

REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ

ISSN 0073-9855
RIALA6



GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE

Volume 74 número 1, 2015



Instituto Adolfo Lutz



SECRETARIA
DA SAÚDE



ISSN 0073-9855





Secretaria de Estado da Saúde
Coordenadoria de Controle de Doenças
Instituto Adolfo Lutz

REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ

Volume 74 número 1, 2015
Janeiro – Março 2015

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

Diretor Geral do Instituto Adolfo Lutz

Hélio Hehl Caiaffa Filho

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
Lilian Nunes Schiavon
Sylia Rehder

Editor Chefe

Pedro Luiz Silva Pinto

Editor Adjunto

Adriana Bugno

Núcleo de Acervo

Rocely Aparecida Bueno Moita

Diagramação

Claudia Cristiane de Araujo

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
2015, 74(1)

ISSN 0073-9855 CDD₁₈ 614.07205

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

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

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

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

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

Rev Inst Adolfo Lutz. 2015; 74 (1)

■ ARTIGO DE REVISÃO/REVIEW ARTICLE

1631 **Bisfenol A: o uso em embalagens para alimentos, exposição e toxicidade – Uma Revisão**

Bisphenol A: Review on its use in the food packaging, exposure and toxicity

Paulo Eduardo Masselli BERNARDO, Sandra Aparecida NAVAS, Lúcia Tieco Fukushima MURATA, Maria Rosa da Silva de ALCÂNTARA..... 1-11

■ ARTIGO ORIGINAL/ORIGINAL ARTICLE

1632 **Teores de sódio em leites industrializados consumidos no Brasil**

Sodium contents in the processed milk consumed in Brazil

Márcia Liane BUZZO, Maria de Fátima Henriques CARVALHO, Edna Emy Kumagai ARAKAKI, Richard MATSUZAKI, Camila Cardoso de OLIVEIRA, Carmen Silvia KIRA.....12-20

1633 **Deteção de fraude em amostras comerciais de queijo bubalino por adição de leite bovino por meio da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) multiplex**

Detection of fraud of cow milk addition into the commercially available buffalo cheese samples by multiplex Polymerase Chain Reaction (PCR)

Cleyzer Lopes SILVA, Gustavo Aguiar SALES, José Gatinho dos SANTOS NETO, Jacqueline da Silva e SILVA, Ana Paula de Souza Stori DE LARA, Suely Cristina Gomes de LIMA, Fábio Pereira Leivas LEITE, Emília do Socorro Conceição de Lima NUNES, Carla Cristina Guimarães de MORAES, Talita Bandeira ROOS, Carina Martins de MORAES.....21-29

1634 **Influência do branqueamento, pasteurização e congelamento nas características físico-químicas, nos carotenoides e no valor de vitamina A de polpa de araticum (*Annona crassiflora* Mart.)**

Influence of the bleaching, pasteurization and freezing on the physico-chemical characteristics, on carotenoids and vitamin A value of "araticum" (*Annona crassiflora* Mart.) pulp

Leticia Linhares SILVA, Leandro de Moraes CARDOSO, Helena Maria PINHEIRO-SANT'ANA.....30-38

1635 **Qualidade nutricional e aceitabilidade de barras de cereais formuladas com casca e semente de goiaba**

Nutritional quality and acceptability of the guava peel and seed-added cereal bars

Bruna Sampaio ROBERTO, Leila Picolli da SILVA, Fernanda Teixeira MACAGNAN, Marília BIZZANI, Ana Betine Beutinger BENDER.....39-48

1636	Bebidas mistas de extratos de arroz com maracujá e mamão	
	Mixed drinks prepared with extracts of rice with passion fruit and papaya	
	Edson Pablo SILVA, Fernanda Salamoni BECKER, Flávio Alves da SILVA, Manoel Soares SOARES JÚNIOR, Márcio CALIARI, Clarissa DAMIANI	49-56
1637	Comparação de testes laboratoriais para o diagnóstico de infecção por vírus linfotrópicos de células T humanas do tipo 1 (HTLV-1) e tipo 2 (HTLV-2) em pacientes infectados por HIV-1	
	Comparison of laboratorial tests for the diagnosis of human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) and type 2 (HTLV-2) in HIV-1 infected patients	
	Karoline Rodrigues CAMPOS, Maria Gisele GONÇALVES, Lucila Okuyama FUKASAWA, Nadia Aparecida COSTA, Carlos Henrique BARRETO-DAMIÃO, Mariana Cavalheiro MAGRI, Wong Kuen ALENCAR, Adele CATERINO-DE-ARAUJO.....	57-65
■ COMUNICAÇÃO BREVE/ BRIEF COMMUNICATION		
1638	Microbiological quality of water and dialysate from haemodialysis units in Southern Brazil	
	Qualidade microbiológica da água e dialisato em clínicas de hemodiálise do Sul do Brasil	
	Izabel Cristina FIGEL, Patricia do Rocio DALZOTO, Ida Chapaval PIMENTEL.....	66-70
1639	Diferentes intervalos de tempo de leitura do sistema API 20C AUX® na identificação de leveduras de interesse médico	
	Different reading time intervals of the API 20C AUX® system for identifying the yeasts of medical interest	
	Daise Damaris Carnietto de HIPPIÓLITO, Thiago Nunes ROBERTO, Miriam Rando ARAÚJO , Sandra Regina Brasil Stolf PUKINSKAS	71-74
1640	Avaliação da implementação das boas práticas de manipulação em unidade de acolhimento institucional por meio de um Programa de Incentivo fiscal e capacitação	
	Evaluation of the implementation of good handling practices in an institutional inclusion unit through a tax incentive Program and training	
	Cláudia WINTER, Laissa Benites MEDEIROS, Ana Lúcia SERAFIM, Lize STANGARLIN-FIORI.....	75-80
■ INSTRUÇÕES AOS AUTORES.....		81-89

Bisfenol A: o uso em embalagens para alimentos, exposição e toxicidade – Uma Revisão

Bisphenol A: Review on its use in the food packaging, exposure and toxicity

RIALA6/1631

Paulo Eduardo Masselli BERNARDO*, Sandra Aparecida NAVAS, Lúcia Tieco Fukushima MURATA, Maria Rosa da Silva de ALCÂNTARA

*Endereço para correspondência: ¹Núcleo de Águas e Embalagens, Centro de Contaminantes, Instituto Adolfo Lutz. Av. Dr. Arnaldo nº 355, São Paulo, SP, Brasil, CEP: 01246-000. Tel: (11) 3068-2920. E-mail: aguas.embalagens@ial.sp.gov.br

Recebido: 03.12.2014 - Aceito para publicação: 31.03.2015

RESUMO

O bisfenol A é um composto industrial produzido em larga escala em todo o mundo, sendo utilizado para produzir polímeros sintéticos, inclusive as resinas epóxi, que são empregadas no envernizamento interno e externo de latas de alimentos, e na produção de policarbonato com aplicações em mamadeiras e garrações de água. Outras aplicações menos significativas são a produção de policloreto de vinila (PVC), manufatura de papel térmico, poliuretano, poliamida e de produto para retardamento de chama, bem como na preparação de “selantes” e resinas dentárias. O bisfenol A é considerado como disruptor endócrino que interfere na produção, liberação, transporte, metabolismo, ligação ou eliminação dos hormônios naturais, responsáveis pela manutenção do equilíbrio e regulação dos processos de desenvolvimento. Dentre as várias vias de exposição humana ao bisfenol A, a exposição alimentar é a mais preocupante por atingir potencialmente um maior número de pessoas, em diversas faixas etárias, e que pode ocorrer durante longos períodos em pequenas doses e sem serem detectadas. Na presente revisão foram abordadas as vias de exposição ao bisfenol A, sua toxicidade e as legislações quanto aos limites para garantir a saúde humana.

Palavras-chave. bisfenol-A, disruptor endócrino, policarbonato, resinas epóxi, embalagens para alimentos.

ABSTRACT

Bisphenol A is an industrial compound produced in large scale around the world. This product is used for manufacturing the synthetic polymers, including epoxy resins, which are applied for varnishing the both internal and external parts of food cans, and also for producing the polycarbonate applied on baby bottles and bottles of water. Other less significant applications are the production of polyvinyl chloride (PVC), to manufacture the thermal paper, polyurethane, polyamide, flame retardant, and to prepare the dental sealants and resins. Bisphenol A is considered as an endocrine disruptor that interferes with the production, release, transport, metabolism, binding or elimination of natural hormones responsible for maintaining balance and regulation of development processes. Among the various routes of human exposure to bisphenol A, the dietary exposure is especially worrisome as it potentially reaches higher number of persons in the different age groups, besides, it may occur during long periods in low doses and without being detected. This review aimed at addressing the routes of exposure to bisphenol A, its toxicity and the legislations concerning their limits to ensure the human health integrity.

Keywords. bisphenol A, endocrine disruptor, polycarbonate, epoxy resins, food packaging.

INTRODUÇÃO

A embalagem desempenha um papel fundamental na indústria alimentícia graças às suas múltiplas funções. Além de conter o produto, a embalagem é muito importante na sua conservação, mantendo qualidade e segurança, atuando como barreira contra fatores responsáveis pela deterioração química, física e microbiológica. À medida que os alimentos embalados passaram a ter uma maior importância na dieta de grande parte das populações, a ênfase dada aos problemas toxicológicos advindos da interação da embalagem com o alimento foi aumentada. Existem embalagens de diferentes tipos de plástico, cada um com propriedades únicas e aplicação para contato com alimentos, por exemplo, policarbonato, polietileno de alta e baixa densidade, estireno, polipropileno, etc. Estes plásticos são fabricados a partir de vários polímeros e aditivos que são utilizados para melhorar a flexibilidade, cor, resistência, durabilidade, etc. Ambos, plásticos e aditivos podem migrar a partir da embalagem para o alimento ou bebida ao longo do tempo como resultado de um aumento na temperatura ou pressão mecânica. A migração para o alimento de componentes de plástico como monômeros, aditivos, corantes, tintas de impressão, vernizes, entre outros¹, podem afetar as propriedades organolépticas dos alimentos e produzir efeitos prejudiciais à saúde, se não for devidamente controlada e se os níveis ultrapassarem os valores toxicológicos ou da legislação².

Muitos monômeros, plastificantes e aditivos são considerados disruptores endócrinos, que interferem na produção, liberação, transporte, metabolismo, ligação ou eliminação dos hormônios naturais, responsáveis pela manutenção do equilíbrio e regulação dos processos de desenvolvimento². Um destes produtos químicos é o bisfenol A (BPA). O BPA tem atividade estrogênica moderada e pode influenciar a reprodução. Alguns estudos indicam que ele tem um potencial de perturbar a ação hormonal da tireóide; proliferação de células de câncer de próstata em humanos e bloqueio da síntese de testosterona².

O bisfenol A foi primeiramente descrito pelo químico russo Alexander P. Dianin em 1891. Este composto foi sintetizado pela primeira vez por Thomas Zincke em 1905, a partir de fenol e acetona,

na universidade de Marburg (Alemanha)³.

Em 1938, Dodds e seus colaboradores ao estudarem as propriedades biológicas de vários bisfenóis, detectaram as propriedades estrogênicas do bisfenol A. Nesse estudo concluíram que a capacidade estrogênica dos bisfenóis está relacionada com a presença de grupos OH em posição para. Em 1953, o Dr. Daniel Fox da General Electric e o Dr. Hermann Schnell da Bayer AG, descobriram a capacidade do bisfenol A formar ligações cruzadas na polimerização do plástico policarbonato, e assim em 1957 (nos EUA) e em 1958 (na Europa), deu-se início à produção industrial de bisfenol A para ser empregado no fabrico de plástico policarbonato⁴.

Mais tarde descobriu-se uma nova aplicação do bisfenol A no fabrico de resinas epóxi, usadas atualmente para revestir latas de conserva.

PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

Obisfenol A 2,2-bis(4-hidroxifenil)propano é um composto orgânico com um peso molecular de 228,29 g/mol. À temperatura ambiente é uma substância sólida, branca, cristalina, com ponto de fusão de 156 °C e ponto de ebulição de 220 °C a 5 hPa⁵.

O BPA é constituído por dois anéis fenólicos ligados por uma ponte de metil, com dois grupos funcionais metil ligados à ponte. A presença de grupos hidroxilas no BPA determina a sua boa reatividade. De modo semelhante a outros fenóis, BPA pode ser convertido em éteres, ésteres e sais. Além disso, o BPA sofre substituição eletrofílica como nitração, sulfonação, ou alquilação^{5,6}.

PRODUÇÃO E APLICAÇÕES DO BISFENOL A

A síntese do BPA é conseguida por condensação do fenol com acetona em meio ácido ou básico^{4,5}, conforme Figura 1.

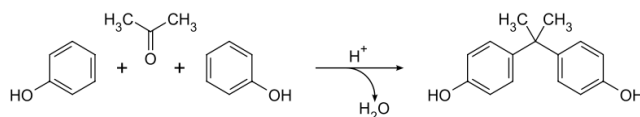


Figura 1. Síntese do bisfenol A

O bisfenol A é um composto industrial produzido em larga escala em todo o mundo^{7,8}. A demanda mundial de bisfenol A cresce entre 6 e 10% por ano. 95% do seu uso é para a produção de polímeros sintéticos, incluindo resinas epóxi, que são aplicadas no envernizamento interno e externo de latas de alimentos, e na produção de policarbonato, resina com aplicações em mamadeiras e garrafas de água. Outras aplicações menos significativas são a produção de policloreto de vinila (PVC), fabrico de papel térmico, poliuretano, poliamida, retardante de chama e na preparação de selantes e resinas dentárias^{7,9-13}.

Policarbonato

O policarbonato (PC) é um poliéster de cadeia linear (Figura 2), obtido através de uma reação de transesterificação entre um composto aromático hidroxilado (bisfenol A) e carbonato de difenila ou cloreto de carbonila¹¹. Este polímero possui as seguintes características: alta transparência, leve, resistência ao choque e a variações de temperatura desde -40 a 145 °C. Em virtude destas características o policarbonato é utilizado na fabricação de recipientes retornáveis e reutilizáveis destinados a entrar em contato com alimentos⁴.

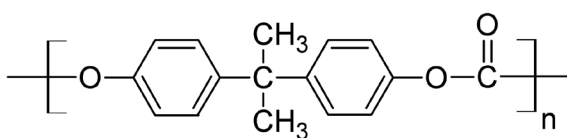


Figura 2. Estrutura do policarbonato

Resinas epóxi

As principais resinas sintéticas utilizadas no envernizamento de latas metálicas pertencem aos grupos dos epóxis, fenólicos, existindo a possibilidade de combinação entre elas como é o epóxi-fenólico, considerado de uso praticamente universal no lado interno de latas para acondicionamento de carnes, pescados, vegetais, produtos de laticínios, bebidas, etc¹⁴.

As resinas epóxi-fenólicas reúnem praticamente todas as características necessárias aos vernizes para latas de alimentos, pela combinação das propriedades de flexibilidade, aderência e resistência

química da resina epoxídica¹⁴.

As resinas epóxi são obtidas comercialmente a partir da reação entre o bisfenol A e a epicloridrina (1-cloro-2,3-epóxi-propano), que resulta no monômero conhecido como éter diglicídico do bisfenol A, também conhecido como BADGE (Figura 3)^{14,15}.

Muitos alimentos enlatados são esterilizados no processo de produção, aumentando a possibilidade de migração de BPA da lata para os alimentos. A presença de bisfenol A pode ocorrer também quando a reação de polimerização for incompleta. Por isto, as embalagens e recipientes confeccionados com materiais que contenham bisfenol A, em sua formulação devem ser avaliados quanto ao potencial de migração desse composto. O bisfenol A que é o material inicial para síntese de policarbonatos e resinas epóxis, tem sido detectado em latas de alimentos¹⁶.

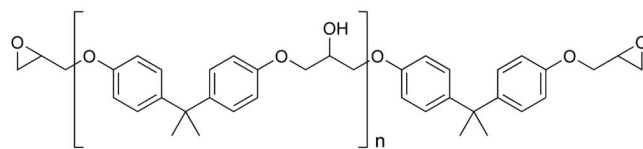


Figura 3. Estrutura da resina epóxi

VIAS DE EXPOSIÇÃO AO BISFENOL A

A exposição humana ao bisfenol A ocorre, sobretudo por via ocupacional, ambiental e alimentar^{5,6}. A exposição ocupacional ocorre, sobretudo em trabalhadores de indústrias de síntese de bisfenol A, síntese de PC e artigos de PC, resinas epóxi, PVC, papel térmico e tetrabromobisfenol A⁴.

A exposição ambiental resulta da contaminação atmosférica, aquática e dos solos com bisfenol A. Esta contaminação ambiental deve-se especialmente à utilização industrial do bisfenol A e à reciclagem de papel térmico^{5,6}. Outra via de exposição resulta da utilização de um compósito à base de bisfenol A como selante nos tratamentos dentários, porque possui boas propriedades mecânicas, estabilidade química e tem capacidade para simular a cor natural do dente¹⁷.

Dentre as várias vias de exposição humana ao bisfenol A anteriormente referidas, a exposição

alimentar é a mais preocupante por atingir potencialmente um maior número de pessoas e porque, neste caso a exposição pode ocorrer durante longos períodos (possivelmente toda a vida) em pequenas doses e sem serem detectadas^{6,18,19}.

A exposição ao bisfenol A por via alimentar resulta da utilização de recipientes de plásticos policarbonatos para contato com os alimentos ou ainda da utilização de resinas epóxi no revestimento interior de conservas alimentares. Em ambos os casos, o bisfenol A é o monômero base para a síntese de materiais que entram em contato direto com os alimentos⁶.

Vários estudos demonstram a migração de bisfenol A a partir de recipientes de policarbonato^{20,21} e de latas de conserva revestidas com resinas epóxi. Bisfenol A foi identificado em latas de vegetais, de fórmulas infantis, de bebidas, produtos de peixes e carnes²²⁻²⁴.

O polímero de PC após síntese é extremamente estável, no entanto, estudos revelam que pode ocorrer hidrólise sob certas condições de temperatura e pH com conseqüente liberação de compostos químicos^{6,20,23,25}.

A descoberta de que o bisfenol A poderia migrar a partir de recipientes de PC foi feita acidentalmente quando se verificou que recipientes de PC quando autoclavados liberavam um composto com propriedades estrogênicas^{4,20}.

Um aumento dos valores de migração de BPA de até 55 vezes foi observado durante a exposição do policarbonato à temperatura de ebulição (100 °C) comparado com água a temperatura ambiente (20 °C)²⁶.

A ligação éster existente no policarbonato pode sofrer hidrólise²⁷. Além da possível hidrólise do polímero pode também ocorrer migração de resíduos de bisfenol A resultantes da polimerização incompleta durante o fabrico do PC^{6,28}. Em qualquer dos casos, tratando-se de recipientes de PC destinados a entrar em contato com alimentos pode ocorrer migração do bisfenol A para os alimentos^{4,29}.

A degradação de materiais plásticos aumenta progressivamente com a reutilização, influenciando as suas características. O PC reutilizado 15 vezes é menos hidrofóbico que o PC novo o que pode facilitar a migração de bisfenol A em recipientes de

policarbonato usados^{4,30}.

Uma potencial exposição alimentar ao BPA deve ser avaliada de acordo com diferentes padrões de consumo para bebês na faixa etária de 0-6 meses. Os bebês com idade entre 0-6 meses podem ser alimentados com fórmula líquida infantil, fórmula infantil em pó, leite materno ou misturas destes alimentos. Além disso, os alimentos podem ser fornecidos a partir de garrafas feitas de vidro, de metal ou de plástico, ou exclusivamente amamentados por lactantes³¹. Nessa faixa etária, 81 % da exposição à migração de BPA foi proveniente de mamadeiras de PC e 19 % para fórmula líquida infantil embaladas em recipientes de PC ou latas de metal com revestimentos epóxi. A migração de BPA de resina epóxi em contato com a fórmula de leite em pó contribuiu com aproximadamente 1 % da exposição³¹.

A exposição média a BPA em bebês de 0-6 meses amamentados exclusivamente por lactantes foi de 0,3 µg/kg de peso corporal por dia, e a exposição no percentil 95 foi de 1,3 µg/kg de peso corporal por dia. Para crianças com faixa etária de 6-36 meses em que os alimentos sólidos são introduzidos na dieta, a exposição ao BPA diminuiu³¹.

Há uma escala de estimativas de exposição para crianças alimentadas com fórmula. Geralmente, a exposição é maior para bebês (0-6 meses) alimentados com fórmula líquida do que para as crianças alimentadas com leite em pó e mais alta para bebês alimentados com mamadeiras de policarbonato do que para crianças alimentadas com mamadeiras de outro material. A exposição máxima estimada ocorre em bebês de 0-6 meses de idade, que são alimentados com fórmula líquida em mamadeiras de policarbonato: 2,4 µg/kg de peso corporal por dia na média e 4,5 µg/kg de peso corporal por dia no percentil 95³¹.

Para crianças com mais de 3 anos, a exposição máxima estimada não excedeu a 0,7 µg/kg de peso corporal por dia em média e no máximo de 1,9 µg/kg de peso corporal por dia. Para os adultos, a exposição máxima estimada não excedeu a 1,4 µg/kg de peso corporal por dia em média e no máximo de 4,2 µg/kg de peso corporal por dia³¹.

Com base nos dados disponíveis, a exposição ao BPA é geralmente menor a partir de fontes não

alimentares do que de fontes alimentares. Em outras palavras, o alimento é de longe o maior contribuinte da exposição global ao BPA para a maioria dos grupos populacionais³¹.

As resinas (vernizes) são empregadas nas embalagens metálicas com o objetivo principal de evitar o contato direto do metal com o produto alimentício, minimizando as reações de interação lata/alimento, tais como as reações de sulfuração e corrosão¹⁴.

Os requisitos específicos exigidos dos vernizes para contato com alimentos são a inércia química, a resistência à esterilização ou à pasteurização, para produtos termoprocessados, a resistência aos ácidos orgânicos e a sulfuração, no caso de acondicionamento de produtos que contenham enxofre¹⁴.

Pesquisadores mostraram que as concentrações de BPA em latas aquecidas a 80 °C foram de 1,6-16,7 vezes maior (6 vezes em média) que as latas não aquecidas e as latas aquecidas a 100 °C obtiveram concentrações de BPA de 1,7-55,4 vezes maior (média de 18 vezes) que a concentração sem aquecimento, já a concentração de BPA em latas aquecidas a 100 °C aumentou 6,1 vezes (3 vezes em média) em relação às aquecidas a 80 °C^{5,32}.

Eles também provaram que havia uma associação entre a concentração de BPA liberado de resinas epóxi utilizadas em latas e a temperatura de pasteurização de alimentos enlatados. Concentrações baixas de BPA foram encontradas a partir de resinas epóxi de latas para alimentos que não foram pasteurizadas. Observou-se que diminuindo a temperatura de tratamento térmico de 100 °C para 80 °C pode-se reduzir a concentração de BPA em até dois terços³².

TOXICIDADE DO BISFENOL A

Um estudo realizado em 1993 revelou que uma substância estrogênica se libertava de recipientes de policarbonato, essa substância foi posteriormente identificada como bisfenol A. Esta descoberta abriu as portas à polêmica sobre os possíveis efeitos da exposição humana ao bisfenol A^{4,20}.

Provou-se que o BPA pode afetar os organismos animais e humanos por meio de interações com o estrogênio, androgênio,

hidrocarboneto aromático e receptores ativados por proliferadores de peroxissomo; portanto, interfere na função não só do sistema endócrino, incluindo alterações na função de hormônios sexuais, insulina, leptina, adiponectina ou tiroxina, mas também afeta outros sistemas do corpo, incluindo os imunológicos ou nervosos^{5,33,34}.

Pesquisas têm mostrado o potencial do bisfenol A de interferir na atividade do hormônio tireoidiano, em induzir a proliferação de células de câncer de próstata e em impedir a síntese de testosterona quando presente em doses muito baixas (partes por trilhão)³⁵.

Os resultados das investigações mostraram que o BPA exerce efeitos multidirecionais em organismos vivos porque interage com os receptores, gera ROS (espécies reativas de oxigênio), altera sinalização celular, provoca alterações mutagênicas e inibe a metilação do DNA. Foi documentado efeito hepatotóxico³⁶, mutagênico e carcinogênico de BPA em células eucarióticas (estudos *in vitro*) e animais (estudos *in vivo*); no entanto, não há provas suficientes se BPA nas concentrações normalmente determinadas no ambiente e/ou no organismo humano (sangue, urina) pode causar os efeitos acima mencionados em seres humanos. Os resultados relativos aos efeitos neurotóxicos e teratogênicos de BPA são inconsistentes, portanto, não há forte evidência de que o BPA apresente ação em seres humanos⁵.

Recentemente, os resultados de estudos epidemiológicos mostraram que a exposição da população em geral, ao BPA pode aumentar o risco de doença cardíaca coronária e distúrbios metabólicos incluindo diabetes e obesidade; no entanto, novas investigações devem ser realizadas para confirmar os resultados^{5,37,38}.

TOXICOCINÉTICA DO BISFENOL A

A toxicocinética de BPA tem sido estudada em roedores, primatas não humanos, e humanos³⁹⁻⁴³. O BPA é rapidamente e extensamente absorvido após administração oral e é submetido a um rápido metabolismo de primeira passagem no intestino e fígado, sendo completamente absorvido a partir do trato gastrointestinal. BPA não é extensivamente metabolizado através de reações de fase I, mas é

rapidamente conjugado com ácido glucurônico (metabolismo da fase II) para o não ativo BPA-glucuronide na parede do intestino e fígado. Quantidades pequenas de BPA também podem reagir com sulfato para formar BPA-sulfato. A formação de conjugados de BPA é considerada um processo de desintoxicação e só as formas livres de BPA exibem atividade estrogênica¹⁹. Os BPA conjugados, formados no fígado são transportados para o sangue em seres humanos para atingir o rim, sendo ainda excretados na urina, com semi-vidas terminais de menos de 6 h. Assim, a exposição de BPA pode ser estimada a partir dos níveis urinários⁴¹. BPA ingerido por inalação ou contato com a pele não sofre efeito de primeira passagem e, portanto, é eliminado em um ritmo mais lento. Estudos realizados em animais revelam que o bisfenol A após administração oral ou subcutânea atinge concentrações sanguíneas mais elevadas nos primatas que nos ratos⁴⁴. O perfil de concentração versus tempo observado, após a administração oral de 100 µg de BPA/kg de peso corporal em macacos adultos foi muito semelhante aos realizados em voluntários humanos que receberam uma dose similar⁴⁰.

O bisfenol A apresenta uma extensa distribuição, tendo sido detectado em diversos órgãos (fígado, medula óssea, testículos, placenta, cordão umbilical e feto) e tem ainda a capacidade de atravessar a placenta e ser excretado no leite materno^{4,45}.

Durante a gravidez, a forma conjugada do BPA circulará através da placenta, e será submetido a desconjugação, e subseqüentemente causará a exposição do feto dentro do útero. Isto pode também resultar na bioacumulação de uma parte de BPA após a exposição. De fato, evidências recentes sugerem que em baixas concentrações, o BPA tem afinidade lipofílica com gordura. Enquanto que, a maioria de BPA no plasma (cerca de 95 %) está ligado às proteínas séricas. Por outro lado, BPA parece ter uma afinidade desproporcionada em gordura, em comparação com outros tecidos tais como rins, músculo, e outros locais; “em gordura, a acumulação de BPA foi de cerca de três vezes mais elevada do que em outros tecidos”. Com indícios de potencial de bioacumulação, o BPA tem a possibilidade de exercer efeitos metabólicos contínuos⁴⁶.

Uma indicação que, o BPA pode provocar bioacumulação em humanos decorre das comparações dos níveis estimados de exposição ao BPA, dos estudos farmacocinéticos disponíveis e dos níveis de BPA medidos em tecidos e fluidos humanos. Como exposições ao BPA são estimadas em 40 ng a 5 µg/kg de peso corporal dia, estudos sugerem que o BPA é rapidamente metabolizado e excretado do corpo indicando que o BPA pode ser indetectável em amostras humanas. No entanto, BPA é detectado na faixa de nanogramas por mililitro em amostras de sangue e tecidos. Estes resultados sugerem que: a ingestão de BPA é superior à estimada; ou o metabolismo do BPA após exposição crônica a baixo nível (40 ng a 5 µg/kg de peso corporal dia) não segue nenhum modelo metabólico atual; e/ou BPA bioacumula no corpo. Assim, as sugestões de que o BPA é rapidamente metabolizado e eliminado do corpo não considera o fato de que o BPA não conjugado tenha sido repetidamente detectado em fluidos e tecidos humanos. Quando métodos sensíveis são utilizados, o BPA não conjugado é detectado na maioria dos tecidos humanos, incluindo a unidade feto-placentária⁴⁷.

