem ter entre 3 a 6 palavras-chave (*keywords*).
- Sua apresentação deve conter o nome do autor e do orientador, título do trabalho em português e em inglês, nome da instituição em que foi apresentado, área de concentração e ano da defesa.

2. APRESENTAÇÃO DO MANUSCRITO: Os textos devem ser redigidos em processador de texto Word for Windows 2003 ou compatível, no formato A4, espaço duplo, fonte Times New Roman, tamanho 12. Devem ser evitados arquivos compactados. A estrutura do manuscrito deve estar em conformidade com as normas do Sistema Vancouver – Título; Autores e Instituições; Resumo e *Abstract*; Introdução; Material e Métodos; Resultados; Discussão; Conclusão; Agradecimentos; Referências; Tabelas; Figuras e Fotografias.

2.1 PÁGINA DE IDENTIFICAÇÃO: Deve constar:

Título em português e em inglês: O título deve ser conciso, completo e conter informações. Se o manuscrito for submetido em inglês, deve ser fornecido um título em português.

Autores: De acordo com o *International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE)*, são considerados autores aqueles que contribuíram substancialmente para a concepção e planejamento, ou análise e interpretação dos dados; contribuíram significativamente na elaboração do rascunho ou na revisão crítica do conteúdo e participaram da aprovação da versão final do mesmo. Somente a aquisição de financiamento, a coleta de dados ou supervisão geral de grupos de pesquisa não justificam autoria – maiores esclarecimentos sobre autoria podem ser encontrados na página do ICMJE (<http://www.icjme.org>). Deve constar o nome completo, sem abreviações e com último sobrenome em caixa alta (exemplo: Ana Maria Camargo da SILVA) e o e-mail do autor responsável. O autor responsável para troca de correspondência deve estar assinalado com asterisco (*) e apresentar também o endereço completo.

Afiliação: Deve ser indicada a instituição à qual cada autor está afiliado, na seguinte ordem de hierarquias institucionais de afiliação: laboratório, setor, seção, serviço, divisão, departamento, instituto, faculdade e universidade.

Financiamento da pesquisa: Se a pesquisa foi subvencionada, indicar o tipo de auxílio, o nome da agência financiadora e o respectivo número do processo.

Apresentação prévia: Quando baseado em tese ou dissertação, indicar o nome do autor, título, ano, nome do programa de pós-graduação e instituição onde foi apresentada. Quando apresentado em evento científico, indicar o nome do evento, local e ano da realização.

2.2 PREPARO DO MANUSCRITO:

Resumo/Abstract: Todos os textos deverão ter resumos em português e inglês, dimensionados para ter até 200 palavras. Como regra geral, o resumo deve incluir objetivos do estudo, principais procedimentos metodológicos, principais resultados e conclusões.

Palavras-chave/keywords: Devem ser indicados entre 3 a 6 descritores do conteúdo, extraídos do vocabulário Descritores em Ciências da Saúde (DeCS) da Bireme (disponível em <http://www.bireme.br>) nos idiomas português e inglês. Em inglês, com base no Medical Subject Headings (MeSH).

Caso não sejam encontrados descritores adequados para a temática do manuscrito, poderão ser indicados termos não existentes nos conjuntos citados.

Estrutura do texto:

A) Introdução: Deve ser breve, relatando o contexto e a justificativa do estudo, apoiados em referências pertinentes ao objetivo do manuscrito, sintetizando a importância e destacando as lacunas do conhecimento abordadas. Não deve incluir dados ou conclusões do estudo em referência

B) Material e Métodos: Os procedimentos adotados devem ser descritos claramente, bem como as variáveis analisadas, com a respectiva definição, quando necessária, e a hipótese a ser testada. Devem ser descritas a população e a amostra, instrumentos de medida, com a apresentação, se possível, de medidas de validade e conter informações sobre a coleta e processamento de dados. Deve ser incluída a devida referência para os métodos e técnicas empregados, inclusive os métodos estatísticos; métodos novos ou substancialmente modificados devem ser descritos, justificando as razões para seu uso e mencionando suas limitações. Os critérios éticos da pesquisa devem ser respeitados; os autores devem explicitar que a pesquisa foi conduzida dentro de padrões éticos e foi aprovada por comitê de ética, indicando o nome do comitê de ética, número e data do registro.

C) Resultados: Devem ser apresentados em uma sequência lógica, iniciando-se com a descrição dos dados mais importantes. Tabelas e figuras devem ser restritas àquelas necessárias para argumentação e a descrição dos dados no texto deve ser restrita aos mais importantes. Os gráficos devem ser utilizados para destacar os resultados mais relevantes e resumir relações complexas. Dados em gráficos e tabelas não devem ser duplicados nem repetidos no texto. Os resultados numéricos devem especificar os métodos estatísticos utilizados na análise.

D) Discussão: A partir dos dados obtidos e resultados alcançados, os novos e importantes aspectos observados devem ser interpretados à luz da literatura científica e das teorias existentes no campo. Argumentos e provas baseadas em comunicação de caráter pessoal ou divulgadas em documentos restritos não podem servir de apoio às argumentações do autor. Tanto as limitações do trabalho quanto suas implicações para futuras pesquisas devem ser esclarecidas. Incluir somente hipóteses e generalizações baseadas nos dados do trabalho. As conclusões podem finalizar esta parte, retomando o objetivo do trabalho ou serem apresentadas em item separado.

E) Agradecimentos: Este item é opcional e pode ser utilizado para mencionar os nomes de pessoas que, embora não preencham os requisitos de autoria, prestaram colaboração ao trabalho. Será preciso explicitar o motivo do agradecimento, por exemplo, consultoria científica, revisão crítica do manuscrito, coleta de dados etc. Deve haver permissão expressa dos nomeados e o autor responsável deve anexar a Declaração de Responsabilidade pelos Agradecimentos. Também pode constar desta parte apoio logístico de instituições.

2.3 CITAÇÃO NO TEXTO: A exatidão das referências é de responsabilidade dos autores. Devem ser indicadas pelo seu número na listagem, na forma de expoente, sem uso de parênteses, colchetes e similares. Nos casos em que há citação do nome do autor, o número da referência deve ser colocado a seguir do nome do autor. Trabalhos com dois autores devem fazer referência aos dois autores ligados por “e”. Nos outros casos apresentar apenas o primeiro autor (seguido de et al, em caso de autoria múltipla).

Exemplos: Nos Estados Unidos e Canadá, a obrigatoriedade da declaração dos nutrientes no rótulo do alimento é mais antiga e foram desenvolvidos métodos hidrolíticos, como o AOAC 996.061, de extração e determinação da GT por cálculo a partir dos AG obtidos por cromatografia gasosa com detector de ionização em chama (GC/DIC)2,3.

Segundo Chang et al³¹, o aumento do tamanho das partículas resulta numa redução da área de superfície conferindo uma melhora na retenção e estabilidade das mesmas.

2.4 REFERÊNCIAS: Listadas ao final do texto, devem respeitar a quantidade definida para cada categoria de artigos aceitos pela RIAL. As referências devem ser normalizadas de acordo com o estilo *Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Writing and Editing for Biomedical Publication*, numeradas consecutivamente na ordem em que foram mencionadas a primeira vez no texto.

Os títulos de periódicos devem ser referidos de forma abreviada, de acordo com o *Medline*, disponível no endereço <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=journals>. Para consultar periódicos nacionais e latino-americanos: <http://portal.revistas.bvs.br/main.php?home=true&lang=pt>.

No caso de publicações com até seis autores, citam-se todos; acima de seis, citam-se os seis primeiros, seguidos da expressão latina “et al”. Referências de um mesmo autor devem ser organizadas em ordem cronológica crescente.

Exemplos:**Artigos de periódicos:**

Aued-Pimentel S, Zenebon O. Lipídios totais e ácidos graxos na informação nutricional do rótulo dos alimentos embalados: aspectos sobre legislação e quantificação. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2009;68(2):121-6.

Weihrauch JL, Posati LP, Anderson BA, Exler J. Lipid conversion factors for calculating fatty acids contents of foods. *J Am Oil Chem Soc*. 1977;54:36-40.

Hennington EA. Acolhimento como prática interdisciplinar num programa de extensão. *Cad Saude Coletiva [Internet]*. 2005;21(1):256-65. Disponível em: [<http://www.scielo.br/pdf/csp/v21n1/28.pdf>].

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=&doc>].

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 electrophysiology 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.icmje.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