Verificou-se que a biotransformação (oxidação) de BPA pelo citocromo P450 monooxigenases em mamíferos associada com a formação de metabólitos reativos de BPA, geralmente aumenta a sua toxicidade e estrogenicidade. Por outro lado, a maioria dos metabólitos de BPA formados durante as transformações das plantas e microrganismos (bactérias, fungos, algas) apresentam menor toxicidade e estrogenicidade, e, assim, alguns micro-organismos são considerados úteis na remoção de BPA do ambiente poluído⁵.

LEGISLAÇÃO

Para garantir a saúde humana, a União Européia estabeleceu limites para muitos compostos utilizados em materiais de embalagens e estabeleceu também regulamentos que especificam os ensaios de migração, utilizando simulantes de alimentos para determinar a sua provável migração em alimentos².

Para bisfenol A, foi levantada a hipótese de que sua presença em baixas concentrações no organismo humano pode causar efeitos adversos à saúde em virtude, principalmente, de alterações hormonais⁴⁸.

Desde a origem desta hipótese, vários trabalhos científicos relatam que baixas concentrações de bisfenol A, durante o desenvolvimento do corpo humano, podem provocar proliferação de células de câncer no cérebro, na próstata e nas glândulas mamárias, tem potencial para perturbar a ação hormonal da tireoide, provocar puberdade precoce, bloquear a síntese de testosterona e aumentar o risco de infertilidade^{2,5,33,34,42}. Recentes trabalhos questionam esta hipótese e relatam que poucos estudos foram realizados na faixa de exposição humana ao BPA⁴⁹. Por diversas razões, incluindo considerações éticas e dificuldades na identificação de indivíduos não expostos ao BPA do ambiente, muitos estudos têm adotado a questão do metabolismo do BPA em animais, particularmente roedores¹².

Em 2006, a European Food Safety Authority - EFSA, definiu o Tolerable Daily Intake (TDI) de BPA em 0,05 mg BPA/kg de peso corporal (pc)/dia. Esta TDI tem por base o nível sem efeitos nocivos de 5 mg/kg de peso corporal por dia decorrente de um estudo multigeracional de toxicidade reprodutiva em ratos, e a aplicação de um fator de incerteza de 100, que é considerado seguro com base em toda a informação sobre a toxicocinética do BPA. A EFSA, no seu parecer concluiu que lactentes de 3 e 6 meses alimentados com recurso de mamadeiras de policarbonato apresentam a exposição mais elevada ao BPA, embora se encontre ainda abaixo da TDI. Foi considerado que para este grupo de lactentes, o nível de exposição ao BPA diminui quando é eliminada progressivamente a alimentação através de mamadeiras de policarbonato e outras fontes nutritivas se tornam dominantes⁵⁰.

Em 2008, o Canadá proibiu o uso de policarbonatos na confecção de mamadeiras e estabeleceu limites estritos para BPA em latas de produtos infantis. Na Dinamarca, em 2010, foi banido o uso de BPA em materiais para contato com alimentos destinados a crianças de 0 a 3 anos. Na França, o governo proibiu temporariamente o fabrico, a importação, a exportação e a colocação no mercado de mamadeiras que contenham BPA^{7,50}.

Em julho de 2010, o Comitê sobre Materiais para Contato com Alimentos, Enzimas, Flavorizantes e Auxiliares de Processamento (Panel on Food Contact Materials, Enzymes, Flavourings

and Processing Aids (CEF)) da EFSA, considerou que a TDI de 0,05 mg de bisfenol A/kg de peso corporal por dia pode ser mantida e sugeriram que no momento esta permanecesse como TDI temporária¹³.

Em 2011, a Comissão Europeia, publicou o Regulamento (EU) nº 10/2011, de 14 de janeiro de 2011, da União Europeia, que autoriza o uso de bisfenol A, em embalagens plásticas destinadas a entrar em contato com alimentos, com o limite de migração específica (LME) de 0,6 mg de bisfenol A/kg de alimento, não fazendo restrição de uso ao tipo de material plástico utilizado na fabricação da embalagem. Posteriormente, publicou a Diretiva nº 8, de 28 de janeiro de 2011, onde o LME de bisfenol A permaneceu o mesmo, mas o uso do material plástico policarbonato foi proibido para a fabricação de mamadeiras destinadas a lactentes. Além disso, foi publicado o Regulamento (EU) nº 321/2011, que altera o Regulamento (EU) nº 10/2011, no que diz respeito à restrição de uso do bisfenol A e a proibição do policarbonato na fabricação de mamadeiras destinadas a lactentes⁵⁰⁻⁵².

Autoridades Sanitárias mundiais avaliam os riscos do uso de bisfenol A em relação à saúde

A Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (EFSA - European Food Safe Authority), a Agência de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos (FDA-U.S. Food and Drug Administration), o Ministério Japonês de Saúde, Trabalho e Bem-Estar (Ministry of Health, Labour and Welfare) e Ministério da Saúde do Canadá (Health Canada), confirmaram a segurança das aplicações de bisfenol A em artigos destinados a entrar em contato com alimentos¹¹.

Provisoriamente, a FDA está tomando medidas para reduzir a exposição humana ao bisfenol A na alimentação. Estes passos incluem: apoiar as ações das indústrias para eliminar o uso de bisfenol A na produção de mamadeiras e copos disponíveis no mercado americano, destinados à alimentação infantil. Incentivar o desenvolvimento de alternativas ao bisfenol A para os revestimentos de latas de fórmula infantil e apoiar os esforços para substituir ou minimizar os níveis de bisfenol A, apoiar uma mudança na estrutura da legislação para monitorar o bisfenol A e apoiar as recomendações do Departamento de Saúde e Serviços Humanos para a

alimentação infantil e preparação de alimentos para reduzir a exposição ao bisfenol A^{53,54}.

No Brasil, a Resolução RDC nº 17/2008, de 17 de março de 2008 da ANVISA, correspondente à Resolução GMC do Mercosul nº 32/2007, estabelece o LME de 0,6 mg de bisfenol A/kg de alimento ou simulante. E a Resolução RDC nº 41, de 16 de setembro de 2011 da ANVISA, proíbe a fabricação e importação de mamadeiras para alimentação de lactentes que contenham a substância bisfenol A na sua composição. A Resolução RDC nº 56/2012, de 16 de novembro de 2012 da ANVISA, correspondente a Resolução GMC do Mercosul nº 02/2012, de 19 de abril de 2012, mantém o LME de 0,6 mg de bisfenol A/kg de alimento e não autoriza o uso de bisfenol A em polímeros utilizados na fabricação de mamadeiras e artigos similares destinados a alimentação de lactantes⁵⁵⁻⁵⁹.

CONCLUSÃO

Estudos com bisfenol A tem sido desenvolvidos, buscando avaliar seus efeitos adversos à saúde humana, isto envolve a sua utilização nas embalagens e recipientes para alimentos, as vias de exposição e toxicidade, para o estabelecimento de limites de migração específica e índices de tolerância diários mais reais, minimizando as incertezas quanto à exposição de animais e humanos ao bisfenol A e seus derivados.

No Brasil, a proibição do uso de bisfenol A em polímeros utilizados na fabricação de mamadeiras e artigos similares, diminuiu a exposição alimentar ao BPA, em lactentes. Novos esforços por parte dos fabricantes de embalagens plásticas devem ser incentivados, para o desenvolvimento de tecnologias na substituição ao uso de BPA na produção de recipientes reutilizáveis destinados à alimentação infantil.

Pesquisas indicam que a migração de BPA para os alimentos e a exposição por via alimentar, aumenta progressivamente com a reutilização contínua do recipiente plástico de policarbonato. Foi constatado também um aumento na migração de bisfenol A, através de processos térmicos de aquecimento dos alimentos diretamente no recipiente plástico de policarbonato ou na embalagem metálica revestida internamente com

resina epóxi. Ao mesmo tempo, autoridades de segurança alimentar de vários países confirmam que o nível de contaminação diária por bisfenol A está abaixo do TDI de 0,05 mg de bisfenol A/kg de peso corporal por dia.

Novos e contínuos estudos sobre a exposição humana nas diversas faixas etárias devem ser realizados para avaliar o potencial de: bioacumulação; os efeitos da exposição crônica ao BPA; a possibilidade de exercer efeitos metabólicos e hormonais. Os resultados destes estudos contribuirão quanto ao estabelecimento de medidas para gerenciamento do risco, envolvendo restrições ou proibição do uso, limites de exposição diária e a informação correta para a população.

De acordo com os esclarecimentos anteriores podemos concluir que a presente revisão tem a finalidade de abranger várias informações sobre BPA, fórmula molecular, características e aplicações, além da atualização de tópicos sobre vias de exposição, toxicidade e legislações quanto aos limites aplicados para segurança da saúde humana, demonstrando a importância na continuidade das pesquisas sobre este tema, assim contribuindo para o fornecimento de alimentos mais seguros à população.

REFERÊNCIAS

1. Murata LTF, Nunes MCD, Alcântara MRS, Pascuet NS, Bernardo PEM. Embalagens destinadas a alimentos. *In*: Germano PML, Germano MIS (organizadores). *Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos*. São Paulo: Editora Manole Ltda. 2011.p.709-59.
2. Fasano E, Bono-Blay F, Cirillo T, Montuori P, Lacorte S. Migration of phthalates, alkylphenols, bisphenol A and di(2-ethylhexyl) adipate from food packaging. *Food Control*. 2012; 27(1): 132-8. doi:10.1016/j.foodcont.2012.03.005
3. Huang YQ, Wong CKC, Zheng JS, Bouwman H, Barra R, Wahlstrom B, et al. Bisphenol A (BPA) in China: A review of sources, environmental levels, and potential human health impacts. *Environ Int*. 2012; 42: 91-9. doi:10.1016/j.envint.2011.04.010
4. Encarnação IPMF. Estudos de migração do bisfenol A em biberões [dissertação de mestrado]. Lisboa (PT): Universidade de Lisboa; 2007.
5. Michalowicz J. Bisphenol A - Sources, toxicity and biotransformation. *Environ Toxicol Phar*. 2014; 3 (2):738-58. doi:10.1016/j.etap.2014.02.003

6. EU. European Union Risk Assessment Report. Bisphenol A, CAS N°:80-05-7. Institute for Health and Consumer Protection, European Chemicals Bureau, European Commission Joint Research Centre, 3rd Priority List, Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities. 2003. [acesso 2014 Jun 05]. Disponível em: [http://www.oehha.org/prop65/cnrn_notices/state_listing/data_callin/pdf/EU_bisphenolareport325.pdf].
7. Flint S, Markle T, Thomson S, Wallace E. Bisphenol A exposure effects and policy; a wildlife perspective. *J Environ Manage*. 2012; 104:19–34. doi: 10.1016/j.jenvman.2012.03.021
8. Maia J, Cruz JM, Sendón R, Bustos J, Cirugeda ME, Sanches JJ, et al. Effect of amines in the release of bisphenol A from polycarbonate baby bottles. *Food Res Int*. 2010; 43(5): 1283-8. doi:10.1016/j.foodres.2010.03.014
9. Beserra MR, Schiavini JA, Rodrigues WC, Pereira CSS. O Bisfenol A: sua utilização e a atual polêmica em relação aos possíveis danos à saúde humana. *Rev Eletr TECCEN*. 2012; 5(1): 37-46.
10. Nam S-H, Seo Y-M, Kim M-G. Bisphenol A migration from polycarbonate baby bottle with repeated use. *Chemosphere*. 2010; 79(9): 949-52. doi:10.1016/j.chemosphere.2010.02.049
11. Perez MAF. O bisfenol A e as legislações para contato com alimentos. *Bol Tecnol Desenv Embalagens*. 2012; 24(2): 5p. Disponível em: [http://www.cetea.ital.sp.gov.br/informativo/v24n2/v24n2_artigo2.pdf].
12. Vandenberg LN, Hauser R, Marcus M, Olea N, Welshons WV. Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reprod Toxicol*. 2007; 24(2):139–77. doi:10.1016/j.reprotox.2007.07.010
13. European Food Safety Authority (EFSA). Scientific opinion on bisphenol A: evaluation of a study investigating its neurodevelopment toxicity, review of recent scientific literature on its toxicity and advice on the Danish risk assessment of Bisphenol A. *EFSA Journal*. 2010; 8(9): 1829, 116p. [acesso 2014 Jun 13]. Disponível em: [<http://www.efsa.europa.eu/de/scdocs/doc/1829.pdf>].
14. Saron ES. Estabilidade de suco de maracujá acondicionado em embalagens de aço com diferentes revestimentos orgânicos [dissertação de mestrado]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2004.
15. Cao XL, Corriveau J, Popovic S. Levels of bisphenol A in canned soft drink products in Canadian Markets. *J Agric Food Chem*. 2009; 57(4): 1307-11. doi: 10.1021/jf803213g
16. Marical-Arcas M, Rivas A, Granada A, Monteagudo C, Murcia MA, Olea-Serrano F. Dietary exposure assessment of pregnant women to bisphenol-A from cans and microwave containers in Southern Spain. *Food Chem Toxicol*. 2009; 47(2): 506-10. doi: 10.1016/j.fct.2008.12.011
17. Noda M, Komatsu H, Sano H. HPLC analysis of dental resin composites components. *J Biomed Mater Res*. 1999; 47(3): 374-8. doi: 10.1002/(SICI)1097-4636(19991205)47:3<374
18. Wilson NK, Chuangb JC, Morgan MK, Lordo RA, Sheldon LS. An observational study of the potential exposures of preschool children to pentachlorophenol, bisphenol A and nonylphenol at home and daycare. *Environ Res*. 2007; 103(1): 9–20. doi:10.1016/j.envres.2006.04.006
19. Geens T, Aerts D, Berthot C, Bourguignon JP, Goeyens L, Lecomte P, et al. A review of dietary and non-dietary exposure to bisphenol A. *Food Chem Toxicol*. 2012; 50(10): 3725-40. doi: 10.1016/j.fct.2012.07.059
20. Krishnan AV, Sthathis P, Permuth SF, Tokes L, Feldman D. Bisphenol A: an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. *Endocrinology*. 1993; 132(6): 2279-86. doi: <http://dx.doi.org/10.1210/endo.132.6.8504731>
21. Biles JE, McNeal TP, Begley TH, Hollifield HC. Determination of bisphenol A in reusable polycarbonate food-contact plastics and migration to food-simulating liquids. *J Agric Food Chem*. 1997; 45(9): 3541-4. doi: 10.1021/jf970072i
22. Biles JE, McNeal TP, Begley TH. Determination of bisphenol A migrating from epoxy can coatings to infant formula liquid concentrates. *J Agric Food Chem*. 1997; 45(12): 4697-700. doi: 10.1021/jf970518v
23. Thomson BM, Grounds PR. Bisphenol A in canned foods in New Zealand: An exposure assessment. *Food Addit Contam*. 2005; 22(1):65-72. doi: 10.1080/02652030400027920
24. Cabado AG, Aldea S, Porro C, Ojea G, Lago J, Sobrado C, et al. Migration of BADGE (bisphenol A diglycidyl-ether) and BFDGE (bisphenol F diglycidyl-ether) in canned seafood. *Food Chem Toxicol*. 2008; 46(5):1674-80. doi:10.1016/j.fct.2008.01.006
25. Bem-Jonathan N, Steinmetz R. Xenoestrogens: the emerging story of bisphenol A. *Trends Endocrinol Metab*. 1998; 9(3): 124-8. doi:10.1016/S1043-2760(98)00029-0
26. Le HH, Carlson EM, Chua JP, Belcher SM. Bisphenol A is released from polycarbonate drinking bottles and mimics the neurotoxic actions of estrogen in developing cerebellar neurons. *Toxicol Lett*. 2008; 176(2): 149-56. doi: 10.1016/j.toxlet.2007.11.001
27. Welshons WV, Nagel SC, vom Saal FS. Large effects from small exposures.III. Endocrine mechanisms mediating effects of bisphenol A at levels of human exposure. *Endocrinology*. 2006; 147(6): S56-69. doi: <http://dx.doi.org/10.1210/en.2005-1159>

28. Maffini MV, Rubin BS, Sonnenschein C, Soto AM. Endocrine disruptors and reproductive health: the case of bisphenol A. *Mol Cell Endocrinol*. 2006; 254-255:179-86. doi:10.1016/j.mce.2006.04.033
29. Mercea P. Physicochemical processes involved in migration of bisphenol A from polycarbonate. *J Appl Polym Sci*. 2009; 112(2): 579-93. doi: 10.1002/app.29421
30. Jetten J, Kruijff N. Quality and safety aspects of reusable plastic food packaging materials: influence of reuse on intrinsic properties. *Food Addit Contam*. 2002; 19(1): 76-88. doi: 10.1080/02652030110071309
31. World Health Organization – WHO. Toxicological and Health Aspects of Bisphenol A Report of Joint FAO/WHO Expert Meeting. 2010. [acesso 2014 Nov 25]. Disponível em: [http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/97892141564274_eng.pdf].
32. Takao Y, Lee HC, Kohra S, Arizono K. Release of bisphenol A from food can lining upon heating. *J Health Sci*. 2002; 48(4): 331-4.
33. Rogers JA, Metz L, Yong VW. Review: Endocrine disrupting chemicals and immune responses: A focus on bisphenol-A and its potential mechanisms. *Mol Immunol*. 2013; 53(4): 421-30. doi: 10.1016/j.molimm.2012.09.013
34. Rochester JR. Bisphenol A and human health: A review of the literature. *Reprod Toxicol*. 2013; 42:132-55. doi:10.1016/j.reprotox.2013.08.008
35. Ballesteros-Gómez A, Rubio S, Pérez-Bendito D. Analytical methods for the determination of bisphenol A in food. *J Chromatogr A*. 2009; 1216(3): 449-69. doi: 10.1016/j.chroma.2008.06.037
36. Hassan ZK, Elobeid MA, Virk P, Omer SA, ElAmin M, Daghestani MH, et al. Bisphenol A induces hepatotoxicity through oxidative stress in rat model. *Oxid Med Cell Longev*. 2012; ID 194829, 6 p. doi:10.1155/2012/194829
37. Olsén L, Lind L, Lind PM. Associations between circulating levels of bisphenol A and phthalate metabolites and coronary risk in the elderly. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2012; 80: 179-83. doi: 10.1016/j.ecoenv.2012.02.023.
38. Vom Saal FS, Nagel SC, Coe BL, Angle BM, Taylor JA. The estrogenic endocrine disrupting chemical bisphenol A (BPA) and obesity. *Mol Cell Endocrinol*. 2012; 354(1-2): 74-84. doi: 10.1016/j.mce.2012.01.001
39. Doerge DR, Twaddle NC, Vanlandingham M, Fisher JW. Pharmacokinetics of bisphenol A in neonatal and adult Sprague-Dawley rats. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2010; 247(2): 158–65. doi: 10.1016/j.taap.2010.06.008
40. Doerge DR, Twaddle NC, Woodling KA, Fisher JW. Pharmacokinetics of bisphenol A in neonatal and adult rhesus monkeys. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2010; 248(1): 1–11. doi: 10.1016/j.taap.2010.07.009
41. Völkel W, Bittner N, Dekant W. Quantitation of bisphenol A and bisphenol A glucuronide in biological samples by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Drug Metab Dispos*. 2005; 33(11): 1748-57. doi:10.1124/dmd.105.005454
42. Calafat AM, Ye X, Wong L-Y, Reidy JA, Needham LL. Exposure of the U.S. population to bisphenol A and 4-tertiary-octylphenol: 2003-2004. *Environ Health Perspect*. 2008; 116(1): 39-44. doi: 10.1289/ehp.10753
43. Kuruto-Niwa R, Tateoka Y, Usuki Y, Nozawa R. Measurement of bisphenol A concentrations in human colostrum. *Chemosphere*. 2007; 66(6): 1160-4. doi:10.1016/j.chemosphere.2006.06.073
44. Tominaga T, Negishi T, Hirooka H, Miyachi A, Inoue A, Hayasaka I, et al. Toxicokinetics of bisphenol A in rats, monkeys and chimpanzees by the LC-MS/MS method. *Toxicology*. 2006; 226(2-3): 208-17. doi:10.1016/j.tox.2006.07.004
45. Tsutsumi O. Assessment of human contamination of estrogenic endocrine-disrupting chemicals and their risk for human reproduction. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2005; 93(2-5): 325-30. doi:10.1016/j.jsbmb.2004.12.008
46. Genuis SJ, Beesoon S, Birkholz D, Lobo RA. Human excretion of bisphenol A: blood, urine, and sweat (BUS) study. *J Environ Public Health*. 2012; ID 185731: 10p. doi: 10.1155/2012/185731
47. Vandenberg LN, Maffini MV, Sonnenschein C, Rubin BS, Soto AM. Bisphenol-A and the great divide: a review of controversies in the field of endocrine disruption. *Endocr Rev* 2009; 30(1):75-95. doi: 10.1210/er.2008-0021
48. Vandenberg LN, Ehrlich S, Belcher SM, Ben-Jonathan N, Dolinoy DC, Hugo ER, et al. Low dose effects of bisphenol A. An integrated review of in vitro, laboratory animal, and epidemiology studies. *Endocr Disrup*. 2013; 1(1): e25078-1-20. doi: 10.4161/endo.26490
49. Teeguarden JG, Hanson-Drury S. A systematic review of bisphenol A “low dose” studies in the context of human exposure: a case for establishing standards for reporting “low-dose” effects of chemicals. *Food Chem Toxicol*. 2013; 62: 935-48. doi: 10.1016/j.fct.2013.07.007
50. União Europeia (UE). Comissão das Comunidades Europeia. Regulamento N° 08/2011, de 28 de janeiro de 2011. Modifica la Directiva 2002/72/CE no que se refere a restrição do uso de bisfenol A em mamadeiras de plástico para lactantes. *Jornal Oficial [da] União Europeia*. Bruxelas, L 26, 29 jan. 2011. 4p.
51. União Europeia (UE). Comissão das Comunidades Europeia. Regulamento N° 10/2011, de 14 de janeiro de 2011. Relativo aos materiais e objetos de matéria plástica destinados a entrar em contato com os alimentos. *Jornal Oficial [da] União Europeia*. Bruxelas, L 12, 15 jan. 2011. 89p.

52. União Européia (UE) Comissão das Comunidades Européia. Regulamento de Execução N° 321/2011, de 01 de abril de 2011. Altera o Regulamento (UE) N° 10/2011 no que respeita à restrição da utilização de bisfenol A em mamadeiras de plástico. *Jornal Oficial [da] União Européia*. Bruxelas, L 87, 02 abr. 2011. 2p.
53. U.S. Food and Drug Administration (FDA). Update on bisphenol A for use in food contact applications. Jan.2010; 7p. [acesso em 2014 jun 05]. Disponível em: [<http://www.fda.gov/downloads/NewsEvents/PublicHealthFocus/UCM197778.pdf>]
54. U.S. Food and Drug Administration (FDA). FDA Consumer Health Information. FDA continues to study BPA. March. 2012; 2p. [acesso em 2014 nov 26]. Disponível em: [<http://www.fda.gov/downloads/ForConsumers/ConsumerUpdates/UCM297971.pdf>]
55. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n° 17, de 17 de março de 2008. Dispõe sobre regulamento técnico sobre lista positiva de aditivos para materiais plásticos destinados à elaboração de embalagens e equipamentos em contato com alimentos. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 18 mar. 2008. Seção 1, p. 43-51.
56. Grupo Mercado Comum Mercosul/GMC/Res. n° 32/2007. Regulamento Técnico Mercosul sobre lista positiva de aditivos para materiais plásticos destinados à elaboração de embalagens e equipamentos em contato com alimentos. Montevideú, 11 dez. 2007. Disponível em: [http://www.mercosur.int/innovaportal/v/595/1/secretaria/resoluciones_2007]
57. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n° 41, de 16 de setembro de 2011. Dispõe sobre a proibição de uso de bisfenol A em mamadeiras destinadas a alimentação de lactantes e dá outras providências. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 19 set. 2011. Seção 1, n° 180. p. 54.
58. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n° 56, de 16 de novembro de 2012. Dispõe sobre a lista positiva de monômeros, outras substâncias iniciadoras e polímeros autorizados para a elaboração de embalagens e equipamentos plásticos em contato com alimentos. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 21 nov. 2012. Seção 1, n° 224. p.66-77.
59. Grupo Mercado Comum Mercosul/GMC/Res. n° 02/2012. Regulamento Técnico Mercosul sobre lista positiva de monômeros, outras substâncias iniciadoras e polímeros autorizados para a elaboração de embalagens e equipamentos plásticos em contato com alimentos. Buenos Aires, 19 abr. 2012. Disponível em: [http://www.mercosur.int/innovaportal/v/4151/1/secretaria/resoluciones_2012]

Teores de sódio em leites industrializados consumidos no Brasil

Sodium contents in the processed milk consumed in Brazil

RIALA6/1632

Márcia Liane BUZZO^{1*}, Maria de Fátima Henriques CARVALHO¹, Edna Emy Kumagai ARAKAKI¹, Richard MATSUZAKI¹, Camila Cardoso de OLIVEIRA², Carmen Silvia KIRA³

*Endereço para correspondência: ¹Núcleo de Contaminantes Inorgânicos, Centro de Contaminantes, Instituto Adolfo Lutz. Av. Dr. Arnaldo nº 355, São Paulo, SP, Brasil, CEP: 01246-000. Tel: (11) 3068-2923. E-mail: marcialiane@ial.sp.gov.br

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

³Núcleo de Química, Física e Sensorial, Centro de Alimentos, Instituto Adolfo Lutz

Recebido: 22.12.2014 - Aceito para publicação: 23.03.2015

RESUMO

O leite é considerado um alimento essencial à dieta humana, principalmente para crianças, tornando-se imprescindível a garantia da qualidade deste produto, como o controle do teor de sódio. O alto consumo de sódio pode comprometer a saúde da população e estar associado com Doenças Crônicas Não Transmissíveis. Este estudo visou à determinação de sódio em leites consumidos no Brasil: pasteurizado integral, pasteurizado com 3 % de gordura, UHT e em pó, utilizando-se a técnica de espectrometria de emissão atômica com plasma de argônio acoplado indutivamente. Foram detectados teores médios de sódio superiores para o leite UHT; e foi observada variabilidade entre os teores mínimos e máximos para todos os tipos de leite. Ainda, 37 % das amostras apresentaram teores de sódio superiores àqueles declarados na rotulagem, exceto o leite pasteurizado integral. Os teores de sódio foram condizentes com as tabelas de composição de alimentos, exceto quanto ao valor máximo de sódio no leite pasteurizado com 3 % de gordura. Este estudo mostrou a importância da implementação de programas de monitoramento de sódio nestes produtos, assim como para recomendar às autoridades competentes o estabelecimento em dispositivo legal referente aos valores limites de sódio, com vistas à promoção da Saúde Pública.

Palavras-chave. sódio, leite, espectrometria de emissão atômica com plasma de argônio acoplado indutivamente (ICP OES), Saúde Pública.

ABSTRACT

Milk is considered an essential food to the human diet, especially for children; thus, it is crucial to guarantee the product quality, as the sodium contents control. High sodium consumption may afflict the health of population and it may be associated with Chronic Non communicable Diseases. This study aimed at determining the sodium contents in milks consumed in Brazil: whole pasteurized milk, pasteurized with 3 % fat, UHT and powdered milks, by using inductively coupled plasma optical atomic emission spectroscopy technique. The detected averages of sodium contents were higher for UHT milk, and a high variability between minimum and maximum contents was found for all types of milk. Furthermore, 37 % of analyzed samples showed sodium contents higher than those declared on the label, except the whole pasteurized milk. The sodium contents were consistent with the food composition tables, except for the sodium maximum value found in pasteurized milk containing 3 % fat. This study showed the importance of implementing the sodium monitoring programs for these products, and to recommend the establishment of a legal provision concerning the limits of sodium contents to the competent authorities, in view of promoting Public Health.

Keywords. sodium, milk, inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP OES), Public Health.

INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, transformações sociais, como a expansão demográfica e a industrialização, vêm afetando a população, incluindo mudanças no seu padrão de saúde e de hábito alimentar, com maior consumo de alimentos processados, resultando em um novo cenário de problemas relacionados à alimentação, nutrição e saúde¹. Atualmente, o avanço da tecnologia vem oferecendo ao mercado consumidor grande variedade de alimentos industrializados com alto grau de processamento, com características de uso excessivo de açúcar, sódio e gorduras, gerando alimentos com elevada densidade energética²⁻⁴. Assim, uma dieta inadequada destes tipos de alimentos pode estar associada com Doenças Crônicas Não Transmissíveis (DCNT) como hipertensão arterial, enfermidades cardiovasculares, diabetes e obesidade¹⁻⁴. De acordo com o Ministério da Saúde e seguindo a tendência mundial, no Brasil as DCNT são a causa de 72 % das mortes e de 75 % dos gastos com atenção à saúde no Sistema Único de Saúde (SUS)⁵.

Pesquisas nacionais revelam que a alimentação da população brasileira, em todas as faixas etárias, vem apresentando maior participação de produtos altamente processados e menor proporção de alimentos saudáveis como cereais, leguminosas, frutas, hortaliças, leite e derivados, acarretando deficiências em nutrientes e vitaminas. Estes estudos demonstram ainda que estas carências da população podem ser corrigidas melhorando a qualidade da alimentação com a inserção de maior proporção de alimentos saudáveis nas refeições, reduzindo, assim, a participação de produtos processados^{3,6,7}.

Dentro do contexto de promoção da alimentação saudável, o leite é um alimento essencial à dieta humana, principalmente para crianças em seus primeiros anos de vida, sendo considerado como uma das fontes de nutrientes fundamentais para o desenvolvimento e crescimento na infância⁸⁻⁹. A Organização Mundial da Saúde (OMS), recomenda que todas as crianças devem ser amamentadas exclusivamente nos primeiros seis meses de vida, mas esta prática é considerada baixa, correspondendo a 38 %¹⁰. No Brasil, o Ministério da Saúde (MS)¹¹, adota as recomendações da OMS,

onde o aleitamento materno deve ser a primeira prática alimentar dos indivíduos para garantir a saúde e o desenvolvimento adequado das crianças. Em casos excepcionais, o leite de vaca é utilizado como alternativa de baixo custo em substituição ao leite materno, além do uso de suplementos comerciais como fórmulas infantis à base de leite¹²⁻¹⁵.

Segundo dados de Projeções do Agronegócio no Brasil, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), o consumo de leite apresenta possibilidades de crescimento no país, a uma taxa anual de 1,9 % até 2023¹⁶. Ainda, de acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o consumo de leite no país em 2013 foi de 23,6 bilhões de litros, indicando aumento de 5,4 % sobre o volume registrado em 2012¹⁷.

Desta forma, considerando o consumo de leite e seus derivados no país e a perspectiva de ampliação do mercado interno, torna-se imprescindível à garantia da confiabilidade dos parâmetros de identidade e qualidade do produto ofertado à população, bem como daqueles indicativos de contaminação. Dentre os fatores que influenciam a conformidade do padrão do leite consumido no Brasil, o sódio é utilizado como um índice de qualidade. A presença deste nutriente em níveis acima do valor declarado na informação nutricional do produto pode indicar a ocorrência de fraude como, por exemplo, adição de hidróxido de sódio no ajuste do pH durante o processamento do produto¹⁸⁻¹⁹.

Além disso, dietas inadequadas com ingestão de grande quantidade de sódio são fatores de risco à saúde da população, e que podem estar associadas com DCNT como, hipertensão arterial em adultos e crianças, enfermidades cardiovasculares, acidentes cerebrovasculares, diabetes e obesidade^{2-4,20-22}. A OMS preconiza a redução de ingestão de sódio, recomendando o consumo diário máximo de dois gramas para adultos, baseada em evidências relativas entre o consumo do nutriente e as DCNT²³. Para crianças este nível deve ser diminuído tomando-se como base suas necessidades energéticas em relação aos adultos⁵.

O Brasil acompanha o cenário mundial apresentando altos índices de DCNT, sendo que uma das causas pode estar associada ao alto consumo de sódio devido à má alimentação da população²⁴.

Segundo estudo realizado por Sarno et al²⁵, o consumo diário de sódio em domicílios brasileiros mantém-se em níveis duas vezes superiores ao limite recomendado, de modo que diminuir o consumo desse mineral na população infantil e adulta no país pode reduzir os fatores de riscos de diversas enfermidades. Ainda, Araujo et al³ descreve ingestão inadequada e excessiva de sódio de 89 % entre os homens e 70 % entre as mulheres.

Diante o exposto, o presente estudo tem como objetivo a determinação do teor de sódio em diferentes tipos de leites consumidos no Brasil, visando subsidiar as autoridades competentes no estabelecimento de valor limite de sódio, de fundamentar o controle e a fiscalização, bem como recomendar a implementação de programas de monitoramento no país, favorecendo hábitos alimentares mais saudáveis para a população, possibilitando a redução e o controle das taxas das DCNT no Brasil, com vistas à promoção da Saúde Pública.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

Para as avaliações dos teores de sódio foram analisadas 540 amostras de leites consumidos no Brasil, de 90 marcas distintas, coletadas em 18 estados do país (409 amostras da região sudeste, 36 amostras da região central, 45 amostras da região nordeste, 14 amostras da região norte e 36 amostras da região sul), encaminhadas pelo sistema de Vigilância Sanitária para análise no Instituto Adolfo Lutz; e distribuídas em: 10 amostras de leite tipo pasteurizado integral, 75 amostras de leite em pó, 127 amostras de leite tipo UHT e 328 amostras de leite pasteurizado com 3 % de gordura. As amostras foram colhidas e analisadas dentro do prazo de validade dos produtos.

Método analítico

As amostras de leite em pó e de leite fluido (pasteurizado integral, UHT e pasteurizado integral com 3 % de gordura) foram previamente homogeneizadas, não sendo submetidas a qualquer pré-tratamento. As tomadas de ensaio consistiram de 1,2 g para o leite em pó ou de 2,5 mL para o leite fluido, feitas diretamente em frasco erlenmeyer de

125 mL. A seguir, adicionou-se 2,5 mL de ácido clorídrico concentrado, grau analítico (Merck). A digestão das amostras foi efetuada sobre chapa elétrica ajustada na faixa de temperatura entre 100-120 °C, por duas horas. As soluções digeridas foram filtradas em papel de filtro quantitativo, recolhidas em balões volumétricos de 25 mL e o volume foi completado quantitativamente com água ultrapura (Millipore). Dois brancos do reagente foram preparados para cada lote de ensaio.

A curva de calibração foi preparada pela diluição de uma solução padrão de sódio com concentração de 10.000 mg/L (SPEX CertiPrep), em solução de ácido clorídrico, grau analítico (Merck), a 10 % (v/v), para as concentrações de 2,5 – 10,0 – 25,0 – 50,0 – 100,0 mg/L.

Os teores de sódio nas amostras foram determinados em um Espectrômetro de Emissão Atômica com Plasma de Argônio Indutivamente Acoplado (ICP OES), utilizando um equipamento modelo 3000DV, marca Perkin Elmer. As condições instrumentais de operação do equipamento são listadas na Tabela 1. O resultado para cada amostra foi obtido pela média da análise de três replicatas independentes.

Tabela 1. Parâmetros instrumentais e operação do ICP OES

Nebulizador	Cross Flow
Câmara de nebulização	Tipo Scott
Potência de rádio-frequência (W)	1350
Fluxo de nebulização (L/min)	0,85
Fluxo de plasma (L/min)	15
Fluxo de amostra (ml/min)	1,5
Fluxo auxiliar (L/min)	0,5

Validação do método analítico

O método analítico foi validado empregando-se dois Materiais de Referência Certificados (MRC) distintos, obtidos do produtor *National Institute of Standards and Technology* (NIST): RM 8435 Whole Milk Powder e SRM 1549 Non Fat Milk Powder. Para verificar a exatidão (recuperação) e a precisão do método (coeficiente de variação, CV %), foram preparadas e analisadas seis amostras independentes para cada MRC.

Com relação às determinações dos valores de limite de detecção (LD) e de limite de quantificação (LQ), foram realizadas dez preparações independentes do primeiro ponto da curva analítica, com concentração de 2,5 mg/L.

Os valores de limite de detecção e de quantificação foram calculados como três e dez vezes o desvio padrão da média dos resultados das concentrações obtidas para o primeiro ponto da curva analítica, respectivamente. Os parâmetros de exatidão e precisão foram expressos como porcentagem de recuperação e coeficiente de variação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Validação do método analítico

A Tabela 2 apresenta os resultados obtidos para a validação do método analítico para os parâmetros de exatidão, precisão, limite de detecção e limite de quantificação. A análise dos parâmetros de validação do método indicou que os resultados obtidos são adequados para a determinação de sódio nos diferentes tipos de leite e foram concordantes com os valores de referência certificados. Assim, o preparo das amostras utilizando a hidrólise ácida aliada ao emprego da técnica de Espectrometria de Emissão Atômica com Plasma de Argônio Indutivamente Acoplado mostrou ser um procedimento rápido, exato e preciso, permitindo o processamento simultâneo de um número relativamente grande de amostras.

Avaliação dos teores de sódio nos produtos leite fluido e leite em pó

Para a determinação dos teores de sódio em diferentes tipos de leite consumidos pela população brasileira, foram avaliados estatisticamente os dados obtidos e observou-se que os valores médios encontrados não foram estatisticamente equivalentes entre si ($p < 0,05$), de acordo com a análise de variância - ANOVA fator único. As variâncias foram consideradas homogêneas pelo teste de Levene ($p > 0,05$) e os dados seguem uma distribuição aproximadamente normal, com *outliers*. Ainda, segundo o teste de Tukey, ao nível de 5 % de significância, não se rejeita a hipótese de igualdade entre as médias para os tipos de leites em pó e pasteurizado integral ($p > 0,05$).

Para a avaliação dos resultados, é apresentada na Tabela 3 a análise descritiva dos teores de sódio obtidos nos diferentes tipos de leites consumidos no Brasil, a qual se verificou que o leite tipo UHT apresentou maior valor médio para o teor de sódio, seguido pelo leite pasteurizado com 3 % de gordura, leite em pó e leite pasteurizado integral.

A análise dos teores médios de sódio obtidos no presente estudo pode ser considerada concordante com a legislação nacional no que tange à permissão de utilização de aditivos na produção de leite para consumo, pois para os leites dos tipos pasteurizado integral e pasteurizado com 3 % de gordura²⁶ não é permitida a utilização de aditivos e coadjuvantes de tecnologia/elaboração. Para o leite em pó, a legislação aceita como aditivo

Tabela 2. Parâmetros de validação do método analítico para determinação de sódio em leite: limite de detecção, limite de quantificação, exatidão e precisão

Material de Referência Certificado	Valor Certificado mg/kg	Exatidão (% Recuperação) mg/kg	Precisão (CV %) mg/kg	LD mg/L	LQ mg/L
NIST 8435	3560 ± 400	3670 (103,1 %)	98 (2,7 %)	0,18	0,61
NIST 1549	4970 ± 100	5139 (103,4 %)	232 (4,5 %)		

LD: limite de detecção; LQ: limite de quantificação; CV: coeficiente de variação, expresso em porcentagem

e coadjuvante de tecnologia/elaboração unicamente a lecitina como emulsionante para a elaboração de leites instantâneos, e como antiuementante, para a utilização restrita ao leite em pó²⁷. Já para o leite tipo UHT, a legislação permite o emprego de sais de sódio (citrato de sódio; monofosfato, difosfato e trifosfato de sódio) como aditivos e coadjuvantes de tecnologia/elaboração, separados ou em combinação, em quantidade não superior a 0,1 g/100 mL expressos em P_2O_5 ²⁸. Assim, como somente para o leite tipo UHT é permitida a utilização de sais à base de sódio, torna-se coerente o valor médio superior de sódio obtido quando comparado aos demais tipos de leite analisados (Tabela 3).

O estudo demonstrou grande variabilidade dos resultados obtidos entre os teores mínimo e máximo de sódio nos diferentes tipos de leite (Tabela 3), nas faixas de 21 % para o leite pasteurizado integral, 289 % para o leite tipo UHT, 133 % para o leite em pó e 170 % para o leite pasteurizado com 3 % de gordura. Devido à escassez de resultados analíticos na literatura, não foi possível a comparação de teores de sódio nestes tipos de produtos. Ainda, esta variabilidade aponta para a falta de controle de qualidade para o parâmetro sódio em leites comercializados no país. Este fato evidencia a importância da apresentação dos dados obtidos, visando à promoção da Saúde Pública no país.

A análise da Tabela 3 apontou também para a variação ocorrida quando da avaliação entre os valores declarados de sódio na rotulagem dos produtos e os resultados analíticos obtidos. Assim,

do total de 540 amostras analisadas, verificou-se que 202 amostras (37 %) apresentaram teor de sódio acima dos valores declarados nos rótulos pelos produtores, distribuídas em: 12 % para o leite em pó, 37 % para o leite tipo UHT e 44 % para o leite pasteurizado integral com 3 % de gordura. Somente para o leite pasteurizado integral os valores obtidos foram concordantes com aqueles declarados em rotulagem. Buzzo et al¹⁸ avaliaram os teores de sódio em leites comercializados no município de São Paulo, e indicaram que a maioria das amostras de leite tipo UHT e de leite pasteurizado estavam em desacordo com a informação nutricional declarada no rótulo, bem como com dados publicados nas tabelas de composição de alimentos, evidenciando resultados semelhantes encontrados no presente estudo.

Por outro lado, a comparação realizada entre os valores de sódio mínimo e máximo obtidos com aqueles prescritos em tabelas de composição de alimentos nacionais e internacionais (Tabela 4), mostrou que os teores são compatíveis para os leites dos tipos: integral pasteurizado, UHT e em pó. A análise indica que, no caso do leite pasteurizado com 3 % de gordura, o valor máximo de sódio obtido é muito superior aos demais informados nas tabelas de composição de alimentos, salientando que não é permitida a utilização de aditivos e coadjuvantes de tecnologia/elaboração para este tipo de leite²⁶. Este fato aponta mais uma vez para a carência de controle de qualidade para o parâmetro sódio em leites consumidos pela população.

Tabela 3. Análise descritiva dos teores de sódio obtidos nos diferentes tipos de leite analisados e consumidos no Brasil

Tipo de leite	N	Média ± DP	Mediana	Valor mínimo	Valor máximo
Pó	75	87 ± 16	86	63	147
UHT	127	109 ± 21	109	44	171
Pasteurizado integral	10	74 ± 5	76	67	81
Pasteurizado com 3% de gordura	328	99 ± 21	94	44	186

N: número de amostras analisadas; DP: desvio padrão; *: unidade equivalente para consumo de um copo (200 mL)

Tabela 4. Teores de sódio em leite de vaca de tabelas de composição de alimentos e valores mínimos e máximos obtidos no presente estudo (Lab)

Tipo de leite	Sódio (mg/100 g)								
	TACO ²⁹	IBGE ³⁰	UNIFESP ³¹	INSA ³²	Souci ³³	Philippi ³⁴	Pacheco ³⁵	Bowes ³⁶	Lab
Pó	323 – 432	320 – 549	–	345 – 524	–	365 – 470	400 – 657	372	241,9 – 544,7
UHT	51	–	–	41 – 43	48	62,5 – 105	38,8 – 69,4	–	21,3 – 82,9
Past. integral	64	40 – 44	–	–	48	45	40 – 98,2	41 – 44	32,5 – 39,3
Past. 3 % gordura	–	–	43 – 49	43	45	–	43,6 – 53,3	40,2	33,5 – 90,2

No Reino Unido, Mhurchu et al³⁷ estimaram o teor de sódio de grande número de alimentos processados, distribuídos em mais de 44.000 produtos, e concluíram que, além do sal de mesa, mais de 37 % do sódio consumido pela população encontra-se presente em cinco categorias: bacon, pão, leite, queijo e molhos. Assim, o valor médio de sódio em leite obtido pelos pesquisadores de 64 mg/100 g é compatível com aqueles encontrados no presente estudo. Na Itália, Manzi et al³⁸ analisaram o conteúdo de sódio em diferentes tipos de leite (integral, UHT semidesnatado, pasteurizado e microfiltrado), e encontraram valores mínimo e máximo na faixa entre 36,4 e 51,9 mg/100 g. Valores semelhantes foram encontrados no presente estudo, considerando os teores mínimos de sódio para os leites UHT, e pasteurizado com 3 % de gordura, bem como para os teores mínimo e máximo de sódio no caso do leite pasteurizado integral. Com relação ao teor de sódio máximo para os demais tipos de leite, os valores ultrapassaram àquele descrito pelos autores (Tabela 4).

Atualmente, a OMS preconiza um consumo máximo diário de dois gramas de sódio para adultos, sendo ainda recomendada a redução desta ingestão. Ainda, segundo a OMS, no caso de crianças, a ingestão de sódio deve ser diminuída, tomando-se como base suas necessidades energéticas em relação aos adultos²³. Países como Canadá³⁹ e Austrália⁴⁰ adotam valores restritivos

para ingestão diária de sódio por crianças de 7 a 12 meses, recomendando o consumo máximo de 370 e 120 mg, respectivamente. Assim, considerando o valor máximo de sódio obtido neste estudo, para o leite pasteurizado com 3 % de gordura (186 mg/200 mL), observa-se que o consumo de um copo (200 mL) por uma criança de 7 a 12 meses já ultrapassaria a ingestão diária recomendada pelo organismo de saúde da Austrália. Portanto, esta ingestão de sódio deve ser considerada no Brasil, visto que o leite de vaca e os suplementos comerciais com fórmulas infantis à base de leite¹²⁻¹⁵ são utilizados como alternativa em substituição ao leite materno.

Desta forma, com base no exposto, os resultados revelam a importância da implementação e manutenção de programas de monitoramento de alimentos no país, fornecendo uma ferramenta para auxiliar as indústrias produtoras a se adequarem no controle dos teores de sódio nos produtos industrializados. Atualmente, o Brasil apresenta altos índices de DCNT²⁴, sendo que uma das causas pode estar associada ao alto consumo de sódio da população³. Além disso, o presente estudo visa recomendar às autoridades competentes o estabelecimento em dispositivo legal de valores restritivos de sódio nestes tipos de leites, visando garantir e oferecer alimentos mais saudáveis à população, com vistas à promoção da Saúde Pública.

CONCLUSÃO

De forma geral, a avaliação de sódio em diferentes tipos de leite consumidos pela população brasileira (pasteurizado integral, pasteurizado com 3 % de gordura, UHT e em pó), demonstrou que: o leite UHT apresentou teor de sódio superior aos demais; houve variabilidade entre os teores mínimo e máximo para todos os tipos de leite; e 37 % das amostras apresentaram teores de sódio superiores àqueles declarados na rotulagem, exceto para o leite pasteurizado integral.

Portanto, os resultados obtidos revelam a importância do estabelecimento de política em dispositivo legal para valores limites de sódio nos processamentos destes tipos de leite, bem como a implantação e manutenção de programas de monitoramento de alimentos no país, visando fundamentar o controle e a fiscalização destes produtos, garantindo a oferta de alimentos mais saudáveis para o consumo da população brasileira, com vistas à promoção da Saúde Pública.

REFERÊNCIAS

1. Política Nacional de Alimentação e Nutrição – PNNAN. Ministério da Saúde. [acesso 2013 Jun 21]. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/2d_081111.pdf].
2. Veiga GV, Costa RS, Araujo MC, Souza AM, Bezerra IN, Barbosa FS. Inadequação do consumo de nutrientes entre adolescentes brasileiros. *Rev Saúde Pública*. 2013; 47(1 Supl): 212S-21S. doi: 10.1590/S0034-89102013000700007.
3. Araujo MC, Bezerra IN, Barbosa FS, Junger WL, Yokoo EM, Pereira RA, et al. Consumo de macronutrientes e ingestão inadequada de micronutrientes em adultos. *Rev Saúde Pública*. 2013; 47(1 Supl): 177S-89S. doi: 10.1590/S0034-89102013000700004.
4. Verly Jr. E, Carvalho AM, Fisberg RM, Marchioni DML. Adesão ao guia alimentar para população brasileira. *Rev Saúde Pública*. 2013; 47(6): 1021-7. doi: 10.1590/S0034-8910.2013047004637.
5. Brasil. Ministério da Saúde. Doenças crônicas não transmissíveis. [acesso 2013 Jun 21]. Disponível em: [http://www.portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31877&janela=1].
6. Lima FEL, RM, Uchimura KY, Picheth T. Programa Bolsa-Família: qualidade da dieta de população adulta do município de Curitiba, PR. *Rev Bras Epidemiol*. 2013; 16(1): 58-67. doi: 10.1590/S1415-790X2013000100006.
7. Pereira LM, Vieira ALS, Horta PM, Santos LC. Fracionamento da dieta e o perfil nutricional e de saúde de mulheres. *Rev Nutr*. 2014; 27(1): 15-23. doi: 10.1590/1415-52732014000100002.
8. Bortolini GA, Vitolo MR, Gubert MB, Santos LMP. Early cow's milk consumption among Brazilian children: results of a national survey. *J Pediatr*. 2013; 89(6): 608-13. doi: 10.1016/j.jpeds.2013.04.003
9. Vieira MEB, Linhares MBM. Developmental outcomes and quality of life in children born preterm at preschool- and school-age. *J Pediatr*. 2011; 87(4): 281-91. doi: 10.2223/JPED.2096
10. World Health Organization – WHO. Country implementation of the International Code of Marketing of Breast-milk Substitutes: Status report 2011. Geneva, 2013 (revisado). 60 p. [acesso 2014 Mai 06]. Disponível em: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/85621/1/9789241505987_eng.pdf?ua=1].
11. Ministério da Saúde – MS. Saúde da criança: Nutrição infantil. Aleitamento materno e alimentação complementar. Caderno de Atenção Básica, nº 23. 2009. Brasília, DF. [acesso 2013 Jun 21]. Disponível em: [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/saude_crianca_nutricao_aleitamento_alimentacao.pdf].
12. Thomaz DMC, Serafim PO, Palhares DB, Melnikov P, Venhofen L, Vargas MOF. Comparison between homologous human milk supplements and a commercial supplement for very low birth weight infants. *J Pediatr*. 2012; 88(2): 119-24. doi: 10.2223/JPED.2166
13. Morgado CMC, Werneck GL, Hasselmann MH. Rede e apoio social e práticas alimentares de crianças no quarto mês de vida. *Ciênc Saúde Coletiva*. 2013; 18(2):367-76. http://dx.doi.org/10.1590/S1413-81232013000200008
14. Saldiva SRDM, Venancio SI, Gouveia AGC, Castro ALS, Escuder MML, Giugliani ERJ. Influência regional no consumo precoce de alimentos diferentes do leite materno em menores de seis meses residentes nas capitais brasileiras e Distrito Federal. *Cad Saúde Pública*. 2011; 27(11): 2253-62. http://dx.doi.org/10.1590/S0102-311X2011001100018
15. Souza FIS, Caetano MC, Ortiz TT, Silva SGL, Sarni ROS. Complementary feeding of infants in their first year of life: focus on the main pureed baby foods. *Rev Assoc Med Bras*. 2014; 60(3): 231-5. http://dx.doi.org/10.1590/1806-9282.60.03.011

16. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. Projeções do agronegócio – Brasil 2012/13 a 2022/23 – Projeções de longo prazo. [acesso 2014 Mai 06]. Disponível em: [http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/projecoes %20- %20versao %20atualizada.pdf].
17. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. Indicadores IBGE - Estatística da Produção Pecuária/ Março de 2014. [acesso 2014 Mai 06]. Disponível em: [http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos_201304_publ_completa.pdf].
18. Buzzo ML, Costa AR, Polatto R, Matsuzaki R. Avaliação de sódio em diferentes tipos de leite comercializados no município de São Paulo, Brasil. *Bol Inst Adolfo Lutz*. 2008; 18(1/2): 23-4.
19. Botelho BG, Reis N, Oliveira LS, Sena MM. Development and analytical validation of a screening method for simultaneous detection of five adulterants in raw milk using mid-infrared spectroscopy and PLS-DA. *Food Chem*. 2015; 181: 31-7. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.02.077
20. Departamento de Hipertensão Arterial da Sociedade Brasileira de Cardiologia. I posicionamento brasileiro sobre hipertensão arterial resistente. *Arq Bras Cardiol*. 2012; 99(1): 576-85. <http://dx.doi.org/10.1590/S0066-782X2012001000002>
21. Costa FP, Machado SH. O consumo de alimentos ricos em sódio pode influenciar na pressão arterial das crianças? *Ciênc Saúde Coletiva*. 2010; 15(Supl. 1): 1383-9. <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-81232010000700048>
22. Nishimura RY, Damião R, Gimeno SGA, Ferreira SRG, Sartorelli DS. Grupos de alimentos para investigação de risco para diabetes tipo 2 e doenças associadas. *Rev Bras Epidemiol*. 2011; 14(3): 531-6. <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-790X2011000300017>
23. World Health Organization – WHO. Guidelines: Sodium intake for adults and children. 2012. [acesso 2013 Jun 21]. Disponível em: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/77985/1/9789241504836_eng.pdf].
24. Ministério da Saúde – MS. Ministério lança política nacional de promoção da saúde. 2014. [acesso 2014 Nov 11]. Disponível em: [http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/profissional-e-gestor/principal/noticias/15241-ministerio-lanca-politica-nacional-de-promocao-da-saude].
25. Sarno F, Claro RM, Levy RB, Bandoni DH, Monteiro CA. Estimativa de consumo de sódio pela população brasileira, 2008-2009. *Rev Saúde Pública*. 2013; 47(3): 571-8. <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-89102009005000002>.
26. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62, de 29 de dezembro de 2011. Aprova o regulamento técnico de produção, identidade e qualidade do leite tipo A, regulamento técnico de identidade e qualidade de leite cru refrigerado, o regulamento técnico de identidade e qualidade de leite pasteurizado e o regulamento técnico da coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel, em conformidade com os Anexos desta Instrução Normativa. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF. 30 dez. 2011. Seção 1. [acesso 2014 Nov 30]. Disponível em: [http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal].
27. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 146, de 07 de março de 1996. Aprova os regulamentos técnicos de identidade e qualidade dos produtos lácteos (leite em pó). Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF. 11/03/1996. Seção 1, pág. 3977. [acesso 2014 Nov 30]. Disponível em: [http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=1218].
28. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 370, de 04 de setembro de 1997. Aprova a inclusão do citrato de sódio no regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade do leite U.H.T. (U.A.T.). Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF. 08/09/1997. [acesso 2014 Nov 30]. Disponível em: [http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal].
29. Tabela Brasileira de Composição de Alimentos – TACO. Universidade de Campinas (UNICAMP). 4ª edição. 2011. [acesso 2014 Out 21]. Disponível em: [http://www.unicamp.br/nepa/taco/tabela.php?ativo=tabela].
30. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. Pesquisa de Orçamentos Familiares. [acesso 2014 Out 21]. Disponível em: [http://www.ibge.gov.br/home/xml/pof_2008_2009.shtm].
31. Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP. Tabela química de composição de alimentos. 2013. [acesso 2014 Out 21]. Disponível em: [http://www2.unifesp.br/dis/servicos/nutri/public/].
32. Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge – INSA. Tabela de composição de alimentos. 2006. [acesso 2014 Out 21]. Disponível em: [http://www.insa.pt/sites/INSA/Portugues/AreasCientificas/AlimentNutricao/AplicacoesOnline/TabelaAlimentos/Paginas/TabelaAlimentos.aspx].
33. Souci SW, Fachmann W, Kraut H. Food composition and nutrition tables. Seventh edition. 2008. Medpharm Scientific Publishers. Ed. Taylor & Francis. Germany. 1364p.

34. Philippi ST. Tabela de Composição de Alimentos- Suporte para decisão nutricional. 4ª edição. 2013. São Paulo: Manole Ltda. 164p.
35. Pacheco M. Tabela de equivalentes, medidas caseiras e composição química dos alimentos. 2ª edição. 2011. Editora Rubio Ltda. Rio de Janeiro. 669p.
36. Pennington JAT, Spungen J. Bowes & Church's food values of portions commonly used. Nineteenth edition. 2010. Ed.: Lippincott Williams & Wilkins. Baltimore, USA. 425p.
37. Mhurchu CN, Capelin C, Dunford EK, Webster JL, Neal BC, Jebb SA. Sodium content of processed foods in the United Kingdom: analysis of 44,000 foods purchased by 21,000 households. *Am J Clin Nutr*. 2011; 93(3) :594-600. doi: 10.3945/ajcn.110.004481
38. Manzi P, Di Costanzo MG, Mattera M. Updating nutritional data and evaluation of technological parameters of italian milk. *Foods*. 2013; 2(2) :254-73. doi:10.3390/foods2020254
39. Health Canadá. Dietary Reference Intakes - Reference Values for Elements. [acesso 2015 Mar 18]. Disponível em: [http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/nutrition/reference/table/ref_elements_tbl-eng.php].
40. Australian Government/National Health and Medical Research Council. Ministry of Healthy. Nutrient Reference Values for Australia and New Zealand - Sodium. [acesso 2015 Mar 18]. Disponível em: [<https://www.nrv.gov.au/nutrients/sodium>].

Detecção de fraude em amostras comerciais de queijo bubalino por adição de leite bovino por meio da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) *multiplex*

Detection of fraud of cow milk addition into the commercially available buffalo cheese samples by *multiplex* Polymerase Chain Reaction (PCR)

RIALA6/1633

Cleyzer Lopes SILVA¹, Gustavo Aguiar SALES¹, José Gatinho dos SANTOS NETO¹, Jacqueline da Silva e SILVA², Ana Paula de Souza Stori DE LARA³, Suely Cristina Gomes de LIMA⁴, Fábio Pereira Leivas LEITE⁵, Emília do Socorro Conceição de Lima NUNES¹, Carla Cristina Guimarães de MORAES², Talita Bandeira ROOS¹, Carina Martins de MORAES^{1*}

*Endereço para correspondência: ¹Laboratório de Higiene e Qualidade de Alimentos e Laboratório de Microbiologia, Instituto de Medicina Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Pará (UFPA), Campus Castanhal, BR 316, Km 62, Bairro Saudade, Castanhal, PA, Brasil, CEP: 68740-970. Tel: (91) 3711-4723. E-mail: carinamoraes@ufpa.br.

²Laboratório de Zoonoses e Saúde Pública, Instituto de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Pará (UFPA), Campus Castanhal

³Laboratório de Imunologia e Parasitologia Molecular, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas (UFPEL)

⁴Laticínio Escola, Instituto de Educação Tecnológica do Estado do Pará (IFPA), Campus Castanhal

⁵Laboratório de Bacteriologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec), Faculdade de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas (UFPEL)

Recebido: 26.09.2014 - Aceito para publicação: 27.03.2015

RESUMO

No presente estudo foi verificada a eficiência da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) *multiplex* para detecção de fraude por adição de leite bovino em queijo de búfala, e para identificar amostras de queijo fraudadas no comércio de municípios dos estados do Pará e Amapá. Os queijos de búfala contendo 10 %, 25 %, 50 %, 75 % e 90 % de leite bovino foram produzidos, bem como os queijos exclusivamente de vaca e búfala (controles). Essas amostras foram analisadas por meio de Reação em Cadeia da Polimerase. Posteriormente, 44 amostras de queijos bubalinos foram coletadas na região alvo do estudo e a PCR *multiplex* foi novamente utilizada, visando à detecção de fraude. Os resultados obtidos demonstraram que os iniciadores utilizados neste trabalho foram capazes de detectar o incremento de todas as percentagens de leite de vaca nos queijos de búfala experimentalmente fraudados, e que 13,6 % das amostras comercialmente disponíveis continham leite bovino. PCR *multiplex* é uma técnica capaz de detectar adição de valores a partir de 10 % de leite bovino não declarado na rotulagem de queijo de búfala, e este tipo de fraude foi encontrado nas amostras comercializadas nos municípios do Amapá e Pará, Brasil.

Palavras-chave. queijo de búfala, fraude, PCR *multiplex*.

ABSTRACT

This study aimed at verifying the efficiency of the technique of *multiplex* Polymerase Chain Reaction (PCR) for detecting the fraud by adding bovine milk into cheese samples made from buffalo milk, and to identify the fraudulent cheeses samples marketed in the municipalities of Pará and Amapá. The buffalo cheeses samples containing 10 %, 25 %, 50 %, 75 % and 90 % of bovine milk were experimentally produced; and also the cheeses made from the cow and the buffalo milk were separately prepared as controls. The analysis of these samples was performed by *multiplex* Polymerase Chain Reaction. Subsequently, 44 samples of buffalo cheeses were collected from the study target region, and they were analyzed by PCR for detecting the fraudulent specimens. The primers used in this study showed actual performance for detecting all of the increasing percentages of cow milk experimentally added into buffalo cheeses; also it indicated that 13.6 % of these marketed samples contained bovine milk. It was concluded that the *multiplex* PCR is a suitable technique for detecting the fraud from the concentration of 10 % bovine milk added into buffalo cheese.

Keywords. buffalo cheese, fraud, *multiplex* PCR.

INTRODUÇÃO

De acordo com o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária dos Produtos de Origem Animal – RIISPOA, entende-se por leite, sem outra especificação, o produto oriundo da ordenha completa, ininterrupta, em condições de higiene, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas. O leite de outros animais deve denominar-se segundo a espécie de que procede¹.

O leite de búfala quando comparado ao leite de vaca oferece vantagens nutricionais, como maiores teores em sólidos totais, gordura, proteína, cálcio e fósforo² e, por isso, este produto tem grande importância tanto para o consumo *in natura* quanto para elaboração de seus derivados, principalmente o queijo. Porém, por se tratar de um produto disponível em pequenas quantidades em vários países do mundo, fraudes e adulterações por adição de matérias primas com maior disponibilidade e/ou custo mais baixo são frequentemente descritas³.

Dentre as fraudes mais comumente relatadas, a mistura de leite bovino ao leite bubalino é a mais frequente. Por esta razão, além da avaliação da qualidade organoléptica, microbiológica e físico-química do leite, se torna necessário que métodos eficazes sejam empregados para detecção de fraudes⁴, que podem lesar os consumidores em relação aos valores agregados ao produto⁵ e acarretar riscos indiretos a saúde pública, como reações alérgicas.

Vários autores relatam técnicas eficientes para a detecção de possíveis fraudes em leite de diferentes espécies e seus derivados^{3,4}. Os principais métodos mencionados na literatura baseiam-se na análise das proteínas do leite e, dentre os métodos baseados na análise de DNA, a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é considerada uma importante ferramenta a ser estudada. Tais métodos são capazes de identificar as diferenças entre os produtos analisados e quantificar a mistura de leite de diferentes espécies^{3,5}.

No Brasil, autores relatam a utilização de *Real Time* PCR para a identificação e quantificação de material bovino em derivados lácteos e carnes bubalinos³. Porém, embora os referidos pesquisadores tenham comprovado a eficiência da técnica, poucos trabalhos tem demonstrado

a presença de fraude em produtos bubalinos comercializados no Brasil e, em especial, na região Norte, que dispõe do maior rebanho de búfalos do país, segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE)⁶.

Por esta razão, o presente trabalho tem por objetivo verificar a eficiência da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase *multiplex* para detecção de fraude por adição de leite bovino em queijo de búfala e determinar a detecção de fraude acima de 10 % de adição pela referida técnica, através da produção de queijos experimentalmente fraudados contendo diferentes percentagens de leite bovino.

MATERIAL E MÉTODOS

Visando a determinação de fraude por incremento de leite bovino através da técnica de PCR *multiplex*, 5 queijos bubalinos fraudados experimentalmente (um queijo para cada proporção) foram fabricados, em triplicata, no Laticínio Escola do Instituto Federal de Educação Tecnológica do estado do Pará (IFPA) – Campus Castanhal, através da adição de 10 %, 25 %, 50 %, 75 % e 90 % de leite de vaca e queijos exclusivamente a base de leite de vaca e búfala foram produzidos para serem usados como controle. Para a fabricação dos queijos, primeiramente as misturas de leite foram pasteurizadas separadamente a temperatura de 72 °C, durante 15 segundos. Posteriormente as proporções de leite previamente pasteurizadas foram resfriadas até atingirem a temperatura de 35 °C e transferidas para um tanque apropriado, onde foi adicionado cloreto de cálcio na proporção 40 mL para cada 100 L de leite e 20 mL de coalho, seguindo o prescrito pelo fabricante da enzima. Após, as massas para fabricação dos queijos permaneceram em repouso por 45 minutos. Passado este período, com o auxílio de liras, iniciou-se o corte vertical e horizontal da coalhada e foi realizada a homogeneização da massa durante 25 minutos, visando facilitar a eliminação do soro. Após este processo, parte do soro liberado foi descartado e cloreto de sódio (10 mg/L) foi adicionado à massa. A massa salgada foi novamente homogeneizada e o soro remanescente foi eliminado. Posteriormente a enformagem da coalhada foi realizada e os queijos foram prensados

na própria forma até que o soro residual fosse eliminado. Após a enformagem, os produtos foram acondicionados na câmara de refrigeração a 4 °C, onde ficaram por 24 horas.

Para a identificação de fraude em queijos comercializados nas regiões norte e nordeste do estado do Pará e em Macapá, capital do estado do Amapá, foram coletadas 44 amostras de 500 g cada de diferentes tipos de queijos de búfala disponíveis comercialmente de maneira formal ou informal. Destas, 9 foram adquiridas no município de Belém (PA), 7 no município de Castanhal (PA), 1 no município de Moju (PA), 1 no município de Bujarú, 22 na Ilha do Marajó (PA) e 4 em Macapá (AP). Tanto os queijos fraudados experimentalmente quanto as amostras obtidas em diferentes estabelecimentos comerciais foram transportadas em caixas isotérmicas e mantidas em refrigeração até o encaminhamento ao Laboratório de Higiene e Qualidade de Alimentos da UFPA, onde foram realizadas a extração de DNA e as reações de PCR *multiplex* em triplicata, através da colheita de diferentes frações de cada amostra.

Para a realização da PCR *multiplex*, DNA das amostras foi extraído, segundo protocolo sugerido anteriormente por Darwish et al⁷ com modificações, sendo as alterações realizadas na etapa inicial do protocolo, onde frações de 0,5 g de queijo foram umedecidas e maceradas com 1000 µL de tampão de lise STES (0,2 M de Tris base, 0,5 M de cloreto de sódio, 0,1 % de Dodecil Sulfato de Sódio e 0,01 M de Ácido Etilenodiamino Tetraacético). Posteriormente o material foi agitado em agitador orbital e incubado em banho-maria a 55 °C, durante a noite, com 10 µL de proteinase K (20 mg/mL). O restante do processamento das amostras foi realizado de acordo com o protocolo original⁵, sendo o DNA extraído eluído em 200 µL tampão TRIS-EDTA (TE), pH 8,0. As amostras de DNA obtidas foram então submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1 % para avaliação, que foi realizada sobre luz ultravioleta e com auxílio do Software Total Lab. TL 100v. 2006, após o gel ter sido banhado em cuba contendo brometo de etídeo na concentração de 5 µg/mL, durante 40 min.

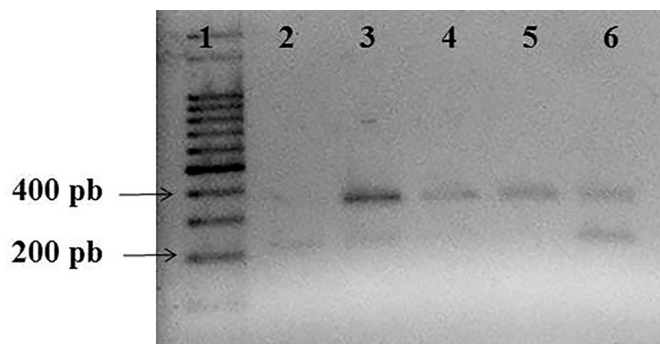
Para a execução da referida técnica foram utilizados *primers* que amplificam sequências do RNA ribossomal mitocondrial

12S específicos para búfala (*Primer reverse* 5' TTCATAATAACTTTTCGTGTTGTTGGGTGT 3'), para vaca (*Primer reverse* 5' AAATAGGGTTAGATGCACTGAATCCAT 3') e *primers* que amplificam sequências comuns as duas espécies (*Primer forward* 5'CTAGAGGAGCCTGTTCTATAATCGATA 3'), descritos previamente por Lopez-Calleja et al⁸. Os *primers* amplificam fragmentos de 220 pares de base (pb) para DNA de búfala e fragmentos de 346pb para DNA de vaca e foram preparados de acordo com a instrução do fabricante (Ludwing Biotec[®]), sendo diluídos em TE pH 8,0, até a concentração de 100 pmol/µL. Solução para PCR foi calculada para o volume final de 25 µL para cada reação, sendo utilizadas as seguintes concentrações dos reagentes: 50 mM de KCl e 10 mM Tris-HCl (tampão 1X) , 10 mM DNTP *mix*, aproximadamente 50 ng de DNA molde, 1U Taq DNA Polimerase e 10 pmol de cada *primer*, sendo o volume completado com água Milli-Q esterilizada. Posteriormente, a reação de PCR foi realizada em termociclador (Biocycler[®] MJ96G) durante 30 ciclos, com etapas de desnaturação, anelamento e extensão de 93 °C/30 s, 56 °C/30 s e 72 °C/30 s respectivamente, desnaturação inicial de 93 °C por 3 min e extensão final de 72°C por 10min, sendo os *amplicons* obtidos submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5 %, visualizada sobre luz ultravioleta com auxílio do Software Total Lab. TL 100v. 2006, após banho em brometo de etídeo (5 µg/mL), durante 40 min.

Os resultados da determinação de fraude nas amostras comerciais foram apresentados através de estatística descritiva.

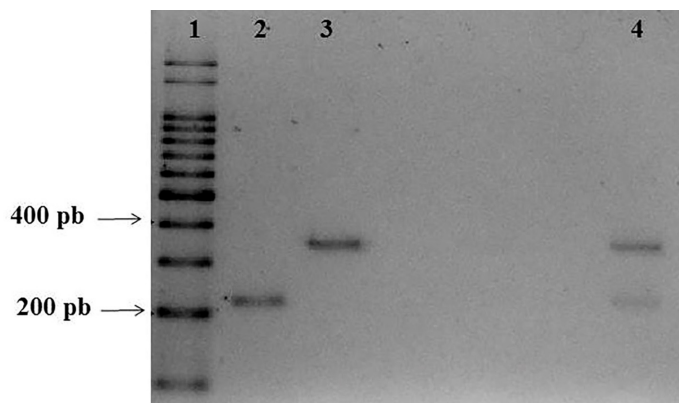
RESULTADOS

A Figura 1 demonstra os resultados obtidos a partir da PCR *multiplex* realizada em amostras de queijo experimentalmente fraudados. Já a Figura 2 demonstra os controles utilizados (queijos exclusivamente fabricados com leite de vaca e búfala) e a presença de uma das seis fraudes detectadas em amostras de queijo adquiridas no comércio da região alvo do estudo, durante a execução do trabalho.



1: marcador molecular 1 kb; 2: queijo contendo 10 % de leite bovino; 3: queijo contendo 25 % de leite bovino; 4: queijo contendo 50 % de leite bovino; 5: queijo contendo 75 % de leite bovino; 6: queijo contendo 90 % de leite bovino

Figura 1. Gel de agarose 1,5 % demonstrando a presença fragmentos de DNA bovino (346 pb) e bubalino (220 pb) obtidos através de PCR *multiplex* realizada a partir de amostras de queijos de búfala experimentalmente fraudados com diferentes percentagens de leite bovino



1: marcador de peso molecular molecular 1kb; 2: queijo produzido com 100 % de leite bubalino; 3: queijo produzido com 100 % de leite bovino; 4: queijo de búfala adquirido comercialmente apresentando bandas correspondentes a presença de DNA bovino e bubalino

Figura 2. Gel de agarose 1,5 % demonstrando a presença fragmentos de DNA bovino (346 pb) e/ou bubalino (220 pb) obtidos através de PCR *multiplex* realizada a partir de amostras de queijos fabricados exclusivamente com leite bovino e bubalino (controles) e em uma amostra adquirida comercialmente

A Tabela 1 demonstra os dados obtidos a partir da coleta e análise de queijos bubalinos comercializados na área alvo do estudo.

Os resultados demonstraram que a PCR *multiplex* proposta foi capaz de detectar leite de vaca nos queijos bubalinos fraudados experimentalmente e que, das 44 amostras comerciais de queijos bubalino analisadas, 6 (13,63 %) apresentaram incremento de leite bovino, sendo 5 (11,36 %) destas amostras provenientes da Ilha do Marajó (PA)

e 1 (2,27 %) proveniente do município de Macapá(AP). As amostras fraudadas adquiridas na Ilha do Marajó eram provenientes do comércio de ambulantes e a amostra de Macapá foi coletada em uma feira-livre do município. Os dados aqui demonstrados não descartam a possibilidade de que os queijos considerados não fraudados neste trabalho apresentem quantidades inferiores a 10 % de leite bovino, visto que esta foi a percentagem mínima testada como referência no presente artigo.

Tabela 1. Resultados obtidos a partir da coleta e análise através de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) *multiplex* para a detecção de fraude de amostras de queijos de búfala comercializados em municípios dos estados do Pará e Amapá, Brasil

IDENTIFICAÇÃO DA AMOSTRA	LOCAL DE ORIGEM	TIPO DE QUEIJO	RESULTADO DA PCR
LHQA1	Ilha do Marajo, PA	Marajó tipo creme	Detecção de DNA bubalino
LHQA2	Ilha do Marajo, PA	Marajó tipo creme	Detecção de DNA bubalino
LHQA3	Ilha do Marajo, PA	Marajó tipo creme	Detecção de DNA bubalino
LHQA4	Ilha do Marajo, PA	Marajó tipo creme	Detecção de DNA bubalino
LHQA5	Ilha do Marajo, PA	Marajó tipo creme	Detecção de DNA bubalino
LHQA6	Ilha do Marajo, PA	Marajó tipo creme	Detecção de DNA bubalino
LHQA7	Ilha do Marajo, PA	Marajó tipo creme	Detecção de DNA bubalino
LHQA8	Ilha do Marajo, PA	Marajó tipo creme	Detecção de DNA bubalino
LHQA9	Ilha do Marajo, PA	Marajó tipo creme	Detecção de DNA bubalino
LHQA10	Ilha do Marajo, PA	Marajó tipo creme	Detecção de DNA bubalino e bovino
LHQA11	Ilha do Marajo, PA	Marajó tipo creme	Detecção de DNA bubalino e bovino
LHQA12	Ilha do Marajo, PA	Marajó tipo creme	Detecção de DNA bubalino e bovino
LHQA13	Belém, PA	Marajó tipo manteiga	Detecção de DNA bubalino
LHQA14	Belém, PA	Coaho	Detecção de DNA bubalino
LHQA15	Belém, PA	Ricota	Detecção de DNA bubalino
LHQA16	Belém, PA	Muçarela	Detecção de DNA bubalino
LHQA17	Belém, PA	Muçarela	Detecção de DNA bubalino
LHQA18	Castanhal, PA	Ricota	Detecção de DNA bubalino
LHQA19	Castanhal, PA	Ricota	Detecção de DNA bubalino
LHQA20	Castanhal, PA	Coalho	Detecção de DNA bubalino
LHQA21	Castanhal, PA	Coalho	Detecção de DNA bubalino
LHQA22	Castanhal, PA	Muçarela	Detecção de DNA bubalino
LHQA23	Ilha do Marajó, PA	Marajó tipo creme	Detecção de DNA bubalino e bovino
LHQA24	Ilha do Marajó, PA	Marajó tipo creme	Detecção de DNA bubalino e bovino
LHQA25	Ilha do Marajó, PA	Marajó tipo creme	Detecção de DNA bubalino
LHQA26	Ilha do Marajó, PA	Marajó tipo creme	Detecção de DNA bubalino
LHQA27	Ilha do Marajó, PA	Marajó tipo creme	Detecção de DNA bubalino
LHQA28	Belém, PA	Tipo Minas Frescal	Detecção de DNA bubalino
LHQA29	Belém, PA	Tipo Minas Frescal	Detecção de DNA bubalino
LHQA30	Belém, PA	Muçarela	Detecção de DNA bubalino
LHQA31	Belém, PA	Frescal	Detecção de DNA bubalino
LHQA32	Castanhal, PA	Muçarela	Detecção de DNA bubalino
LHQA33	Castanhal, PA	Muçarela	Detecção de DNA bubalino
LHQA34	Moju, PA	Frescal	Detecção de DNA bubalino
LHQA35	Ilha do Marajó, PA	Marajó tipo creme	Detecção de DNA bubalino
LHQA36	Ilha do Marajó, PA	Marajó tipo creme	Detecção de DNA bubalino
LHQA37	Ilha do Marajó, PA	Marajó tipo creme	Detecção de DNA bubalino
LHQA38	Ilha do Marajó, PA	Marajó tipo creme	Detecção de DNA bubalino
LHQA39	Ilha do Marajó, PA	Marajó tipo creme	Detecção de DNA bubalino
LHQA40	Bujaru, PA	Frescal	Detecção de DNA bubalino
LHQA41	Macapá, AP	Frescal	Detecção de DNA bubalino
LHQA42	Macapá, AP	Provolone	Detecção de DNA bubalino
LHQA43	Macapá, AP	Frescal	Detecção de DNA bubalino e bovino
LHQA44	Macapá, AP	Requeijão	Detecção de DNA bubalino

DISCUSSÃO

Considera-se fraude a substituição de um tipo de leite por outro, na produção de queijos¹. Desta forma, o incremento de leite de vaca em qualquer quantidade, em queijos comercializados como bubalinos sem especificação em rótulo pode vir a lesar o consumidor, que acredita estar adquirindo um produto derivado exclusivamente do leite de búfala.

Os queijos analisados neste trabalho estavam disponíveis comercialmente como sendo exclusivamente de búfala. Trabalhos sobre a produção do queijo Marajoara demonstram que, embora existam variações, o incremento de leite de vaca não é relatado e estes produtos são comercializados como sendo derivados exclusivamente de búfala. Desta forma, nenhum dos queijos analisados neste artigo poderia apresentar traços de leite bovino sem que este fato fosse informado ao consumidor.

Visando detectar fraudes em queijos por adição de leite de outra espécie que não aquela descrita no produto, autores vem utilizando diversas técnicas. Dentre elas, a PCR vem se destacando, por se tratar de uma ferramenta que gera resultados rápidos e por sua alta especificidade^{3,7-10}. Segundo Dias et al¹¹, diversas formas de PCR podem ser utilizadas para a detecção de fraude em queijos, tais como a PCR tradicional, PCR *multiplex* e a *Real Time* PCR. Nosso trabalho propõe a utilização da técnica de PCR para esta finalidade nos queijos comercializados na região alvo do estudo, visto que a mesma vem sendo utilizada com sucesso por diversos autores em vários locais do mundo. Ainda, o presente estudo relata o uso de uma PCR *multiplex* para a referida detecção, técnica esta ainda pouco relatada por outros autores com o propósito de detectar fraude em queijo bubalino comercialmente disponível.

Bottero et al¹² descrevem o uso da PCR *multiplex* para detecção de fraude em amostras de produtos lácteos, porém demonstram a eficiência da técnica na detecção de DNA de bovinos, ovinos e caprinos. Já Reale et al¹³ propuseram a detecção de fraude em produtos a base de leite ovino, caprino, bovino e bubalino, porém estes autores não analisaram amostras disponíveis no comércio.

Além destes autores, Felligini et al¹⁴ também propuseram o uso da PCR *multiplex* para detecção de DNA bovino e bubalino em queijos, utilizando *primers* diferentes daqueles propostos em nosso trabalho.

A PCR como método de detecção de fraude é possível devido à extração de DNA total do leite e seus derivados, como o queijo. O DNA extraído é utilizado para amplificar o DNA específico, utilizando-se *primers* que codificam parte do gene de interesse. Esses *primers* são responsáveis pela especificidade da técnica e sua capacidade de anelamento à fita molde determina o sucesso de sua aplicação.

Autores como Mašková e Paulíčková¹⁰ utilizaram *primers* para identificar o gene que codifica o citocromo B, sendo o *primer forward* comum as espécies estudadas e o *reverse* espécie-específico. Analisando queijos de cabra e ovelha, em 24 amostras analisadas, os referidos autores detectaram quatro fraudes por adição de leite de vaca. Esse mesmo alvo também foi utilizado em *primers* em pesquisas feitas por Zhang et al¹⁵ e Rea et al¹⁶, que objetivaram detectar o limite mínimo de fraude em queijo de búfala fabricados experimentalmente, que foi de 35 pg de DNA bovino¹⁵ e 1 % de adição de leite bovino¹⁶, respectivamente. Ainda, *primers* visando detectar um componente próprio do leite também podem ser utilizados, como exemplo aqueles que amplificam o gene da β -caseína¹⁷. No presente estudo, os *primers* utilizados amplificam sequências do RNA ribossomal mitocondrial 12S de bovinos e bubalinos. Os resultados aqui relatados demonstram que os iniciadores utilizados foram eficientes na detecção de fraude, tanto para uso em PCR convencional^{5,6} quanto em PCR *multiplex*.

Ainda, neste trabalho, a detecção em amostras reais foi estabelecida pela fabricação de queijos experimentalmente fraudados com incremento de diferentes percentagens de leite bovino. Através desta avaliação observou-se que a PCR *multiplex* proposta foi capaz de detectar incorporação de leite bovino em percentagens que variaram de 10 a 100 %, semelhante ao relatado por Darwish et al⁷, que utilizaram os mesmos *primers* e propuseram o uso de uma PCR tradicional.

Embora a PCR seja eficiente, algumas de suas etapas são cruciais para o sucesso da técnica.

Dentre estas etapas pode-se citar a extração de DNA. Esta etapa se torna ainda mais relevante para a realização da técnica diretamente em amostras alimentares, visto que os alimentos apresentam vários inibidores, que podem vir a inviabilizar sua realização. Vários autores citam técnicas de extração de DNA eficientes^{10,15,18}. A técnica relatada neste trabalho foi a preconizada por Darwish et al⁷, sendo conhecida como técnica do fenol/clorofórmio. Este protocolo foi modificado neste trabalho e foi efetivo em todas as amostras. O sucesso deste método de extração pode estar relacionado ao uso da Proteinase K, que segundo os fabricantes degrada muitas proteínas no estado nativo, mesmo na presença de detergentes, sendo desta forma utilizada em vários protocolos de extração por sua ampla ação em diferentes amostras.

Vários autores relatam protocolos para extração de DNA a partir de amostras de queijo. Lopez-Calleja et al⁸ realizaram em seu estudo a extração de DNA do queijo de búfala, utilizando além do tampão de lise, Cloridato de Guanidina 5 M e Proteinase K. No estudo de Teixeira et al¹⁸ foram testados três protocolos de extração de DNA em amostras de queijo (fenol/clorofórmio, uso de Tiocinato de Guanidina e Kit QIAMP DNA stool) e estes autores demonstraram que a utilização da técnica sugerida por Boom et al¹⁹, que utiliza o Tiocinato de Guanidina bem como a utilização do Kit QIAMP DNA stool para extração de DNA foram superiores, pois o leite e principalmente o queijo possuem baixa quantidade de DNA proveniente da descamação do úbere e este produto contém vários inibidores da PCR, como alto teor de proteínas, gorduras e degradação do DNA pelo processo de fabricação. Os mesmos autores relatam que a técnica com Tiocinato de Guanidina não permite que proteínas e outros contaminantes estejam presente no final do processo de extração. Já Maskova e Paulickova¹⁰, ao extraírem DNA de queijo de cabra e ovelha utilizando o Kit Invisorb Spin Food (Invitek, Co., Berlin, Germany) e Zhang et al¹⁵ foram bem sucedidos realizando a extração de DNA pelo método de Brometo de Cetiltrimetilamônio.

As amostras comerciais analisadas neste trabalho apresentavam características distintas de comercialização, uma vez que eram oriundas

de diferentes tipos de pontos de venda. Dentre as amostras analisadas, aquelas comercializadas na Ilha do Marajó e em feiras livres foram as que se apresentaram fraudadas. Os derivados do leite de búfala no estado do Pará, principalmente na Ilha do Marajó, tornaram-se bastante populares, sendo procurados frequentemente por diversos turistas e sendo consumidos nos diversos pratos típicos comercializados em restaurantes e hotéis dos municípios que compõe a referida ilha, sendo considerado um queijo amplamente consumido na região Norte do país.

Vários autores definem as características do queijo marajoara, porém, por se tratar de um alimento produzido na maioria das vezes de forma artesanal, grandes variações são relatadas. As duas variações mais conhecidas do queijo marajoara são o tipo creme, que possui maior quantidade de umidade e menor de lipídeo e tipo manteiga, que possui em sua composição manteiga propriamente dita, contendo menor teor de umidade e maior teor de lipídeo²⁰.

Visando padronizar e legalizar a produção do queijo do Marajó, a Agência de Defesa Agropecuária do Estado do Pará (ADEPARA), criou a lei nº 7.565 de 25 de outubro de 2011, que legaliza o licenciamento, o registro e a comercialização de produtos artesanais no estado do Pará, e entre os produtos descritos estão: Camarão salgado, produtos lácteos, Derivados de carne, Derivados da mandioca, Frutas, legumes, Hortaliças e o queijo do Marajó²¹. Embora esta legislação demonstre um avanço, a mesma não fornece concretamente os padrões necessários para uma fiscalização eficiente, deixando a desejar na fiscalização do produto final por parte dos órgãos competentes.

Embora a técnica de PCR venha sendo aplicada com sucesso na detecção de fraudes em nível experimental, poucos autores descrevem resultados referentes à investigação em amostras comercialmente disponíveis. Das 44 amostras analisadas nesse trabalho, seis (13,63 %) apresentaram fraude por adição de leite de vaca. Resultados semelhantes foram alcançados por Lopez-Calleja et al⁸, que relataram o uso da PCR como alternativa simples e rápida para detecção de DNA específico de vaca em amostras de leite e queijo tipo muçarela de búfala adquiridas na Espanha.

O *primer* ou iniciador utilizado por esses autores foi o mesmo utilizado neste trabalho.

Darwish et al⁷ analisaram 21 amostras de leite fluido de búfala disponíveis no mercado e detectaram fraude em 8 das amostras coletadas. Já Mašková e Paulíčková¹⁰, investigando fraude em 17 amostras de queijo de cabra, detectaram incorporação de leite de vaca em 3 amostras, e investigando 7 amostras de queijo de ovelha, detectaram a incorporação de leite de vaca em 1 amostra.

Teixeira et al¹⁸, ao adquirirem 30 amostras de queijos, que possuíam registro no Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento no município de Belo Horizonte no estado de Minas Gerais, dentre as quais sete eram consideradas somente de leite de búfala e 23 provenientes de leite, sem especificação da espécie, observaram percentagens de 93,3 % de PCR positivas utilizando o protocolo de extração com Tiocinato de Guanidina. Ao utilizar a técnica com fenol/clorofórmio, que também foi testado em nosso trabalho nas mesmas amostras, o resultado diminuiu para 60 %. Este fato deve ser considerado, visto que o número de fraudes aqui demonstrado pode ser ainda maior, caso outro protocolo de extração de DNA seja testado.

Lopez-Calleja et al⁸, detectaram fraude em todas amostras de queijo e leite de búfala experimentalmente preparados com as seguintes proporções de leite de vaca: 100 %, 10 %, 5 %, 1 %, 0,5 % e 0,1 %, esse fato pode estar relacionado com o protocolo de extração desses autores, que utilizaram no início do processo de extração kit de purificação de DNA (Kit Wizard DNA cleanup, Promega, Madison, WI). Resultado semelhante foi obtido em nosso trabalho, demonstrando que o protocolo de extração aqui adotado pode ser uma alternativa viável para a detecção de fraudes em produtos lácteos através da técnica alvo do estudo.

Reale et al¹³, além de detectarem as mesmas proporções que os autores citados a cima, detectaram fraude em proporções de 99 %, 90 %, 75 % e 50 % de leite de vaca utilizando o protocolo de Sambrook et al²² para a extração de DNA. Os mesmos resultados foram obtidos por Mašková e Paulíčková¹⁰, que também conseguiram detectar a fraude por adição de leite de vaca em queijos de

cabra com porcentagem mínima de 1 %.

O leite de búfala possui composição química diferenciada e, por tanto, salientamos que este fato pode dificultar ainda mais a quebra de estruturas que possibilitam a liberação do DNA nas amostras. Por esta razão, estudos futuros devem ser desenvolvidos, visando determinar a influência que diferentes tipos de queijo bubalino podem ter na análise proposta, uma vez que estes podem apresentar características químicas distintas que poderão inclusive inibir as reações de PCR. Além disso, embora os resultados aqui demonstrados sejam relevantes e apontem para a presença de fraude na região estudada, pesquisas posteriores devem ser realizadas visando a detecção de percentagens menores de leite bovino e/ou a quantificação desta matéria prima por meio da *Real Time PCR*.

CONCLUSÃO

Concluiu-se que a técnica de PCR *multiplex* proposta foi capaz de detectar de forma eficiente a presença de fraude em amostras de queijos bubalinos pela incorporação de 10 %, 25 %, 50 %, 75 % 90 % de leite bovino, podendo ser uma alternativa a ser utilizada na rotina de fiscalização destes produtos para esse percentual de fraude. Além disso, o referido trabalho demonstrou a existência de fraude em aproximadamente 13 % das amostras de queijo de búfala comercializadas na região alvo do estudo, o que reforça a necessidade de maior fiscalização por parte dos órgãos competentes para o consumidor não siga sendo lesado.

REFERÊNCIAS

1. Brasil. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Decreto nº 30.691, de 29 de março de 1952. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária dos Produtos de Origem Animal (RIISPOA). Diário Oficial [da] União. Brasília, DF, 7 jul. 1956. Seção 1, 10785p.
2. Oliveira RL, Ladeira MM, Barbosa MAAF, Matsushita M, Santos GT, Bagaldo AR. Composição química e perfil de ácidos graxos do leite e muçarela de búfalas alimentadas com diferentes fontes de lipídeos. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2009; 61 (3): 736-44. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352009000300030>

3. Drummond MG, Brasil BSAF, Dalsecco LS, Brasil RSAF, Teixeira LV, Oliveira DAA. A versatile real-time PCR method to quantify bovine contamination in buffalo products. *Food Control*. 2013; 29(1): 131-7. doi:10.1016/j.foodcont.2012.05.051
4. Mendes CG, Sakatomo SM, Silva JBA, Jácome CGM, Leite AI. Análise físico-químicas e pesquisa de fraude no leite informal comercializado no município de Mossoró, RN. *Ci Anim Bras*. 2010; 11 (2): 349-56. doi 10.526/cab.v11i2.1146
5. Dias SS, Nogueira LC, Reis RCS, Barbosa CG. Avaliação da Disponibilidade e Rotulagem de Derivados de Leite de Búfala nas Diferentes Estações do ano comercializados na Zona Oeste do Rio de Janeiro. *Alim Nutr*. 2012;23(3):421-6.
6. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pecuária 2012: Bovinos - efetivo dos rebanhos. [Acesso 2014 jul13]. Disponível em: [http://www.ibge.gov.br/estadosat/].
7. Darwish S F, Allam HA, Amin AS. Evaluation of PCR Assay for Detection of Cow's Milk in Water Buffalo's Milk. *World Appl Sci J*. 2009; 7(4): 461-7.
8. López-Calleja I, Gonzalez A, Farjado V, Rodríguez MA, Hernández PE, García RM. PCR Detection of Cow's Milk in Water Buffalo Milk and Mozzarella Cheese. *Int Dairy J*. 2005; 15(11): 1122-9. doi:10.1016/j.idairyj.2004.12.003
9. Dalmaso E, Fontanella P, Piattib T, Civeraa S, Rosatic MT, Bottero A. Multiplex PCR assay for the identification of animal species in feedstuffs. *Mol Cell Probes*. 2004; 18(2): 81-7. doi:10.1016/j.mcp.2003.09.006
10. Mašková E, Paulíčková E. PCR-Based Detection of Cow's Milk in Goat and Sheep Cheeses Marketed in the Czech Republic. *Czech J Food Sci*. 2006; 24(3): 127-32.
11. Dias SS, Lobato V, Verruma-Bernardi MR. Metodologias para identificar adulteração em queijos produzidos com leite de diferentes espécies de animais. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2009; 68(3): 327-33.
12. Bottero MT, Civera T, Nucera D, Rosati S, Sacchi P, Turi RM. A multiplex polymerase chain reaction for the identification of cow's, goat's and sheep's milk in dairy products. *Int Dairy J*. 2003; 13(4): 277-82. doi:10.1016/S0958-6946(02)00170-X
13. Reale S, Campanella A, Mergiolli A, Pilla F. A novel method for species identification in milk and milk-based products. *J Dairy Res*. 2008; 75(1): 107-12. doi: 10.1017/S0022029907003020
14. Felligini M, Bonizzi I., Curik VC, Parma P, Greppi GF, Enne G. Detection of adulteration in Italian Mozzarella Cheese Using Mitochondrial DNA Templates as Biomarkers. *Food Technol Biotechnol*. 2005; 43(1): 91-5.
15. Zhang CL, Fowler MR, Scott NW, Lawson G, Slater A. A TaqMan real-time PCR system for the identification and quantification of bovine DNA in meats, milks and cheeses. *Food Control*. 2007; 18(9): 1149-58. doi:10.1016/j.foodcont.2006.07.018
16. Rea S, Chikuni K, Branciarri R, Sangamayya RRS, Ranucci D, Avellini P. Use of duplex polymerase chain reaction (duplex-PCR) technique to identify bovine and water buffalo milk used in making mozzarella Cheese. *J Dairy Res*. 2001; 68(4): 689-98. doi: 10.1017/S0022029901005106
17. Veloso ACA, Teixeira N, Ferreira IMPLVO, Ferreira MA. Detecção de Adulterações em Produtos Alimentares Contendo Leite e/ou proteínas Lácteas. *Quim Nova*. 2002; 25 (4): 609-15. http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422002000400016
18. Teixeira LV, Teixeira CS, Caldeira LGM, Bastianetto E, Oliveira DAA. Extração de DNA e Avaliação da Composição Espécie- específica de Queijos. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2012; 64(3): 721-6. http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352012000300025
19. Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, Van der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol*. 1990; 28(3): 495-503.
20. Figueiredo EL, Júnior JBL, Toro UM, Lima SCG. Queijo do Marajó Tipo Creme: Parâmetros Físico-Químicos e Sensoriais. *Rev Inst Latic Cândido Tostes*. 2011; 373(66): 26-33.
21. Pará. Secretaria de Estado de Pesca e Aquicultura. Lei Estadual nº 7.565, de 25 de Outubro de 2011. Dispõe sobre normas para licenciamento de estabelecimentos processadores, registro e comercialização de produtos artesanais comestíveis de origem animal e vegetal no Estado do Pará. Diário Oficial [do] Estado do Pará. Belém, Pará, 16 Jul. 2012. Caderno 6 -7, 8p.
22. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory; 1989.

Influência do branqueamento, pasteurização e congelamento nas características físico-químicas, nos carotenoides e no valor de vitamina A de polpa de araticum (*Annona crassiflora* Mart.)

Influence of the bleaching, pasteurization and freezing on the physico-chemical characteristics, on carotenoids and vitamin A value of “araticum” (*Annona crassiflora* Mart.) pulp

RIALA6/1634

Letícia Linhares SILVA*, Leandro de Moraes CARDOSO, Helena Maria PINHEIRO-SANT'ANA

*Endereço para correspondência: Laboratório de Análise de Vitaminas, Departamento de Nutrição e Saúde. CCB II, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brasil, CEP: 36571-000. Tel: (31) 3899-1684. Email: leticia.linhares@ufv.br

Recebido: 12.05.2014 - Aceito para publicação: 23.02.2015

RESUMO

Avaliaram-se os efeitos da pasteurização (75 °C, 30 minutos), branqueamento (70 °C, 2 minutos) e congelamento (-5 °C ou -18 °C) nas características físico-químicas (acidez titulável, pH e sólidos solúveis) e nos carotenoides de polpa de araticum durante 180 dias de armazenamento. Os carotenoides (*all-trans-α-caroteno* e *all-trans-β-caroteno*) foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência. A polpa *in natura* apresentou elevado teor de sólidos solúveis (21,27 °Brix), *all-trans-α-caroteno* (1,98 mg/100 g), *all-trans-β-caroteno* (1,58 mg/100 g) e do valor de vitamina A (131,46 RAE/100 g) quando comparados a outros frutos do Cerrado. A pasteurização, o branqueamento e o armazenamento não modificaram as características físico-químicas da polpa. Os tratamentos térmicos diminuíram igualmente ($p > 0,05$) os teores de *all-trans-α-caroteno*, *all-trans-β-caroteno* e valor de vitamina A (média: 18, -41 e -41 %, respectivamente). Os carotenoides e o valor de vitamina A nas polpas branqueadas, pasteurizadas e congeladas a -5 °C ou -18 °C variaram similarmente até 90 dias de armazenamento. Aos 180 dias de armazenamento, os teores de *all-trans-α-caroteno* e *all-trans-β-caroteno* e o valor de vitamina A aumentaram nas polpas pasteurizadas (média: +6,5 %, +33,0 % e +33,5 %, respectivamente) e reduziram nas polpas branqueadas (-23,5 %, -19,5 % e -19,5 %, respectivamente). O binômio branqueamento/congelamento mostrou-se eficaz para armazenamento da polpa por até 90 dias; após esse período, recomenda-se o uso da pasteurização/congelamento.

Palavras-chave. degradação térmica, estocagem sob congelamento, estabilidade de carotenoides, fruto do Cerrado, polpa de fruta.

ABSTRACT

Effects of bleaching (70 °C, 2 minutes), pasteurization (75 °C, 30 minutes), and freezing (-5 or -18 °C) on the physicochemical characteristics (pH, titratable acidity and soluble solids), and on carotenoids of “araticum” pulp were evaluated during the 180-day storage. Carotenoids were analyzed by high performance liquid chromatography. The fresh pulp showed high contents of soluble solids (21.27 °Brix), *all-trans-α-carotene* (1.98 mg/100 g), *all-trans-β-carotene* (1.58 mg/100 g) and vitamin A value (131.46 RAE/100g) when compared to other fruits from Cerrado. The physicochemical characteristics of pulp remained unchanged after pasteurization and bleaching, and during the storage ($p > 0.05$). Thermal treatments equally decreased the *all-trans-α-carotene*, *all-trans-β-carotene* contents, and vitamin A value (average: -18, -41 and -41 % respectively). Both freezing temperatures influenced on the pulps in similar manner ($p > 0.05$). Carotenoids and vitamin A value of the bleached or pasteurized and frozen (-5 or -18 °C) pulps varied similarly up to 90 days of storage. At 180 days, *all-trans-α-carotene* and *all-trans-β-carotene* contents and vitamin A value increased in pasteurized pulps (in average +6.5 %, +33.0 % and +33.5 %, respectively), and they decreased in bleached pulps (-23.5 %, -19.5 % and -19.5 %, respectively). Bleaching/freezing binomial was effective for pulp storage up to 90 days; and, after this period it is recommended the use of pasteurization/freezing approach.

Keywords. thermal degradation, storage under freezing, carotenoids stability, Cerrado fruits, fruit pulp.

INTRODUÇÃO

O araticum (*Annona crassiflora* Mart.) é um fruto nativo do Cerrado Brasileiro que possui elevado valor energético, teor de nutrientes e compostos bioativos¹. A polpa do fruto possui minerais (Ca, Zn, Cu, Fe, P e Mg) e vitaminas (vitamina C, vitamina E e folatos)^{1,2} e destaca-se como excelente fonte de fibras alimentares e carotenoides pró-vitamínicos A¹.

O araticum possui elevada massa e rendimento de polpa¹, a qual apresenta alto aproveitamento culinário, sendo consumida *in natura* ou processada na forma de sucos, licores, doces, geleias, tortas e iogurtes^{3,4}. Este fruto constitui uma alternativa para a indústria, uma vez que os produtos derivados de sua polpa possuem boa aceitação e intenção de compra pelo consumidor^{4,5}.

O uso do araticum pela população e indústria de alimentos é restrito devido à curta safra e alta perecibilidade do fruto resultante das suas características químicas, tais como o elevado pH que favorece o desenvolvimento de microorganismos^{1,6}. Neste contexto, a produção de polpa de araticum constitui importante alternativa para permitir a sua estocagem na entressafra dos frutos.

A polpa de fruta é definida como produto não fermentado, não concentrado ou diluído, obtido pelo esmagamento de frutos carnosos. A legislação brasileira estabelece padrões microbiológicos, de identidade e características físico-químicas mínimas para alguns tipos de polpa⁷⁻⁹.

Diversos métodos podem ser utilizados para a conservação de polpa de frutas, entre os quais se destacam as técnicas com emprego ou remoção de calor (branqueamento, pasteurização e congelamento). Esses métodos inibem o crescimento de microrganismos e a atividade enzimática e, dessa forma, aumentam a vida de prateleira e a segurança microbiológica dos produtos^{10,11}. No entanto, podem alterar o teor de alguns nutrientes como as vitaminas e carotenoides.

Os carotenoides são compostos insaturados altamente susceptíveis à ação da luz, temperatura, entre outros¹². Alguns carotenoides,

como o α -caroteno, β -caroteno e β -criptoxantina, são convertidos no organismo em vitamina A¹³, essencial para a diferenciação celular, a visão, o crescimento ósseo, a reprodução e a integração do sistema imunológico^{14,15}. Além disso, os carotenoides contribuem para a prevenção e o tratamento de doenças cardiovasculares e a modulação do câncer¹⁵⁻¹⁸.

Uma vez que os consumidores têm se tornado cada vez mais exigentes e optado por produtos com maior vida de prateleira e que mantenham suas características sensoriais e nutricionais durante o armazenamento¹⁹, o objetivo deste estudo foi avaliar o impacto da pasteurização, branqueamento e congelamento (-5 °C e -18 °C) nas características físico-químicas e no teor de carotenoides de polpa de araticum (*Annona crassiflora* Mart.).

MATERIAL E MÉTODOS

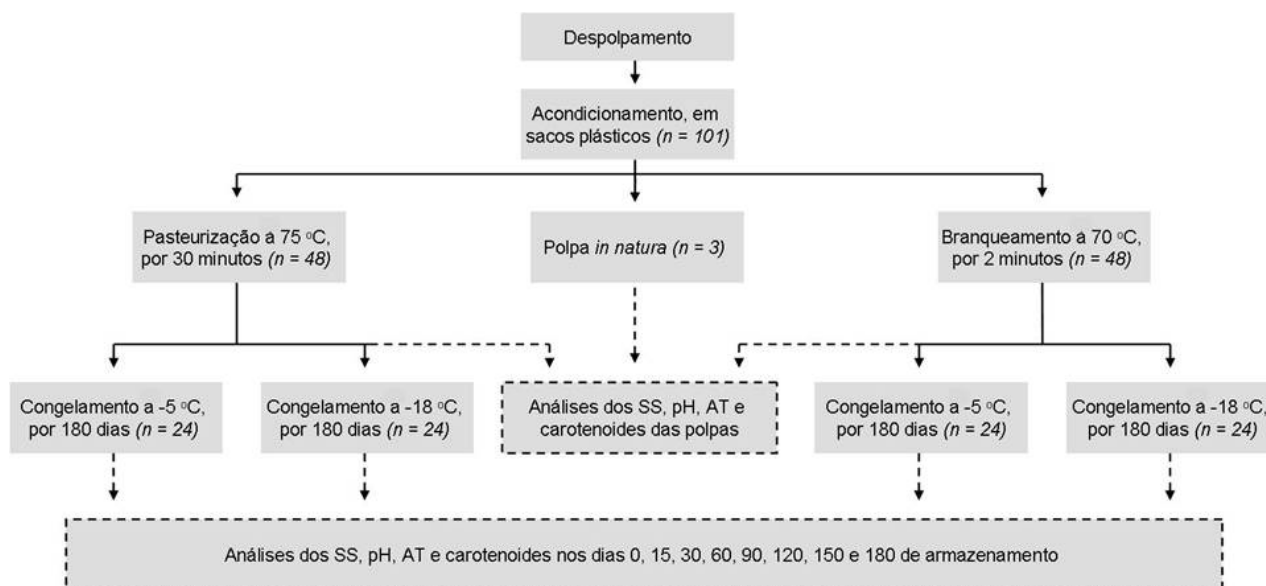
Coleta, amostragem e seleção dos frutos

Frutos do araticum (*Annona crassiflora* Mart.) nativos do Cerrado Brasileiro (Município de Curvelo, Minas Gerais) foram coletados em época de safra (fevereiro a março de 2011), após sua queda natural da árvore. A amostragem foi realizada em triplicata, sendo cada uma delas composta por 2,5 kg de frutos (± 5 unidades) coletados em áreas e árvores distintas.

Após a coleta, os frutos foram acondicionados em caixas de isopor e transportados para o laboratório, em até 36 horas. No laboratório, os frutos morfológicamente perfeitos e com sólidos solúveis superiores a 19 °Brix (maturação fisiológica completa) foram selecionados para análise.

Obtenção e processamento da polpa

A casca, a polpa e as sementes do araticum foram separadas com auxílio de uma faca em inox. A polpa foi homogeneizada em processador de alimentos (Faet Multipratic, MC5), acondicionada em embalagens de polietileno (30 g), submetida ao tratamento térmico (pasteurização ou branqueamento) e congelada por 180 dias (-5 °C e -18 °C) (Figura 1).



SS = sólidos solúveis, AT = acidez titulável, n = número de parcelas (embalagens de polietileno) submetidas ao tratamento.

Figura 1. Fluxograma de processamento e análise da polpa de araticum

Análises químicas

Para as análises físico-químicas, extração e obtenção de padrões de carotenoides, foram utilizados reagentes grau analítico. Nas análises de carotenoides foram utilizados os seguintes reagentes grau CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência): acetona, acetato de etila, metanol e acetonitrila (Tedia, Brasil). As análises físico-químicas e de carotenoides foram realizadas antes e após o tratamento térmico (T0) e durante o congelamento (15, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias).

Análises físico-químicas

A acidez titulável, pH e sólidos solúveis da polpa de araticum foram avaliados de acordo com o Instituto Adolfo Lutz²⁰. A acidez titulável (AT) foi determinada por volumetria de neutralização utilizando solução padrão de hidróxido de sódio 0,1 mol/L. O pH foi determinado diretamente na polpa utilizando pHmetro digital de bancada (Digimed, DM-22), e os sólidos solúveis (SS) foram determinados por refratometria utilizando refratômetro óptico (Analytik Jena).

Análise de carotenoides

Foram investigados a presença e teor de *all-trans*- α -caroteno, *all-trans*- β -caroteno, *all-trans*-licopeno e *all-trans*- β -criptoxantina na polpa de

araticum utilizando os métodos de extração e análise propostos por Kimura e Rodriguez-Amaya²¹ e Pinheiro-Sant'Ana, Stringheta²², respectivamente. Cerca de 5 g de polpa foram adicionados de 20 mL de acetona resfriada ($5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$), homogeneizados em microtritador (Marconi, MA 102) e filtrados a vácuo em funil de Buchner, utilizando-se papel de filtro nº JP41 J. (Prolab, Brasil). O procedimento de extração foi repetido por mais duas vezes no resíduo até a descoloração completa da polpa.

Posteriormente, o filtrado foi transferido em três frações para um funil de separação contendo 50,0 mL de éter de petróleo. Após a transferência de cada fração, água destilada foi adicionada para a separação de fases (superior: carotenoides em éter de petróleo; inferior: acetona-água) sendo a fase inferior descartada. Acrescentou-se sulfato de sódio anidro ao extrato etéreo para retirar o resíduo de água. Posteriormente, o extrato foi concentrado em evaporador rotativo (Tecnal, TE-211) a $35 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ e o volume completado para 25,0 mL com éter de petróleo. O extrato foi armazenado em frasco de vidro âmbar hermeticamente vedado e acondicionado a $-18 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, até o momento da análise.

Antes da análise, 8,0 mL do extrato foram evaporados sob fluxo nitrogênio gasoso e o resíduo seco foi redissolvido em 2 mL de acetona grau CLAE.

Para análise, 50 µL de extrato previamente filtrado em unidade filtrante (Millipore, Brasil) com porosidade de 0,45 µm foram injetados na coluna cromatográfica. As análises foram realizadas utilizando um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE (Shimadzu, SCL 10at VP) composto por bomba de alta pressão (Shimadzu, LC-10at VP), amostrador automático com *loop* de 50 µL (Shimadzu, SIL-10AF) e detector de arranjo de diodos (DAD) (Shimadzu, SPD-M10A). Utilizou-se coluna cromatográfica RP18 (Phenomenex Gemini, 250 x 4,6 mm, 5 µm), munida de coluna de guarda (Phenomenex ODS, 4 mm x 3 mm); fase móvel composta de metanol: acetato de etila:acetonitrila (80:10:10, v/v/v), fluxo da fase móvel de 2,0 mL min⁻¹ e tempo de corrida de 13 minutos²².

Durante a extração e análise, as amostras e os extratos foram protegidos da luz (solar e artificial) utilizando vidrarias âmbar, papel alumínio e cortinas do tipo *blackout*, e protegidos do oxigênio utilizando tampas e ambiente com nitrogênio gás nas vidrarias.

A identificação e quantificação de compostos foram realizadas utilizando α-caroteno e β-caroteno isolados de cenoura e β-criptoxantina e licopeno isolados de mamão e tomate, respectivamente, por meio de cromatografia em coluna aberta²¹. A pureza dos padrões, obtida em espectrofotômetro (Thermo Scientific, Evolution 60S), foi 94,3 % (α-caroteno), 91,4 % (β-caroteno), 92,1 % (β-criptoxantina) e 93,7 % (licopeno).

Os compostos foram identificados comparando os tempos de retenção e espectros de absorção obtidos para os padrões e para as amostras analisados sob as mesmas condições. Para a quantificação dos carotenoides encontrados nas amostras foram utilizadas curvas analíticas e equações de regressão construídas por meio da injeção, em duplicata, de seis soluções dos padrões em diferentes concentrações (*all-trans*-α-caroteno: 0,033 a 2,060 µg; $y = 1730130,16x - 8057,58$; $R^2 = 0,999$; *all-trans*-β-caroteno: 0,004 a 1,433 µg; $y = 1389460,94x + 24320,87$; $R^2 = 0,996$).

O valor de vitamina A foi estimado utilizando os fatores de conversão do U.S. Institute of Medicine²³ em que 1 Equivalente de Atividade de Retinol (RAE) corresponde a 1 µg de retinol;

12 µg de β-caroteno e 24 µg de outros carotenoides pró-vitâmicos.

Delineamento experimental e análise dos dados

Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, em parcelas subdivididas, com 3 repetições. Os tratamentos térmicos (pasteurização e branqueamento) constituíram as parcelas e as temperaturas de armazenamento (-5 °C e -18 °C) representaram as sub-parcelas.

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade (Shapiro-Wilk) e a diferença entre os tratamentos avaliada pela análise de variância (ANOVA). As diferenças entre as médias dos tratamentos térmicos (branqueamento e pasteurização) dentro de um mesmo tempo de armazenamento foram avaliadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). A variação dos dados dentro de um mesmo tratamento térmico ao longo do armazenamento foi avaliada por análise de regressão. A diferença entre os tempos 0 (T0) e 180 (T180) foi analisada pelo teste t de Student ($p < 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software SAS (Statistical Analysis System), versão 9.2 (2008), licenciado para a UFV.

RESULTADOS

Efeito do tratamento térmico nas características físico-químicas e carotenoides

A polpa de araticum *in natura* apresentou alto teor de sólidos solúveis e pH, além de baixa acidez titulável. Além disso, a polpa de araticum apresentou elevado teor de *all-trans*-α-caroteno, *all-trans*-β-caroteno e de vitamina A, quando comparada a outros frutos do Cerrado como cagaita, mangaba e araçá²⁴⁻²⁶.

Os efeitos do branqueamento e pasteurização nas características físico-químicas e carotenoides da polpa foram estatisticamente semelhantes. Tais tratamentos térmicos não alteraram as características físico-químicas da polpa, mas reduziram o teor de *all-trans*-α-caroteno (em média, -18 %), *all-trans*-β-caroteno (em média, -41 %) e, conseqüentemente, os carotenoides totais e o valor de vitamina A (em média, -27 e -41 %, respectivamente) (Tabela 1).

Tabela 1. Influência do tratamento térmico nas características físico-químicas, teor de carotenoides e valor de vitamina A da polpa de araticum¹⁻⁴

Variáveis	<i>In natura</i>	Branqueamento	Pasteurização
Acidez titulável (g ácido cítrico/100g)	0,60 ± 0,11 ^a	0,52 ± 0,10 ^a	0,49 ± 0,07 ^a
pH	4,71 ± 0,03 ^a	4,72 ± 0,06 ^a	4,77 ± 0,01 ^a
Sólidos solúveis (°Brix)	21,27 ± 1,67 ^a	21,67 ± 0,61 ^a	21,00 ± 2,36 ^a
<i>all-trans-α</i> -caroteno (mg/100g)	1,98 ± 0,07 ^a	1,71 ± 0,09 ^b	1,55 ± 0,10 ^b
<i>all-trans-β</i> -caroteno (mg/100g)	1,58 ± 0,14 ^a	1,01 ± 0,09 ^b	0,86 ± 0,06 ^b
Carotenoides totais (mg/100g)	3,55 ± 0,20 ^a	2,76 ± 0,26 ^b	2,41 ± 0,15 ^b
Vitamina A (RAE/100g)	131,46 ± 11,68 ^a	84,57 ± 7,82 ^b	71,45 ± 4,74 ^b

¹ Valores expressos em matéria fresca; ² média de 3 repetições; ³ dados apresentados em média ± desvio padrão; ⁴ Médias seguidas de uma mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância

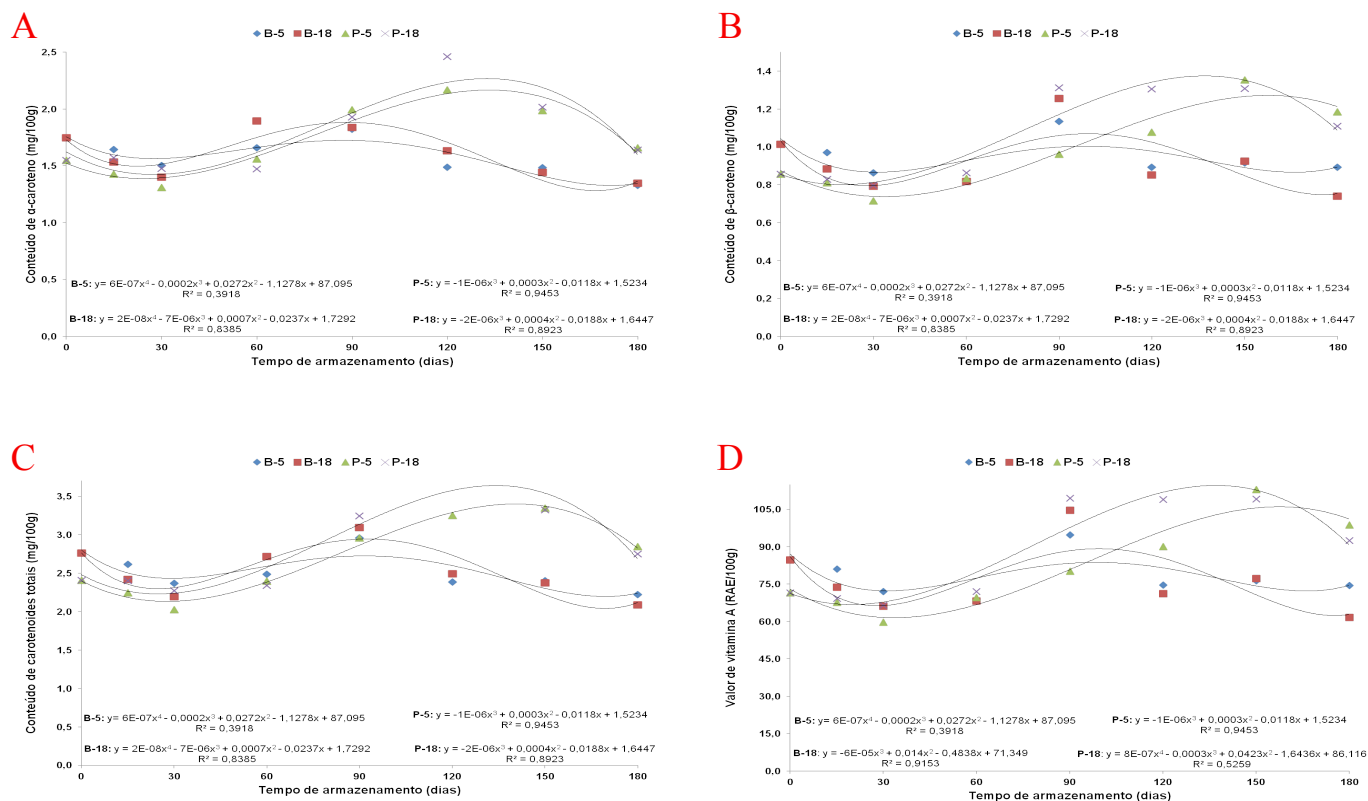
Estabilidade das características físico-químicas e carotenoides durante o armazenamento

As características físico-químicas e os carotenoides nas polpas de araticum variaram em função do tipo de tratamento térmico ($p < 0,05$), mas não foram influenciadas pela temperatura de congelamento e pela interação destas variáveis ($p > 0,05$) (Tabela 2, Figura 2).

Tabela 2. Sólidos solúveis, pH e acidez titulável em polpa de araticum pasteurizadas ou branqueadas, e congeladas (-5 °C ou -18 °C), por 180 dias^{1,2,3}

Sólidos Solúveis (°Brix)				
Tempo	Branqueada (-5 °C)	Branqueada (-18 °C)	Pasteurizada (-5 °C)	Pasteurizada (-18 °C)
0	21,67 ± 0,61 ^{Aa}	21,67 ± 0,61 ^{Aa}	21,00 ± 2,36 ^{Aa}	21,00 ± 2,36 ^{Aa}
15	20,27 ± 0,63 ^{Aa}	20,80 ± 0,60 ^{Aa}	21,50 ± 1,31 ^{Aa}	21,40 ± 1,11 ^{Aa}
30	21,63 ± 0,76 ^{Aa}	20,70 ± 0,78 ^{Aa}	21,20 ± 1,31 ^{Aa}	21,07 ± 1,10 ^{Aa}
60	21,63 ± 0,47 ^{Aa}	21,43 ± 0,42 ^{Aa}	21,33 ± 0,96 ^{Aa}	22,03 ± 1,85 ^{Aa}
90	20,73 ± 0,85 ^{Aa}	20,83 ± 0,35 ^{Aa}	22,00 ± 0,30 ^{Aa}	21,77 ± 0,75 ^{Aa}
120	21,43 ± 0,35 ^{Aa}	21,90 ± 0,36 ^{Aa}	21,87 ± 1,21 ^{Aa}	21,47 ± 1,86 ^{Aa}
150	21,43 ± 0,35 ^{Aa}	21,73 ± 0,40 ^{Aa}	22,87 ± 1,21 ^{Aa}	21,63 ± 1,11 ^{Aa}
180	20,63 ± 0,61 ^{Aa}	20,27 ± 1,01 ^{Aa}	22,65 ± 1,75 ^{Aa}	22,05 ± 1,25 ^{Aa}
Acidez titulável (g ácido cítrico/100g)				
Tempo	Branqueada (-5 °C)	Branqueada (-18 °C)	Pasteurizada (-5 °C)	Pasteurizada (-18 °C)
0	0,52 ± 0,10 ^{Aa}	0,52 ± 0,10 ^{Aa}	0,49 ± 0,07 ^{Aa}	0,49 ± 0,07 ^{Aa}
15	0,49 ± 0,07 ^{Aa}	0,48 ± 0,07 ^{Aa}	0,49 ± 0,03 ^{Aa}	0,51 ± 0,03 ^{Aa}
30	0,52 ± 0,07 ^{Aa}	0,53 ± 0,06 ^{Aa}	0,52 ± 0,05 ^{Aa}	0,52 ± 0,04 ^{Aa}
60	0,52 ± 0,03 ^{Aa}	0,52 ± 0,03 ^{Aa}	0,51 ± 0,03 ^{Aa}	0,53 ± 0,04 ^{Aa}
90	0,51 ± 0,06 ^{Aa}	0,50 ± 0,06 ^{Aa}	0,49 ± 0,02 ^{Aa}	0,52 ± 0,02 ^{Aa}
120	0,50 ± 0,04 ^{Aa}	0,50 ± 0,03 ^{Aa}	0,49 ± 0,03 ^{Aa}	0,49 ± 0,01 ^{Aa}
150	0,52 ± 0,08 ^{Aa}	0,51 ± 0,08 ^{Aa}	0,50 ± 0,03 ^{Aa}	0,53 ± 0,04 ^{Aa}
180	0,49 ± 0,07 ^{Aa}	0,51 ± 0,08 ^{Aa}	0,50 ± 0,07 ^{Aa}	0,51 ± 0,04 ^{Aa}
pH				
Tempo	Branqueada (-5 °C)	Branqueada (-18 °C)	Pasteurizada (-5 °C)	Pasteurizada (-18 °C)
0	4,72 ± 0,06 ^{Aa}	4,72 ± 0,06 ^{Aa}	4,77 ± 0,01 ^{Aa}	4,77 ± 0,01 ^{Aa}
15	4,76 ± 0,05 ^{Aa}	4,75 ± 0,03 ^{Aa}	4,73 ± 0,06 ^{Aa}	4,76 ± 0,03 ^{Aa}
30	4,74 ± 0,04 ^{Ab}	4,74 ± 0,04 ^{Ab}	4,76 ± 0,02 ^{Aa}	4,78 ± 0,01 ^{Aa}
60	4,71 ± 0,01 ^{Ab}	4,71 ± 0,05 ^{Aa}	4,77 ± 0,04 ^{Aab}	4,75 ± 0,02 ^{Aab}
90	4,74 ± 0,10 ^{Aab}	4,78 ± 0,04 ^{Aa}	4,78 ± 0,02 ^{Ab}	4,75 ± 0,03 ^{Aa}
120	4,74 ± 0,01 ^{Aa}	4,72 ± 0,03 ^{Aa}	4,73 ± 0,01 ^{Aa}	4,71 ± 0,07 ^{Aa}
150	4,73 ± 0,03 ^{Aa}	4,71 ± 0,02 ^{Aa}	4,73 ± 0,03 ^{Aa}	4,72 ± 0,06 ^{Aa}
180	4,72 ± 0,05 ^{Aa}	4,72 ± 0,09 ^{Aa}	4,70 ± 0,04 ^{Aa}	4,73 ± 0,07 ^{Aa}

¹ Análises realizadas em 3 repetições; ² dados apresentados em média ± desvio padrão; ³ Médias seguidas por uma mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)



B-5: polpa branqueada congelada a -5 °C; B-18: Polpa branqueada congelada a -18 °C; P-5: polpa pasteurizada congelada a -5 °C; P-18: Polpa pasteurizada congelada a -18 °C

Figura 2. Comportamento e equação de regressão ajustada para *all-trans*- α -caroteno (A), *all-trans*- β -caroteno (B), total de carotenoides (C) e valor de vitamina A (D) em polpas de araticum submetidas a tratamento térmico (pasteurização ou branqueamento) e congelamento (-5 °C ou -18 °C) por 180 dias

Características físico-químicas

O pH e a acidez titulável das polpas branqueadas e pasteurizadas submetidas ao congelamento não variaram durante o armazenamento (Tabela 2). Além disso, os sólidos solúveis nas polpas pasteurizadas e branqueadas também se mantiveram constantes durante o armazenamento.

Carotenoides e teor de vitamina A

Os teores de α -caroteno, β -caroteno, total de carotenoides e de vitamina A das polpas não foram influenciados pela temperatura de armazenamento e diferiram entre os tratamentos térmicos a partir de 90 dias de armazenamento (Figura 2). O teor de *all-trans*- α -caroteno, *all-trans*- β -caroteno nos quatro tipos de polpas congeladas reduziu até o 30º dia de

armazenamento, seguido de aumento após esse período. No entanto, este aumento nas polpas branqueadas ocorreu até o T90, enquanto que nas polpas pasteurizadas ele se prolongou até o T120. Após o T90 nas polpas branqueadas e T120 nas polpas pasteurizadas observou-se um segundo ciclo de redução no teor de carotenoides.

Aos 180 dias de armazenamento, o teor de carotenoides e o valor de vitamina A em todos os tratamentos variaram significativamente em relação ao T0 (polpa não congelada) (Figura 3). O teor de carotenoides e o valor de vitamina A nas polpas pasteurizadas em T180 foi significativamente maior que no T0 (em média, 6,5 %, 33,0 %, 10,0 % e 33,5 %, respectivamente). Em contrapartida, nas polpas branqueadas esses parâmetros reduziram em média 23,5 %, 19,5 %, 22,0 % e 19,5 %, respectivamente.

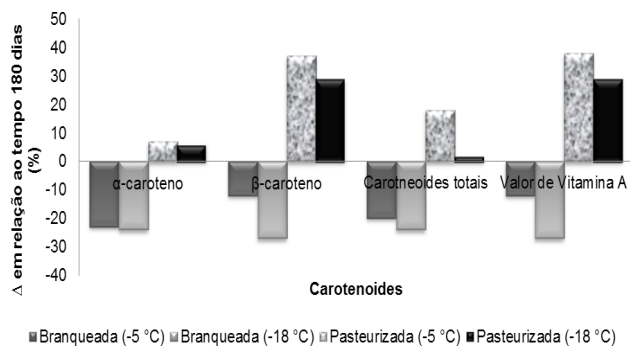


Figura 3. Variação entre o teor inicial (T0) e teor final (T180) de carotenoides e de vitamina A em polpas de araticum submetidas a tratamento térmico (pasteurização ou branqueamento) e congeladas a -5 °C ou -18 °C

DISCUSSÃO

Características físico-químicas e carotenoides da polpa de araticum *in natura*

Até o momento, não existe uma Instrução Normativa Brasileira que estabeleça os padrões de identidade e qualidade para polpa de araticum. Os valores de sólidos solúveis, pH e acidez titulável observados na polpa de araticum *in natura* foram superiores aos observados em polpa de araticum coletado no Norte de Minas Gerais². Essas diferenças podem ser decorrentes do fato de os frutos analisados nestes estudos terem sido obtidos a partir de árvores nativas em estado selvagem, o que contribui para a variação nas características químicas dos frutos.

O perfil de carotenoides observado na polpa analisada no presente estudo diferiu do observado por outros autores^{1,2}, os quais identificaram *all-trans*-licopeno na polpa de araticum. A variação no perfil de carotenoides em alimentos é pouco comum, no entanto, pode ser observada em algumas variedades de frutas e hortaliças tais como abóbora, pimenta, ameixa²⁷.

Apesar dos elevados teores de *all-trans*- α -caroteno, *all-trans*- β -caroteno, totais de carotenoides e o valor de vitamina A observados na polpa de araticum, esses valores foram de 20 a 55 % menores aos previamente obtidos em nosso laboratório em frutos coletados na mesma região (*all-trans*- α -caroteno: 2,98 mg/100 g; *all-trans*- β -caroteno: 1,97 mg/100 g; totais de carotenoides: 4,98 mg/100 g e valor de

vitamina A: 288,79 RAE/100 g)¹. Essas diferenças sugerem que o teor de carotenoides no araticum também pode ser influenciado por fatores relacionados ao ano da safra, condições climáticas e condições fisiológicas da árvore.

Efeito do tratamento térmico nas características físico-químicas e carotenoides

Apesar da diferença no binômio tempo/temperatura dos tratamentos térmicos, os efeitos do branqueamento e pasteurização nas características físico-químicas e carotenoides da polpa foram semelhantes. Em ambos os tratamentos observou-se redução dos *all-trans*-carotenoides, a qual pode ser atribuída à isomerização destes compostos às formas *cis* devido à ação do calor²⁸. Esta alteração na estrutura química dos carotenoides diminui a sua atividade biológica e o valor nutricional dos alimentos²⁷.

Estabilidade das características físico-químicas e carotenoides ao longo do armazenamento

Características físico-químicas

A ausência de variação no pH e a acidez titulável das polpas branqueadas e pasteurizadas submetidas ao congelamento está de acordo com o observado em polpas de acerola²⁹. Além disso, os sólidos solúveis nas polpas pasteurizadas e branqueadas também se mantiveram constantes durante o armazenamento, o que sugere que os compostos solúveis presentes na polpa de araticum foram estáveis. O comportamento dos sólidos solúveis em polpas de frutas é bastante heterogêneo e parece ser influenciado pelo perfil de compostos solúveis (pectina, açúcares redutores, vitaminas, entre outros) da matriz alimentar²⁹. Em estudos recentes, foi observado decréscimo ou aumento no teor destes compostos em polpas tratadas em condições similares às do presente estudo^{29,30}.

Carotenoides e teor de vitamina A

As alterações do teor de carotenoides durante o armazenamento decorrem de processos complexos os quais são influenciados por diversos fatores e afetam a concentração desses compostos de forma inconsistente³¹. No presente estudo, observou-se que os carotenóides das polpas congeladas reduziram

até o 30° dia de armazenamento. Esta redução pode ser resultado da isomerização *trans-cis*, oxidação e degradação dos carotenoides^{28,32}. Após 30 dias de armazenamento, verificou-se aumento no teor de carotenoides, demonstrando a ocorrência de uma fase de balanço positivo onde a conversão de outros carotenoides a *all-trans- α -caroteno* e *all-trans- β -caroteno* superou as reações de degradação^{28,32}.

O prolongamento do aumento do teor de carotenoides nas polpas pasteurizadas até o T120 indicou que a pasteurização foi mais eficaz que o branqueamento na inibição da velocidade das reações de degradação e, conseqüentemente, o retorno à fase de balanço negativo e declínio do teor dos carotenoides. A menor eficiência do branqueamento pode se justificar pela não inativação de todas as enzimas presentes no alimento^{10,11}. Dessa forma, estas enzimas, mesmo com atividade inibida pelo frio, podem apresentar atividade residual e, assim, provocar alterações químicas durante o armazenamento.

O maior teor de carotenoides nas polpas pasteurizadas em T180, em relação ao T0, refletiu o prolongamento da fase de balanço positivo entre T90 e T120. Este prolongamento retardou o retorno à fase de declínio permitindo que essas polpas, em T180, não se encontrassem em seu balanço negativo máximo, no qual seria possível observar teor de carotenoides inferiores a T0. Nas polpas branqueadas o balanço negativo máximo ocorreu próximo do T165 (Figura 3).

CONCLUSÃO

O binômio branqueamento/congelamento mostrou-se eficaz para armazenamento da polpa de araticum até 90 dias, possibilitando o seu uso especialmente em nível domiciliar. Após esse período, recomenda-se o uso da pasteurização/congelamento como método de conservação da polpa por até 180 dias.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), Brasil, pela concessão da bolsa de iniciação científica e apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

1. Cardoso LM, Oliveira DS, Bedetti SF, Ribeiro SMR, Pinheiro-Sant'Ana HM. Araticum (*Annona crassiflora* Mart..) from the Brazilian Cerrado: chemical composition and bioactive compounds. *Fruits*. 2013;68(2):121-34. doi: <http://dx.doi.org/10.1051/fruits/2013058>
2. Souza VR, Pereira PAP, Queiroz F, Borges SV, Carneiro JDS. Determination of bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Cerrado Brazilian fruits. *Food Chem*. 2012;134(1):381-6. doi:10.1016/j.foodchem.2012.02.191
3. Silva DB, Silva JA, Junqueira NTV, Andrade LRM. Frutas do cerrado. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; 2001. 178 p.
4. Oliveira KAM, Ribeiro LS, Oliveira GV, Pereira JMATK, Mendonça RCS, Assumpção CF. Desenvolvimento de formulação de iogurte de araticum e estudo da aceitação sensorial. *Alim Nutr*. 2008;19(3):277-81.
5. Rocha C, Cobucci RDMA, Maitan VR, Silva OC. Elaboração e avaliação de iogurte sabor frutos do cerrado. *Bol CEPPA*. 2008;26(2):255-66. <http://dx.doi.org/10.5380/cep.v26i2.13280>
6. Ramos AM, Benevides SD, Perez R. Manual de Boas Práticas de Fabricação (BPF) para indústrias processadoras de polpa de frutas. Visconde do Rio Branco-MG: Suprema Gráfica e Editora; 2010.
7. Brasil. Resolução Normativa nº 12/78. Aprova Normas Técnicas Especiais do Estado de São Paulo, relativa a alimentos e bebidas. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, 1978. 11.525 p.
8. Brasil. Instrução Normativa MAA. Regulamento técnico general para fixação dos padrões de identidade e qualidade para polpa de fruta. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, 2000. 54-58 p.
9. Brasil. Resolução RDC nº 12. Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*. Brasília, DF, 2001. 45-53 p.
10. Elez-Martínez P, Martín-Belloso O. Effects of high intensity pulsed electric field processing conditions on vitamin C and antioxidant capacity of orange juice and gazpacho, a cold vegetable soup. *Food Chem*. 2007;102(1):201-9. doi:10.1016/j.foodchem.2006.04.048
11. Fellows PJ. Tecnologia do processamento de alimentos: princípios e prática. Porto Alegre: ARTMED; 2008.
12. Ambrósio CLB, Campos FACS, Faro ZP. Carotenóides como alternativa contra a hipovitaminose A. *Rev Nutr*. 2006; 19(2):233-43. <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-52732006000200010>

13. Rodriguez-Amaya DB, Kimura M. HaverstPlus handbook for carotenoid analysis. Washington: International Food Policy Research Institute; 2004. 58 p.
14. Williams AW, Boileau TWM, Zhou JR, Clinton SK, Erdman JW. Beta-carotene modulates human prostate cancer cell growth and may undergo intracellular metabolism to retinol. *J Nutr*. 2000;130(4):728-32.
15. Mursu J, Nurmi T, Tuomainen TP, Salonen JT, Pukkala E, Voutilainen S. Intake of flavonoids and risk of cancer in Finnish men: The Kuopio Ischaemic Heart Disease risk factor study. *Int J Cancer*. 2008;123(3):660-3. doi: 10.1002/ijc.23421.
16. Krinsky NI, Johnson EJ. Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Mol Aspects Med*. 2005;26(6):459-516. doi:10.1016/j.mam.2005.10.001
17. Stahl W, Sies H. Carotenoids and Protection against Solar UV Radiation. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*. 2002;15(5):291-6. doi:10.1159/000064532
18. Tapiero H, Townsend DM, Tew KD. The role of carotenoids in the prevention of human pathologies. *Biomed Pharmacother*. 2004;58(2):100-10. doi:10.1016/j.biopha.2003.12.006
19. Rivas A, Rodrigo D, Martínez A, Barbosa-Cánovas G, Rodrigo M. Effect of PEF and heat pasteurization on the physical-chemical characteristics of blended orange and carrot juice. *LWT-Food Sci Technol*. 2006;39(10):1163-70. doi:10.1016/j.lwt.2005.07.002
20. Instituto Adolfo Lutz. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz; 2005.
21. Kimura M, Rodriguez-Amaya DB. A scheme for obtaining standards and HPLC quantification of leafy vegetable carotenoids. *Food Chem*. 2002;78(3):389-98. doi:10.1016/S0308-8146(02)00203-0
22. Pinheiro-Sant'Ana HM, Stringheta PC, Brandão SCC, Azeredo RMC. Carotenoid retention and vitamin A value in carrot (*Daucus carota* L.) prepared by food service. *Food Chem*. 1998;61(1-2):145-51. doi:10.1016/S0308-8146(97)00084-8
23. US Institute of Medicine. Dietary Reference Intakes (DRIs): vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium and zinc. Washington, D.C.: National Academy Press; 2001.
24. Cardoso LM, Martino HSD, Moreira AVB, Ribeiro SMR, Pinheiro-Sant'Ana HM. Cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.) of the Cerrado of Minas Gerais, Brazil: Physical and chemical characterization, carotenoids and vitamins. *Food Res Int*. 2011;44(7):2151-4. doi:10.1016/j.foodres.2011.03.005
25. Hamacek FR, Santos PRG, Cardoso LdM, Ribeiro SMR, Pinheiro-Sant'Ana HM. 'Araçá of Cerrado' from the Brazilian Savannah: physical characteristics, chemical composition, and content of carotenoids and vitamins. *Fruits*. 2013;68(6):467-81. doi: http://dx.doi.org/10.1051/fruits/2013095
26. Cardoso LM, Reis BL, Oliveira DS, Pinheiro-Sant'Ana HM. Mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) from the Brazilian Cerrado: nutritional value, carotenoids and antioxidant vitamins. *Fruits*. 2014;69(2):89-99. doi: http://dx.doi.org/10.1051/fruits/2013105
27. Rodriguez-Amaya DB. *Aguidetocarotenoidanalysisinfoods*. 6 ed. Washington: International Life Sciences Institute; 1999.
28. Pénicaud C, Achir N, Dhuique-Mayer C, Dornier M, Bohuon P. Degradation of β -carotene during fruit and vegetable processing or storage: reaction mechanisms and kinetic aspects: a review. *Fruits*. 2011;66(06):417-40. doi: http://dx.doi.org/10.1051/fruits/2011058
29. Lima RMT, Figueiredo RW, Maia GA, Sousa PHM, Figueiredo EAT, Rodrigues CS. Estabilidade química, físico-química e microbiológica de polpas de acerola pasteurizadas e não-pasteurizadas de cultivo orgânico. *Ciênc Rural*. 2012;42(2):367-73. http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782012005000005
30. Damiani C, Lage ME, Silva FA, Pereira DEP, Becker FS, Boas EVBV. Changes in the physicochemical and microbiological properties of frozen araçá pulp during storage. *Food Sci Technol*. 2013;33(supl 1):19-27. http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612013000500004
31. Lin CH, Chen BH. Stability of carotenoids in tomato juice during storage. *Food Chem*. 2005;90(4):837-46. doi:10.1016/j.foodchem.2004.05.031
32. Zepka LQ, Borsarelli CD, da Silva MAA, Mercadante AZ. Thermal degradation kinetics of carotenoids in a cashew apple juice model and its impact on the system color. *J Agric Food Chem*. 2009;57(17):7841-5. doi: 10.1021/jf900558a.

Qualidade nutricional e aceitabilidade de barras de cereais formuladas com casca e semente de goiaba

Nutritional quality and acceptability of the guava peel and seed-added cereal bars

RIALA6/1635

Bruna Sampaio ROBERTO^{1*}, Leila Picolli da SILVA², Fernanda Teixeira MACAGNAN³, Marília BIZZANI³, Ana Betine Beutinger BENDER³

*Endereço para correspondência: ¹Laboratório de Bioquímica, Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Av. Campus Universitário Zeferino Vaz SN, Cidade Universitária, Campinas, São Paulo, Brasil, CEP: 13083-970. Tel: (19) 3521-2175. E-mail: bruna_sampaio@ymail.com.

²Laboratório de Piscicultura, Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

³Laboratório de Piscicultura, Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

Recebido: 15.07.2014 - Aceito para publicação: 13.03.2015

RESUMO

Este trabalho avaliou a utilização de resíduo de goiaba (casca e semente) na formulação de barras de cereais com qualidade nutricional, fonte de fibras e boa aceitabilidade sensorial. Foram formuladas quatro barras de cereais contendo proporções crescentes de resíduos de goiaba em substituição à aveia, flocos de arroz e gergelim (B15 % - 15 % de resíduos nos ingredientes secos, B30 % - 30 % de resíduos nos ingredientes secos, B50 % - 50 % de resíduos nos ingredientes secos e o Padrão - sem resíduos). As formulações foram analisadas quanto aos teores de umidade, cinzas, proteínas, lipídeos, carboidratos totais e fibra alimentar. Foi realizada a Análise Sensorial por meio de testes de aceitação e de ordenação pela preferência. As formulações apresentaram em média 10,93 % de umidade, 60,55 % de carboidratos, 9,62 % de lipídeos, 8,41 % de proteínas e 1,38 % de cinzas. A adição de resíduos às barras de cereais aumentou o teor de fibras e apresentou aceitabilidade satisfatória em todos os atributos sensoriais sem influência significativa ($p \geq 0,05$) da proporção de resíduos, exceto na textura; B50 % demonstrou as menores médias. Não houve preferência por formulações específicas. A adição de resíduos proporcionou produto com qualidade nutricional, incremento de fibras alimentares e aceitabilidade sensorial, que contribuem para valorização de partes do fruto desperdiçadas pelas agroindústrias.

Palavras-chave. resíduo agroindustrial, barra de cereal, composição química, análise sensorial.

ABSTRACT

This study evaluated the use of guava waste (peel and seed) in the cereal bars formulation and getting acceptable nutritional quality, good fiber source and sensory acceptability. Four cereal bars were formulated with increasing proportions of guava waste instead of oats, rice flakes and sesame, being B15 % - 15 % of waste into the dry ingredients, B30 % - 30 % of waste into the dry ingredients, B50 % - 50 % of waste into the dry ingredients and the Standard - without "waste". The formulations were analyzed for moisture, ash, protein, lipids, total carbohydrates and dietary fiber contents. Additionally, tests of acceptance and preference ordering were performed. The cereal bars had in average 10.93 % moisture, 60.55 % carbohydrate, 9.62 % lipid, 8.41 % protein and 1.38 % ash. The addition of waste in cereal bars increased the fiber contents and they showed satisfactory acceptability in all of the sensory attributes. No significant influence of the proportions of waste was observed, except on the texture; and B50 % formulation showed the lowest mean. There was no preference for specific formulations. Guava waste addition into cereal bars provides products with nutritional quality, increased dietary fiber and sensory acceptability, contributing to highly regard to the fruit parts and components wasted by agro-industries.

Keywords. agro-industrial waste, cereal bar, chemical composition, sensory analysis.

INTRODUÇÃO

A demanda por alimentos nutritivos, seguros e funcionais está crescendo mundialmente, e a ingestão de alimentos com alto valor nutricional é a maneira correta de evitar ou mesmo corrigir problemas de saúde, como obesidade, diabetes, desnutrição, cardiopatias, entre outros, que têm origem, em grande parte, nos erros alimentares^{1,2}.

As barras de cereais podem atender a esta tendência já que são elaboradas a partir da extrusão da massa de cereais de sabor adocicado e agradável, são fonte de fibras, vitaminas, sais minerais, proteínas e carboidratos digestíveis². A expansão do mercado de barras de cereais vem se mostrando favorável e no contexto de produtos saudáveis tem levado a indústria alimentícia à diversificação de sabores e atributos dos mesmos³. O crescimento da comercialização desse produto é decorrente do resgate de hábitos alimentares saudáveis, bem como da recomendação do consumo regular de fibras por nutricionistas e órgãos oficiais. Este incentivo está baseado na constatação de que as fibras, embora não forneçam energia, são responsáveis por alterações benéficas nas funções gastrointestinais, regulando os níveis plasmáticos de glicose, colesterol e triacilgliceróis^{4,7}, desta forma, controlando e/ou diminuindo o risco de certas doenças crônicas e degenerativas⁷. Em uma dieta equilibrada, sua ingestão pode reduzir o risco de algumas doenças, como as coronarianas e certos tipos de câncer⁸.

Admitindo atributos sensoriais e benefícios à saúde, é pertinente reportar a necessidade em pesquisar novos ingredientes alimentícios, que permitam melhorar a qualidade nutricional a baixo custo e ampla aplicabilidade industrial. Nesse contexto, as indústrias beneficiadoras de frutas produzem grandes quantidades de resíduos que podem ser aplicados em benefício da saúde humana⁹, por apresentarem elevadas taxas de proteínas, fibras, minerais e vitamina C^{10,11}. Além disso, o aproveitamento racional de tais resíduos contribuirá para reduzir seu descarte inadequado e minimizar os efeitos poluentes ao meio ambiente¹².

A goiaba (*Psidium guajava*) pode ser considerada uma alternativa viável para a

transformação de seus resíduos agroindustriais em produtos comercializáveis, devido ao seu alto valor nutritivo em relação aos flocos de arroz, gergelim e aveia, constituintes normalmente utilizados em barras de cereais, à sua excelente aceitação do consumo *in natura*, às suas características de sabor apreciadas para o consumo¹³ e, sobretudo, pela facilidade de manipulação de seus resíduos¹⁴. Considerando o exposto, este trabalho foi conduzido com a proposta de avaliar a utilização do resíduo industrial de goiaba, casca e semente (não foi encontrado na literatura risco toxicológico desta), na formulação de barra de cereais como fonte de fibras, que se caracteriza por produto sólido com mínimo de 3 % de fibras¹⁵, e aceitação sensorial satisfatória.

MATERIAL E MÉTODOS

Matéria-Prima

Para extração de casca e sementes de goiaba, foram utilizados frutos do genótipo de polpa vermelha *Psidium guajava* "Paluma", obtidos de cultivo orgânico, produzidos na área experimental do Colégio Politécnico da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria/RS.

Os frutos, colhidos no início da maturação, foram lavados um a um em água corrente. Posteriormente, foram submersos durante 15 minutos em solução preparada com 10 mL de hipoclorito de sódio (2,5 %) em um litro de água e foram novamente enxaguados a fim de retirar os resíduos de cloro. Em seguida, foram separadas manualmente em casca e sementes. As frações casca e semente foram secas em estufa de circulação de ar (55 °C) por 72 h e 2 h, respectivamente, para permitir a moagem em micromoinho (0,5 mm a 0,3 mm). O material foi armazenado em sacos plásticos, sob congelamento, até o momento da confecção das barras de cereais. A composição química dos resíduos utilizados está descrita na Tabela 1.

Os ingredientes complementares para a elaboração das barras de cereais (xarope, sacarose, gordura, lecitina de soja, castanha, flocos de arroz, aveia, gergelim, uva passa, essência de baunilha e chocolate) foram obtidos no comércio da cidade de Santa Maria/RS.

Tabela 1. Composição química da farinha da casca e da semente de goiaba

Parâmetros	Porcentagem na matéria seca	
	Casca	Semente
Proteína	4,4 ± 0,09	9,6 ± 0,21
Fibra Total	54,49 ± 1,04	64,73 ± 1,33
Fibra Insolúvel	39,46 ± 0,88	59,59 ± 0,67
Fibra Solúvel	15,03 ± 0,41	5,13 ± 0,37
Lipídios	1,27 ± 0,11	11,3 ± 0,15
Cinzas	3,42 ± 0,17	0,82 ± 0,22
Umidade	13,93 ± 0,59	5,87 ± 0,45

Resultados expressos em base úmida (média ± desvio padrão)

Elaboração das barras de cereais

Foram elaboradas quatro formulações de barra de cereais com crescentes proporções de substituição das fontes de fibras (flocos de arroz, aveia e gergelim) de uma formulação padrão de barra de cereal por farinha de casca de goiaba e farinha de semente de goiaba, perfazendo 15 %, 30 % e 50 % de substituição dos ingredientes secos. As formulações teste foram desenvolvidas a fim de obter um produto com maior aporte de fibras e com características sensoriais aceitáveis.

Como ingredientes para elaboração das barras de cereal, foram utilizados, além dos resíduos de goiaba, xarope de milho, gordura vegetal, sacarose, lecitina, castanha, flocos de arroz, aveia, gergelim, uva passa, essência de baunilha e chocolate (Tabela 2).

Inicialmente a castanha, flocos de arroz,

aveia e gergelim foram tostados em forno a 180 °C durante 15 minutos. Após, aqueceu-se o xarope, gordura vegetal, sacarose e lecitina em fogo brando (180 °C) até atingir “ponto de fio”. Em seguida, incorporaram-se os ingredientes tostados, a essência, as farinhas de casca e de semente de goiaba, misturando todos os ingredientes durante 2 minutos. Colocou-se a massa em forma refratária coberta com papel vegetal, para prensagem até espessura aproximada de 1,5 cm e moldagem da barra de cereal, deixando-a firme e lisa. O chocolate derretido em banho-maria foi colocado sobre essa massa, que, após repouso por cerca de 3 h, foi cortada em cubos e embalada em papel alumínio. As barras de cereais foram elaboradas com formato quadrangular, com boas características sensoriais e semelhantes ao produto convencional encontrado no mercado.

Tabela 2. Formulação utilizada na elaboração das barras de cereal

INGREDIENTES	Padrão	B15 %	B30 %	B50 %
XAROPE DE AGLUTINAÇÃO				
	g %			
Xarope	31,00	31,00	31,00	31,00
Gordura	1,20	1,20	1,20	1,20
Sacarose	5,30	5,30	5,30	5,30
Lecitina	1,00	1,00	1,00	1,00
Total	38,5 %	38,5 %	38,5 %	38,5 %
INGREDIENTES SECOS				
	g %			
Castanha	1,00	1,00	1,00	1,00
Flocos	24,00	19,96	15,50	10,00
Aveia	24,00	19,20	15,50	9,80
Gergelim	4,00	3,20	2,40	1,20
Uva passa	1,10	1,10	1,10	1,10
Casca pó	0,00	4,82	9,30	15,49
Semente pó	0,00	4,82	9,30	15,50
Essência	0,20	0,20	0,20	0,20
Chocolate	7,20	7,20	7,20	7,20
Total	61,5 %	61,5 %	61,5 %	61,5 %

Caracterização química das formulações de barras de cereais

A determinação da composição química das barras de cereais foi realizada de acordo com métodos analíticos propostos pela AOAC¹⁶, em triplicata, sendo a matéria seca (MS) realizada em estufa a 105 °C durante 12 h (método nº 925.09 da AOAC); cinzas (CZ) por incineração em mufla a 550 °C por 5 h (método nº 923.03); o teor de proteína bruta determinado pelo método de Kjeldahl ($N \times 6,25$), nº 920.87 e o teor de fibra alimentar determinado conforme o método enzimático-gravimétrico 991.43, obtendo-se as frações de fibra alimentar total (FT), solúvel (FS) e insolúvel (FI) das amostras de barras de cereais, sendo que o conteúdo de fibra solúvel foi determinado observando-se a diferença entre fibra total e insolúvel.

O teor de lipídeos das barras de cereais foi determinado pelo método de Bligh e Dyer¹⁷, os carboidratos destas, foram estimados por diferença, subtraindo-se de cem os valores obtidos para umidade, proteínas, lipídios, fibra alimentar e cinzas. Para determinar o valor energético das barras de cereais, foram considerados os fatores de conversão de Atwater segundo Wilson, Santos e Vieira¹⁸ de 4 kcal/g de proteína, 4 kcal/g de carboidrato e 9 kcal/g de lipídeo.

Análise Sensorial

Para a avaliação sensorial, o projeto foi submetido à aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UFSM, sob número do processo: 23081.015/2011-00, sendo aprovado (CAAE: 0171.0.243.000-11) em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes estabelecidas na Resolução 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde.

As formulações teste foram submetidas aos testes: afetivo de aceitação e de ordenação quanto à preferência. Os testes foram realizados em sala com cabines individuais, no laboratório de Análise Sensorial do Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos da UFSM, conduzido em grupo de 50 adultos não treinados, de ambos os sexos. No teste afetivo de aceitação as amostras foram apresentadas de forma monádica separadamente e codificadas com número de três dígitos aleatórios. O grupo de provadores avaliou cada amostra quanto aos atributos cor, aroma, sabor, textura (sensação na

boca), utilizando uma escala hedônica de 7 pontos (1 = desgostei muitíssimo, 4 = indiferente e 7 = gostei muitíssimo), além de avaliar a aceitação global do produto, atribuindo uma nota desta escala hedônica de 7 pontos citada anteriormente¹⁹.

O teste de ordenação quanto à preferência foi realizado em dia distinto da primeira análise. Nesse teste, as três amostras codificadas aleatoriamente com algarismos de três dígitos e, foram apresentadas ao provador para que ele as ordenasse conforme a intensidade de sua preferência (mais preferida, intermediária e menos preferida)¹⁹.

Análise estatística

Os dados das análises químicas e afetivo de aceitação das formulações de barras de cereais foram expressos por meio de média, desvio-padrão e submetidos à análise de variância (ANOVA). A análise comparativa dos resultados foi realizada por meio do teste de Tukey ao nível de significância de 5 %, utilizando-se o *software* SPSS versão 8.0. O teste de ordenação por preferência foi avaliado através do teste de Friedman, utilizando a tabela de Newell e MacFarlane²⁰ para verificar se existe diferença entre as amostras.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Composição química das formulações de barra de cereal

Na Tabela 3, é possível visualizar os resultados da análise química das barras de cereais formuladas com 15 %, 30 % e 50 % de substituição das fontes de fibra por casca e semente de goiaba, assim como a composição da formulação padrão (sem acréscimo dos resíduos).

A umidade das formulações testadas variou entre 9,14 % a 13,71 %, apresentando valores estatisticamente inferiores aos da formulação padrão (14,5 %), mas todas em concordância com o valor de 15 % regulamentado pela legislação, Resolução CNNPA nº12 de 1978, referente aos produtos à base de cereais²¹. Através dos resultados obtidos por Gutkoski et al¹, observa-se que a umidade de barras de cereais aumenta com as reduções de sacarose e da concentração de fibra alimentar, ratificando a menor umidade para amostras contendo casca e sementes de goiaba, que incrementaram a porção fibrosa das barras.

Tabela 3. Composição química das formulações de barras de cereais

Parâmetro	B15 %	B30 %	B50 %	Padrão
Umidade	9,14 ± 0,16 ^d	13,71 ± 0,09 ^b	9,94 ± 0,16 ^c	14,50 ± 0,07 ^a
Cinzas	1,28 ± 0,00 ^c	1,41 ± 0,01 ^b	1,45 ± 0,01 ^a	1,13 ± 0,01 ^d
Proteína	8,08 ± 0,26 ^{ab}	8,70 ± 0,05 ^a	8,46 ± 0,08 ^{ab}	7,95 ± 0,14 ^c
Lipídios	9,50 ± 0,17 ^b	10,13 ± 0,86 ^b	9,22 ± 0,46 ^b	12,75 ± 0,22 ^a
Fibra Total	15,41 ± 3,51 ^{ab}	19,94 ± 3,22 ^a	24,71 ± 2,95 ^a	7,6 ± 0,37 ^b
Fibra Insolúvel	8,23 ± 1,51 ^{bc}	14,45 ± 1,27 ^{ab}	19,22 ± 3,82 ^a	4,46 ± 0,09 ^c
Fibra Solúvel	7,18 ± 1,99 ^{ns}	5,48 ± 1,93 ^{ns}	5,49 ± 0,87 ^{ns}	3,1 ± 0,28 ^{ns}
Carboidratos	65,72 ± 3,94 ^{ab}	59,80 ± 4,02 ^{ab}	56,14 ± 2,58 ^b	70,55 ± 0,44 ^a
Valor Calórico	380,73 ± 13,19 ^b	365,21 ± 8,51 ^b	341,43 ± 14,15 ^b	428,72 ± 0,39 ^a

ns: não significativo ($p \leq 0,05$); Médias com letras iguais na mesma linha não diferem entre si ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey; Resultados expressos em porcentagem de base úmida (média ± desvio padrão); Teor de carboidratos calculado por diferença excluindo as fibras; Valor calórico expresso em kcal/100 g da barra de cereal

Em relação aos nutrientes analisados, as formulações teste apresentaram comportamento favorável na maioria dos parâmetros avaliados, principalmente observando o crescimento no valor de fibra alimentar. As formulações teste apresentaram valores de cinzas, que correspondem aos teores de minerais, superiores ao valor da formulação padrão diferindo estatisticamente entre si ($p < 0,05$), assemelhando-se aos encontrados na literatura para barras de cereais, cujos valores em $g \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ foram 1,13²²; 1,40 a 1,61²³; 1,18 a 1,21²⁴. O fator desencadeante do melhor aporte de minerais foi a casca utilizada nas substituições, com 3,42 % de minerais, aliado ao baixo teor de minerais presente no arroz e na aveia, uma vez que o conteúdo de cinzas totais em cereais pode variar de 0,3 a 3,3 $g/100 \text{ g}^{-1}$ ²⁵. Considerando a disposição de proteínas nas formulações, casca e semente proporcionaram aumento de 1,63 % a 9,43 % no aporte proteico, comparado à formulação padrão. Esse efeito se deve ao maior teor de proteínas da semente, substituta dos flocos de arroz que apresentam menor teor proteico. Os resultados são maiores quanto à formulação de barras de cereais apresentadas por Guimarães e Silva²⁶ e Silva et al²⁷ e menores que as formulações com polpa de Baru²⁸.

Ao avaliar o teor de lipídios, fração mais calórica dos constituintes presentes nos alimentos e em especial, há maior rigor quando se trata de alimentos funcionais ou de reduzido valor calórico¹. A formulação padrão apresentou valor lipídico superior aos valores das formulações teste que não diferiram entre si. O alto valor encontrado pode ser explicado pela maior concentração de aveia na

formulação padrão visto que este cereal contribui com conteúdo de óleo entre 4,00 e 11,00 %²⁹ e pelo alto teor de lipídios do gergelim representando em torno de 50 % de sua composição³⁰.

As barras de cereais apresentaram elevação no teor de fibras à medida que se aumentou o percentual de resíduos, favorecendo as formulações B30 % e B50 % não apresentando diferença significativa ($p \geq 0,05$) entre si, a formulação B15 % não diferiu estatisticamente ($p \geq 0,05$) do padrão. Ressalta-se a importância desses resultados sabendo da carência do consumo de fibras pela população e de que várias doenças, como câncer de cólon e do reto, câncer de mama, diabetes, aterosclerose, apendicite, doença de Crohn, síndrome do intestino irritável, hemorroidas e diverticulite têm sido relacionadas com uma baixa ingestão de fibras alimentares¹. Os elevados teores de fibras alimentares permitem afirmar que as barras de cereais estudadas podem ser denominadas de alimento funcional de acordo com a legislação brasileira¹⁵, uma vez que se obteve formulações classificadas como ricas em fibras alimentares, que exige mínimo de 6 g de fibras/100 g (para alimentos sólidos) para tal classificação. As formulações testadas apresentaram teor de fibras alimentares de 2 a 3,8 vezes superior aos teores de fibras reportados por Guimarães e Silva²⁶ em suas barras de cereais com murici-passa. Ao comparar as barras de cereais já existentes no mercado, como as de frutas vermelhas com chocolate, que possuem 4,9 g de fibras em porção de 25 g (tamanho convencional de uma barra de cereal), as propostas de B30 % e B50 % fornecem 5,0 g e 6,1 g fibras por unidade de 25 gramas, respectivamente, atendendo

às expectativas do consumidor. Adicionalmente, a ingestão de uma unidade de 25 g de qualquer produto testado perfaz, no mínimo, 12 % da ingestão diária necessária de fibras, admitindo a formulação B15 % e a ingestão diária recomendada de 30 g (RDA: 25 g a 30 g)³¹. Deve-se salientar o ponto crucial deste aumento da fibra alimentar que ocorreu devido ao incremento notório das fibras insolúveis nas formulações teste. O teor variou de 8,23 % a 19,22 % entre os produtos testados, potencializado com o maior incremento de casca e semente em vista de serem materiais ricos na porção insolúvel das fibras. Essa porção das fibras age sobre a motilidade e sobre o tônus da musculatura do cólon, regulando o tempo de permanência do seu conteúdo e aumentando o volume fecal³². De fato, o aumento de volume de fezes reduz o tempo de trânsito, corrige a constipação e inibe alterações patológicas no intestino e no cólon, diminuindo o risco do aparecimento de hemorroidas ou de câncer ligado à presença de substâncias carcinogênicas estacionadas nessa fração do intestino por tempo mais ou menos longo, tais como NH₃ e ácidos biliares degradados³³. A porção solúvel, responsável por retardar o esvaziamento gástrico, a absorção da glicose e por reduzir o colesterol no soro sanguíneo^{34,35}, não teve resposta significativa na substituição das fontes de fibras por ingredientes secos de casca e semente de goiaba, embora a formulação B15 % tenha apresentado valores numericamente maiores. Resultados semelhantes podem ser explicados pela alta representatividade

da fibra solúvel, como β -glicanas na aveia³⁶. Por outro lado, a formulação B30 % teve a melhor relação fibras solúveis/insolúveis, que, conforme Figuerola et al³⁷, a relação recomendada para uma boa dieta é de 1:2. Com base apenas nessa relação, a aplicabilidade dietética dessa formulação seria melhor indicada.

Como observado na Tabela 3, houve decréscimo do valor calórico à medida que se adicionou resíduos da industrialização da goiaba às formulações, perfazendo redução energética de 11,2 % a 20,4 %, o que foi decorrente do incremento de fibras nas formulações, no entanto as amostras enriquecidas não diferiram entre si ($p \geq 0,05$) mas diferiram da amostras padrão ($p < 0,05$). Em estudo de Silva et al²⁷, avaliando barra de cereal com resíduo de maracujá, o comportamento calórico foi condizente com o presente estudo, encontrando valores de 363,9 e 344,2 kcal.100 g⁻¹, sendo a barra com adição de fibras advindas do resíduo capaz de reduzir o valor calórico do produto em 5,4 %.

Análise sensorial

Análise sensorial é uma metodologia destinada a avaliar a aceitação de produtos no mercado, pesquisando os gostos e as preferências de consumidores. Com base nos resultados, é possível medir, avaliar e interpretar a percepção sensorial em relação ao produto analisado. O teste realizado pelo grupo de 50 adultos não treinados demonstrou boa aceitabilidade das formulações testadas para todas as características avaliadas (Tabela 4).

Tabela 4. Valores médios da escala hedônica de 1 a 7 referentes a cor, aroma, sabor, textura e aceitação global em formulações de barras de cereais

Médias	B15 %	B30 %	B50 %	<i>p</i>
Cor	5,78 ± 0,79 ^{ns}	5,64 ± 0,80 ^{ns}	5,58 ± 0,95 ^{ns}	0,469
Aroma	5,80 ± 0,76 ^{ns}	5,78 ± 0,81 ^{ns}	5,80 ± 1,07 ^{ns}	0,602
Sabor	5,58 ± 1,27 ^{ns}	5,60 ± 1,03 ^{ns}	5,42 ± 1,07 ^{ns}	0,322
Textura	5,70 ± 0,99 ^a	5,96 ± 0,86 ^a	5,06 ± 1,08 ^b	0,296
Aceitação Global	5,68 ± 0,91 ^{ns}	5,72 ± 0,72 ^{ns}	5,52 ± 0,78 ^{ns}	0,438

ns: médias não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5 % de significância; Médias com letras diferentes na mesma linha diferem entre si ($p \leq 0,05$) pelo teste de Tukey

Não houve diferença significativa ($p \geq 0,05$) nos atributos testados, exceto na textura, entre as formulações de barras de cereais, mostrando grande similaridade das amostras testadas. Esse fato demonstra que a casca e a semente adicionadas na barra de cereal acentuam a textura das barras, porém não são suficientes para alterar substancialmente os outros atributos sensoriais, resultando em produtos com boa qualidade sensorial e com a vantagem de serem alimentos funcionais (maior aporte de fibra).

Nota-se que o possível escurecimento enzimático e caramelização da sacarose não afetaram a aceitabilidade quanto à cor das barras. O aroma condizente com a casca da goiaba foi visivelmente aceito pelos provadores oscilando entre médias de 5,78 a 5,80.

O sabor é uma das características principais para a boa aceitação. Preconiza-se, neste parâmetro, conservar as características particulares do produto tradicional, no caso barra de cereal. As formulações desenvolvidas obtiveram as menores médias em relação ao sabor, comportamento também analisado em barras de cereais com resíduo de maracujá²⁷. As médias variaram entre 5,42 e 5,60 não apresentando diferença significativa ($p \geq 0,05$), indicando que o maior aporte de fibras e o aumento da adstringência das barras, atribuído à presença de taninos³⁸, ao incorporar o resíduo nas formulações, interferiram de forma similar na aceitabilidade do sabor das formulações.

A textura pode ser designada como atributo físico, perceptível pelos receptores mecânicos, táteis e eventualmente pelos receptores visuais e auditivos. Segundo Bourne³⁹, esse parâmetro é o principal fator de rejeição em um produto e, neste estudo, foi o único parâmetro que apresentou diferença significativa ($p < 0,05$), admitindo que a maior quantidade adicionada de resíduos, B50 %, altera a textura da formulação, ainda que esta concentração testada não desclassifique o produto, com média de 5,06. Os valores discrepantes quanto à textura relacionam-se com o maior percentual de fibras, que segundo Izzo e Niness²,

a adição de fibra na formulação normalmente aumenta a dureza das barras de cereais, afetando diretamente sua textura e, possivelmente, com a adstringência proporcionada pelos taninos, como já observada.

Analisando a aceitação global, as médias ficaram acima da intersecção que classifica as formulações como aceitáveis, embora não tenham apresentado diferença significativa ($p \geq 0,05$). Observa-se que a formulação B30 % apresenta numericamente a maior aceitação global, 5,72. Para a amostra B50 %, há a tendência de menor média, 5,52. Visivelmente as formulações são favoráveis em relação à formulação proposta por Silva et al²⁷ com resíduo de maracujá o qual sofreu alteração negativa significativa na avaliação global com a maior adição (40 %) de resíduo.

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstraram que as formulações propostas apresentam viabilidade tecnológica, de forma a garantir qualidade sensorial, além de serem condizentes com as exigências dos consumidores atuais que desejam produtos com qualidade sensorial, nutricional, e que agreguem benefícios à saúde, com baixo custo.

Na avaliação sensorial pelo teste de ordenação, comparando-se os módulos da diferença com a DMS (diferença mínima significativa) de 24, conforme a tabela de Newell e MacFarlane²⁰, não houve diferença estatística significativa entre as amostras ao nível de 5 % de significância. Para melhor visualização dos resultados, o número de vezes escolhido em cada ordem foi transformado em escala percentual na construção do gráfico de perfil de preferência (Figura 1). Assim, verificou-se que a amostra B15 % ficou em primeiro lugar o maior número de vezes, porém a formulação com maior incidência nas mais preferidas foi observada na amostra B30 %, a qual, embora tenha sido mais frequentemente escolhida como preferência secundária, poucas vezes foi escolhida como a pior amostra, ratificando os resultados encontrados na aceitação global dos produtos.

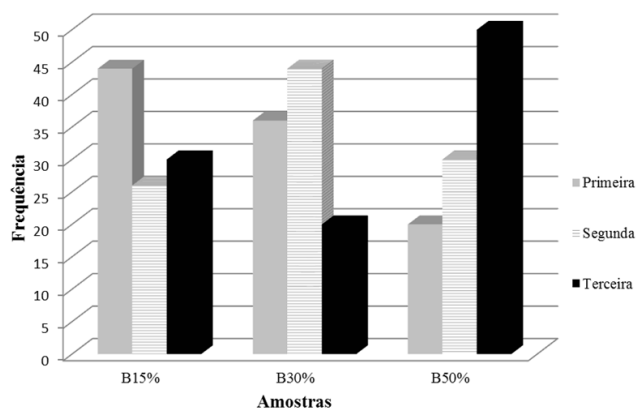


Figura 1. Frequência das ordens das formulações de barras de cereais pela avaliação dos provedores

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que os percentuais de resíduo da industrialização da goiaba (casca e semente) utilizados aliam viabilidade tecnológica e nutricional às formulações de barra de cereal, apresentando incremento no teor de fibra alimentar, baixo valor lipídico e calórico, características sensoriais satisfatórias de modo que garantiram boa aceitação pelos provedores. Permite-se concluir também que o maior teor de casca e sementes nas barras de cereais não afetam a preferência dos consumidores.

Portanto, essas constatações tornam-se satisfatórias à medida que destacam novas fontes de fibras, desenvolvimento de novos produtos funcionais com baixo custo e potencial solução para o descarte de resíduos agroindustriais de goiaba.

REFERÊNCIAS

1. Gutkoski LC, Bonamigo JMA, Teixeira DMF, Pedó I. Desenvolvimento de barras de cereais à base de aveia com alto teor de fibra alimentar. *Ciênc Tecnol Alim*. 2007;27(2):355-63.
2. Izzo M, Niness, K. Formulating nutrition bars with inulin and oligofructose. *Cereal Foods World*. 2001; 46(3):102-6.
3. Sampaio CRP, Ferreira, SMR, Canniatti-Brazaca SG. Perfil sensorial e aceitabilidade de barras de cereais fortificadas com ferro. *Alim Nutr*. 2009; 20(1): 95-106.
4. López G, Ros G, Rincón F, Periago MJ, Martínez C, Ortuño J. Propiedades funcionales de la fibra dietética. Mecanismos de acción en el tracto gastrointestinal. *Arch Latinoam Nutr*. 1997; 47(3): 203-7.
5. Penteadó RLB. Fibras vegetais na alimentação humana. *Bol SBCTA*. 1995; 15(3): 279-302.
6. Schinell M. Efectos de la fibra dietética sobre la absorción de glucosa. *Bol Inform Riare*. 1995; (5): 22-30.
7. Stella R. Fibras para seu intestino. 2004. [acesso 2011 Out]. Disponível em: http://www1.uol.com.br/cyberdiet/colunas/010921_nut_fibra_intestino.htm.
8. Anjo DFC. Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular. *J Vasc Br*. 2004; 3(2):145-54.
9. Silva Filho JCS, Armelin MAJA, Silva AG. Determinação da composição mineral de subprodutos agroindustriais utilizados na alimentação animal pela técnica de ativação neurônica. *Pesq Agropec Bras*. 1999; 34(2):235-41.
10. Pereira FM, Carvalho CA, Nachtigal JC. Século XXI: nova cultivar de goiabeira de dupla finalidade. *Rev Bras Frutic*. 2003; 25(3):498-500.

11. Uchoa AMA, Costa JMC, Maia GA, Silva EMC, Carvalho AFFU, Meira TR. Parâmetros físico-químicos, teor de fibra bruta e alimentar de pós alimentícios obtidos de resíduos de frutas tropicais. *Seg Alim Nutr*. 2008; 15(2):58-65.
12. Neto ACG, Silveira A, Pezzato LE, Barros MM, Padovani CR. Subproduto da indústria de gelatina como sucedâneo protéico na alimentação da Tilápia do Nilo. *In: Simpósio Latinoamericano de Aqüicultura*, 6. Simpósio Brasileiro de Aqüicultura, 5; 1988; Florianópolis, SC: Resumos, Florianópolis, Abraq.
13. Silva DS. Estabilidade de suco tropical de goiaba (*Psidium guajava* L.) não-adoçado obtido pelos processos de Enchimento a quente e asséptico [dissertação de mestrado]. Fortaleza (CE): Universidade Federal do Ceará; 2007.
14. Neiva JNM, Vieira NF, Pimentel JCM, Gonçalves JS, Oliveira Filho GS, Lôbo RNB et al. Avaliação do valor nutritivo de silagens de capim elefante (*Pennisetum purpureum*) com diferentes níveis de subproduto da goiaba *In: 39a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia*, Recife. Anais, SBZ. 2002. CD ROM.
15. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 27, de 13 de janeiro de 1998. Regulamento técnico referente à informação nutricional complementar. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, p. 1-3. Brasília, 16 jan. 1998 [Acesso 2010 out] Disponível em [<http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=97>].
16. Association of Official Analytical Chemists (AOAC). Official Methods of Analysis of the AOAC International. 16th ed., Supplement 1998. 1018p. Washington: 1995.
17. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*. 1959; (37): 911-7. doi: 10.1139/o59-099
18. Wilson ED, Santos AC, Vieira EC. Energia. *In: Dutra-de-Oliveira, JE, Santos AC, Wilson ED, editors. Nutrição básica*. São Paulo: Sarvier; 1982. p. 79-97.
19. Meilgaard M, Civille GV, Carr BT. Sensory evaluation techniques. 3rd ed. (New York): CRC Press LLC, 1999.
20. Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). NBR 13170. Teste de ordenação em análise sensorial. Rio de Janeiro, 1994.
21. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução CNNPA n. 12, de 1978: Normas Técnicas Especiais. [acesso 2010 março]. Disponível em: [<http://www.anvisa.gov.br>].
22. Brito IP, Campos JM, Sousa TFL, Wakiyama C, Azeredo GA. Elaboração e avaliação global de barras de cereais caseira. *Bol CEPPA*. 2004; 22(1):35-50. <http://dx.doi.org/10.5380/cep.v22i1.1178>
23. Dutcosky SD, Grossman MVE, Silva RSSF, Welsch AK. Combined sensory optimization of a prebiotic cereal product using multicomponent mixture experiments. *Food Chem*. 2006;98(4):630-8. doi:10.1016/j.foodchem.2005.06.029
24. Bueno ROG, Características de qualidade de biscoitos e barras de cereais ricos em fibra alimentar a partir de farinha de semente e polpa de nêspira [dissertação de mestrado]. Curitiba (PR): Universidade Federal do Paraná; 2005.
25. Cecchi HM, Fundamentos Teóricos e Práticos de Análise de Alimentos. 2ª ed. Campinas: UNICAMP; 2003.
26. Guimarães MM, Silva MS. Qualidade nutricional e aceitabilidade de barras de cereais adicionadas de frutos de murici-passa. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2009; 68(3): 426-33.
27. Silva IQ, Oliveira BCF, Lopes AS, Pena RS. Obtenção de barra de cereal dicionada do resíduo industrial de maracujá. *Alim Nutr*. 2009; 20(2):321-9.
28. Lima JCR, Freitas JB, Czedler LP, Fernandes DC, Naves MV. Qualidade microbiológica, aceitabilidade e valor nutricional de barras de cereais formuladas com polpa e amêndoa de baru. *Bol CEPPA*. 2010; 28(2): 331-43. <http://dx.doi.org/10.5380/cep.v28i2.20450>
29. Sarantópoulos CIGL, Oliveira LM, Canavesi E. Requisitos de conservação de alimentos em embalagens flexíveis. Campinas: CETEA / ITAL, 2001.
30. Vieira JD. Cultivo de gergelim. Brasília. Centro de Apoio ao Desenvolvimento Tecnológico – CDT/uNb, 2007
31. Committee On Dietary Allowances, Food And Nutrition Board. Recommended Dietary Allowances (RDA), 10th revised edition, National Academy of Science (NAS), Washington D.C., 1989
32. Read NW. Dietary and bowel transit. *In Vahouny, G.V.; Kritchevsky, D.: Dietary Fiber. Basic and clinical aspects*. Plenum Press, N.York and London, 1986, págs. 81-100.

33. Pourchet-Campos MA. Fibra: A fração que desafia os estudiosos. *Rev Alim Nutr*. 1990; 2: 53-63.
34. Anderson JW. Tratamento nutricional do Diabetes Mellitus. In: Shils ME, Olson JA, Shike M, Ross AC. *Tratado de nutrição moderna na saúde e na doença*. 9ª ed. p. 1473-5. São Paulo: Manole; 2003.
35. Henriques GS, Scorsin NT, Cassim ALO, Simeone MLF. Avaliação da influência dietética de uma ração à base de mix de fibras sobre a glicemia e o perfil metabólico de lipídios em ratos Wistar. *Rev Med Resid*. 2008; 10(2):58-66.
36. Fujita AH, Figueroa MOR. Composição centesimal e teor de β -glucanas e cereais e derivados. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2003; 23(2): 116-20. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612003000200003>
37. Figuerola F, Hurtado ML, Estévez AM, Asenjo ICFA. Fibre concentrates from apple pomace and citrus peel as potential fibres sources for food enrichment. *Food Chem*. 2005; 91(3): 395-401.
38. Iha MS, Migliato KF, Velloso JCR, Sacramento LVS, Pietro RCLR, Isaac VLB et al. Estudo fitoquímico de goiaba (*Psidium guajava* L.) com potencial antioxidante para o desenvolvimento de formulação fitocosmética. *Rev Bras Farmacogn*. 2008; 18(3): 387-93. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2008000300013>
39. Bourne MC. *Food texture and viscosity: Concept and Measurement*. Cornell University, Geneva, New York. Academic Press. May 1986.

Bebidas mistas de extratos de arroz com maracujá e mamão

Mixed drinks prepared with extracts of rice with passion fruit and papaya

RIALA6/1636

Edson Pablo SILVA^{1*}, Fernanda Salomoni BECKER², Flávio Alves da SILVA¹, Manoel Soares SOARES JÚNIOR¹, Márcio CALIARI¹, Clarissa DAMIANI¹

*Endereço para correspondência: ¹Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Escola de Agronomia, Universidade Federal de Goiás. Rodovia Goiânia/Nova Veneza, Km 0, Campus Samambaia, Goiânia, GO, Brasil, CEP: 74690-900. E-mail: edsonpablos@hotmail.com

²Departamento de Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, Brasil.

Recebido: 21.08.2014 - Aceito para publicação: 12.02.2015

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi desenvolver bebidas elaboradas com extratos de arroz (quirera, integral parboilizado e integral) com sabores de mamão e maracujá, e estudar as características físico-químicas, sensoriais e microbiológicas. Foram avaliados custo das formulações, aceitabilidade, contagem de bolores e leveduras, contagem de coliformes a 35 °C e a 45 °C, a presença de *Salmonella* sp e as demais características: composição centesimal, açúcares redutores, fibra alimentar, acidez titulável total, sólidos solúveis e potencial antioxidante. Todas as bebidas podem ser consideradas alimentos funcionais, em função de seus teores de fibra alimentar total. No entanto, na bebida elaborada com o extrato de arroz integral parboilizado foram detectados os maiores teores de fibra alimentar total (2,37 g.100 g⁻¹) e solúvel (1,20 g.100 g⁻¹). A adição de extratos de arroz integral e integral parboilizado tornou a bebida de maracujá e mamão nutricionalmente mais rico em proteínas e lipídios. Todas as bebidas foram aceitas pela população entrevistada com atributo intenção de compra de acima de 90 %, e apresentaram conformidade nos padrões microbiológicos exigidos pela legislação brasileira. A quirera, o arroz integral e o integral parboilizado podem ser utilizados como ingredientes na formulação de bebidas à base de polpa de mamão e maracujá.

Palavras-chave. *Oryza sativa* L., desenvolvimento de produtos, bebidas, intolerância à lactose.

ABSTRACT

This study aimed at developing drinks prepared with extracts of rice, sugar and flavored with papaya and passion fruit pulp, and to evaluate the physical-chemical, chemical, sensory and microbiological characteristics. Cost of formulations, acceptability, yeast and mold counts and coliforms counting at 35 °C and 45 °C and *Salmonella* sp detection were investigated, and the additional features as chemical composition, sugars, dietary fiber, total titratable acidity, soluble solids and antioxidant potential. All of the drinks may be considered as functional foods owing to their total dietary fiber contents. However, the extract prepared with parboiled brown rice showed the highest contents of total dietary fiber (2.37g.100 g⁻¹) and of soluble one (1.20 g.100 g⁻¹). The passion fruit and papaya pulps drink turned out to be nutritionally richer in proteins and lipids, by adding the brown rice and brown parboiled rice. All of the drinks were accepted by the interviewed persons, being the purchase intention > 90 %, and their microbiological standards were in compliance with the Brazilian legislation. Broken rice, brown rice and brown parboiled rice may be used as ingredients in the papaya and passion fruit pulps-based beverages formulations.

Keywords. *Oryza sativa* L., product development, beverage technology, lactose intolerance.

INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor de arroz da América Latina e o décimo maior produtor mundial, com produção anual (safra 2011/2012) de, aproximadamente, 11,66 milhões de toneladas¹.

O arroz é consumido, principalmente, na forma de grãos inteiros, como produto de mesa e seu aproveitamento como matéria-prima para a indústria de transformação é praticamente inexistente, especialmente, quando comparado com a utilização diversificada do produto em vários outros países. Para o consumo de mesa, são conhecidos três tipos de arroz em função da forma de processamento pós-colheita: integral, branco polido e parboilizado. Apesar de ser mais rico em nutrientes que o arroz polido (forma mais apreciada), o arroz integral é pouco consumido, restringindo-se a uma pequena parcela da população com hábitos de consumo mais sofisticados e de maior poder aquisitivo. Já o arroz parboilizado, que sofre tratamento hidrotérmico antes do descascamento, pode ser consumido na forma de parboilizado polido ou parboilizado integral.

As principais etapas do beneficiamento do arroz compreendem o descascamento (20 % da casca e 80 % de arroz integral), a brunição e o polimento (em que são retirados, parcial ou totalmente, o embrião e a maior parte da película que recobre o arroz integral)². Dessa etapa, resulta o farelo (ao redor de 8 % do volume do produto em casca). Logo após, ocorre a separação das frações de grãos quebrados (aproximadamente 14 %) e inteiros (ao redor de 58 %), bem como a classificação dos grãos quebrados em grandes, médios e quirera². Para a indústria de beneficiamento do arroz, a quebra de grãos é de extrema importância econômica, especialmente quando se atenta para a diferença de 80 % na valorização do produto inteiro em relação ao quebrado³. O valor nutricional da quirera é comparável ao do arroz polido, pois somente a forma de apresentação é diferente (quebrado). O parboilizado e o parboilizado integral podem ser mais nutritivos que o polido e o integral, respectivamente, devido ao fato de que

parte do conteúdo de vitaminas e sais minerais (solúveis em água), durante a parboilização, difunde-se no endosperma, caso o processo seja adequadamente controlado. Uma alternativa para ampliar a utilização alimentar da quirera, do arroz integral e do integral parboilizado poderia ser a elaboração de bebidas compostas por extratos destes produtos e polpas de frutas.

O mercado brasileiro de bebidas não alcoólicas está em plena expansão já há alguns anos, particularmente o de sucos e néctares de frutas e de bebidas à base de soja. Entretanto, estas últimas vêm sendo associadas a uma característica negativa, quanto à sua composição, pois possuem ao redor de 15 proteínas que podem causar alergias: a P34 e as globulinas 2S, 7S, e 11S, o que é motivo de preocupação para os especialistas. A alergia alimentar é uma reação anormal em relação a algum componente presente no alimento, principalmente proteínas, provocando reações desagradáveis. Já a proteína do arroz apresenta boa digestibilidade (88 %) e hipoalergenicidade⁴. Assim, uma alternativa para substituir produtos elaborados com extrato de soja, na alimentação de pessoas alérgicas a esta, e/ou intolerantes à lactose, poderia ser o uso de bebidas elaboradas com extratos de arroz, a qual estimularia o consumo de quirera, arroz integral e arroz integral parboilizado. O processo de saborização com frutas já bem conhecidas e difundidas no mercado como o maracujá e o mamão, facilitaria também a inserção deste novo produto desenvolvido, além de, com a incorporação destes às formulações, há-se um ganho em relação ao aporte de substâncias essenciais na dieta humana, dentre as quais poderíamos citar a vitamina C e carotenóides^{5,6}.

Logo, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e avaliar as características físicas, químicas, sensoriais e microbiológicas de bebidas elaboradas com extratos de arroz (quirera, arroz integral e arroz integral parboilizado), saborizadas com mamão e maracujá.

MATERIAL E MÉTODOS

A quirera, o arroz integral, o arroz integral parboilizado, o mamão, o maracujá e o

açúcar foram obtidos em supermercado local. No momento da aquisição, as frutas apresentavam boa qualidade, frescas, compactas, firmes e isentas de doenças.

Os processos para obtenção dos extratos de quirera, arroz integral e arroz integral parboilizado foram análogos (3 tratamentos). Inicialmente, realizou-se lavagem de cada arroz em água potável corrente, a fim de se reduzir ou eliminar sujidades físicas. Logo após, realizou-se o cozimento a 85 °C por 20 minutos (quirera), 85 °C por 30 minutos (arroz integral e arroz parbolizado). Para tal, foram utilizados fogão industrial de quatro bocas e panelas de alumínio com capacidade de 20 L, limpas e sanitizadas com solução de hipoclorito de sódio a concentração de 200 ppm. Nesses recipientes, foram adicionados, separadamente, os grãos de arroz e a quantidade de água estabelecida, conforme o andamento do processo de cozimento, sendo que a água utilizada não foi completamente evaporada. Depois, realizou-se a desintegração em liquidificador doméstico dos grãos cozidos, utilizando a proporção de uma parte de produto cozido para duas partes de água, batendo-se por 5 min até obtenção de misturas homogêneas. Os homogenatos foram filtrados em panos de algodão de malha fina (previamente esterilizados em autoclave), para retirada de qualquer material em suspensão na mistura. O permeado obtido, líquido opaco e esbranquiçado, foi denominado de extrato. A fim de completar o processamento das bebidas, realizou-se a saborização das mesmas, por meio da adição de polpas de mamão e de maracujá. Para tal, em cada bebida, utilizou-se 28 % de extrato (quirera de arroz, arroz integral ou arroz parbolizado), 29 % de polpa de maracujá, 29 % de polpa de mamão e 14 % de açúcar cristal. Liquidificaram-se cada extrato com as polpas de frutas e o açúcar, por cinco minutos, até a total homogeneização dos ingredientes. As bebidas foram pasteurizadas a 65 °C, durante 30 minutos, embaladas em recipientes plásticos de polietileno de alta densidade (PEAD) com tampas rosqueáveis, previamente sanificadas (200 ppm de cloro ativo), e mantidos sob temperatura de refrigeração (5 ± 2 °C), até

avaliação microbiológica e sensorial (6 horas após). Amostras foram congeladas a -18 ± 2 °C para posterior realização das análises físico-químicas.

As análises físico-químicas realizadas foram: umidade, cinzas, pH e proteínas; lipídios; açúcares redutores; carboidratos, foram realizadas conforme AOAC International⁷; valor energético foi estimado conforme os valores de conversão de Atwater descritos em Wilson et al⁸; sólidos solúveis e o conteúdo de fibra alimentar total, solúvel e insolúvel foram determinados segundo AOAC International⁷; a capacidade antioxidante, *in vitro*, foi avaliada pelo teste do DPPH, descrito por Borguini e Torres⁹. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Realizou-se teste de aceitabilidade em supermercado, com 100 consumidores assíduos de bebidas não alcoólicas, não treinados, de ambos os sexos aleatoriamente e diferentes faixas etárias. As amostras foram apresentadas em copos plásticos de 25 mL a uma temperatura de 8 ± 2 °C. Utilizou-se delineamento em blocos casualizados, designando-se de bloco cada provador e escala hedônica estruturada de 9 pontos, sendo 1 (desgostei muitíssimo) e 9 (gostei muitíssimo), para avaliação da aparência, da cor, do aroma e do sabor, além da intenção de compra que foi obtida por meio de resposta afirmativa ou negativa para a aquisição do produto, conforme Della Modesta¹⁰ (Comitê de ética número AAE25753913.6.0000.5083).

Para a avaliação microbiológica das bebidas desenvolvidas foram realizadas as análises do número mais provável por grama de amostra (NMP.g⁻¹) de coliformes totais e coliformes a 45 °C, a presença ou ausência de *Salmonella* sp, e o número de unidades formadoras de colônias (UFC) de bolores e leveduras, segundo as metodologias propostas pelo ICMSF¹¹. Os resultados obtidos foram avaliados por meio de análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste Tukey ($p > 0,05$), utilizando o pacote estatístico SISVAR¹², para análise dos dados. O custo das matérias-primas utilizadas nas formulações foi calculado, utilizando-se os preços do mercado varejista em maio de 2013.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A composição centesimal e o valor energético das bebidas elaboradas com quirera de arroz (BQA), arroz integral (BAI) e arroz integral parboilizado (BAIP) saborizadas com mamão e maracujá estão apresentados na Tabela 1. Os teores de umidade, proteínas, fibra alimentar insolúvel e açúcares redutores, não diferiram ($p > 0,05$) entre os tratamentos. O teor de cinzas foi maior ($p \leq 0,05$) na bebida com arroz integral (BAI) e diferindo apenas da (BQA). O teor de lipídios foi menor ($p \leq 0,05$) na bebida com quirera de arroz e não diferiu entre as demais. Os teores de fibra alimentar total e solúvel diferiram ($p \leq 0,05$) entre todos os tratamentos, assim como o valor energético. O teor de carboidratos totais foi menor na bebida com arroz parboilizado integral, não diferindo entre os demais tratamentos.

As bebidas apresentaram umidade elevada, devendo, obrigatoriamente, passar por processo térmico (pasteurização ou UHT) e ser mantida em temperatura de refrigeração. O arroz, o maracujá e o mamão são boas fontes de minerais, apresentando teores de cinzas de 0,30; 0,50 e 0,88 g.100 g⁻¹ para arroz polido, integral e integral parboilizado cozidos, respectivamente; e de 0,4 g.100 g⁻¹ tanto para mamão como para maracujá, conforme dados da Tabela Brasileira de Composição de Alimentos da Universidade de São Paulo – TBC¹³.

Com relação ao teor de proteína, frutas, em geral, não são boas fontes protéicas. Maeda et al¹⁴,

ao estudarem néctar de camu-camu (*Myrciaria dúbia* McVaugh), encontraram baixo teor deste macro nutriente (0,049 g.100 g⁻¹), porém, muito menor que o das bebidas a base de extratos de arroz, devido, possivelmente, a incorporação da proteína deste cereal, que apresenta, em média, 7 g.100 g⁻¹ no arroz polido e 8-9 g.100 g⁻¹ no integral¹⁵.

O teor de lipídios foi menor na bebida elaborada com extrato de quirera de arroz, pois segundo Vieira e Carvalho¹⁶, o maior percentual de lipídios do grão de arroz se encontra no gérmen e em suas camadas mais periféricas, que são removidas no arroz polido e, conseqüentemente, na quirera de arroz. Assim, a utilização dos extratos de arroz integral e arroz parboilizado integral em bebidas a base de néctar de frutas é uma forma de aumentar seu valor nutricional, pois o arroz integral apresenta índices mais elevados de proteínas, lipídios, fibras, sais minerais como fósforo, ferro e potássio e vitaminas como a tiamina, riboflavina e niacina¹⁷.

A presença de fibras alimentares nos alimentos é de grande interesse na área da saúde, já que têm sido relatados numerosos estudos que relacionam essas com a prevenção de enfermidades. Por outro lado, é importante, também, conhecer o tipo de fibra presente em cada alimento, pelo menos quanto a sua solubilidade em água, tendo em vista que, embora existam efeitos fisiológicos relacionados com a fração fibra total, existem outros, como a redução da colesterolemia e da glicemia, que têm sido mais relacionadas com a fração solúvel da fibra atuando na redução dos níveis de triglicerídeos sanguíneos e são parcialmente metabolizadas por

Tabela 1. Composição centesimal, fibra alimentar e açúcares redutores das bebidas elaboradas com quirera de arroz (BQA), arroz integral (BAI) e arroz integral parboilizado (BAIP) saborizadas mamão e maracujá

Nutriente (g.100 g ⁻¹)	Tratamentos ¹		
	BQA	BAI	BAIP
Umidade	74,8 ± 1,95 ^A	76,58 ± 1,69 ^A	81,27 ± 2,35 ^A
Cinzas	1,16 ± 0,04 ^B	1,55 ± 0,08 ^A	1,42 ± 0,09 ^A
Proteínas	0,45 ± 0,02 ^A	0,48 ± 0,01 ^A	0,47 ± 0,03 ^A
Lipídeos	0,05 ± 0,01 ^B	0,50 ± 0,01 ^A	0,50 ± 0,01 ^A
Fibra alimentar total	1,70 ± 0,10 ^C	2,00 ± 0,10 ^B	2,37 ± 0,15 ^A
Fibra alimentar insolúvel	1,00 ± 0,10 ^A	1,00 ± 0,11 ^A	1,17 ± 0,07 ^A
Fibra alimentar solúvel	0,70 ± 0,00 ^C	1,00 ± 0,00 ^B	1,20 ± 0,10 ^A
Açúcares redutores	11,99 ± 1,14 ^A	11,06 ± 1,37 ^A	11,98 ± 0,10 ^A
Carboidratos	20,07 ± 0,31 ^A	24,06 ± 0,23 ^A	18,93 ± 0,12 ^B
Valor energético*	79,85 ± 2,36 ^C	102,66 ± 18,52 ^A	84,78 ± 1,92 ^B

¹Letras iguais na mesma linha não diferem entre si a 5 % de probabilidade de erro pelo teste Tukey; *Dado em kcal.100 g⁻¹

bactérias presentes na flora intestinal¹⁸. Matsuura et al¹⁹, quantificando os componentes da fibra alimentar do maracujá (*Passiflora edulis*), encontrou 30,7 % de celulose; 27,8 % de pectina; 1,6 % de hemicelulose e 1,1 % de lignina (todos em base seca). Os teores de fibra total e solúvel encontrados na bebida elaborada com extrato de arroz parboilizado integral foram maiores ($p \leq 0,05$) que nas demais. Assim, devido a esse elevado teor de fibra alimentar total, as bebidas elaboradas com extratos de arroz, maracujá e mamão podem ser consideradas como alimentos funcionais, já que, alimentos líquidos com teor de fibras acima de 1,5 g.100 g⁻¹. Entretanto, as mesmas não podem ser consideradas como fonte de fibras uma vez que para essa caracterização, devem ser observados valores acima de 3 g/100 g²⁰. Segundo Marlet et al²¹, em 2002, o consumo de fibras alimentares é de aproximadamente 20 a 35 g por dia, ou 10 a 13 g de fibras/1000 kcal. Na prática, essa quantidade não é alcançada pela maioria dos brasileiros podendo as bebidas servir como uma alternativa para que a população brasileira alcance os níveis de consumo recomendados na dieta diária.

As bebidas a base de extratos de arroz forneceram baixos teores de carboidratos e valor calórico, quando comparados a alguns alimentos que são referidos na TACO²². Iha et al²³, em estudo sobre néctares de maçã, encontraram valores de açúcares redutores entre 4,6 e 11,5 g.100 g⁻¹ e Silva et al²⁴ em néctares de manga entre 6,23 e 10,0 g.100 g⁻¹, além de valor calórico de 113 e 96 kcal.100 g⁻¹ nas respectivas bebidas.

Outras características físico-químicas das bebidas elaboradas com quirera de arroz, arroz integral e arroz integral parabolizado saborizadas com

mamão e maracujá estão apresentados na Tabela 2.

O pH é de suma importância para a formulação de bebidas, uma vez que não deve ser superior a 4,5, visto que acima deste valor pode favorecer o crescimento do *Clostridium botulinum*, caso o produto seja armazenado em vácuo ANVISA²⁰. Neste estudo, verificou-se que as bebidas elaboradas com extratos de arroz apresentaram valores médios de pH abaixo de 4,5, sendo maior nas BAI e BAIP, que não diferiram entre si ($p > 0,05$). Estes valores são maiores que os encontrados em néctar de camu-camu (2,89)¹⁴ e próximos aos valores encontrados em néctar de maçã (3,0-3,5) por Iha et al²³, néctar de manga (3,27-3,53) por Silva et al²⁴ e néctar misto de mamão, maracujá e acerola (3,22-3,49) por Matsuura et al²⁵.

Chitarra e Chitarra²⁶ indicam o teor de sólidos solúveis como parâmetro físico-químico que representa uma das melhores formas de avaliação do grau de doçura de um produto. Segundo a normativa nº12, de 4 de setembro de 2001, néctar de mamão e de maracujá devem possuir teor de sólidos solúveis mínimo de 10 e de 11 °Brix, respectivamente²⁷. Os teores de sólidos solúveis das bebidas elaboradas com extratos de arroz permaneceram entre 17,4 e 22,8 °Brix, mostrando que, com a adição dos extratos de arroz ao néctar misto de maracujá e mamão, ocorreu aumento significativo de sólidos solúveis nos produtos finais. A BQA e BAI apresentaram os maiores teores de sólidos solúveis, diferindo da BAIP. No processo de parboilização ocorrem reações químicas entre os componentes do grão, devido ao efeito catalisador da temperatura, diminuindo a quantidade de substâncias solúveis por lixiviação.

Tabela 2. Características físico-químicas das bebidas elaboradas com quirera de arroz (BQA), arroz integral (BAI) e arroz integral parboilizado (BAIP) saborizadas mamão e maracujá

Características	Tratamentos ¹		
	BQA	BAI	BAIP
pH	3,00 ± 0,04 ^B	3,21 ± 0,03 ^A	3,20 ± 0,05 ^A
Sólidos solúveis*	22,8 ± 0,74 ^A	21,6 ± 0,67 ^A	17,4 ± 0,68 ^B
PA ext. etéreo**	3,05 ± 0,17 ^B	3,88 ± 0,30 ^A	3,55 ± 0,19 ^A
PA ext. aquoso**	6,17 ± 0,30 ^A	4,85 ± 0,23 ^B	6,47 ± 0,41 ^A
PA ext. alcoólico**	3,85 ± 0,21 ^B	2,59 ± 0,23 ^C	4,85 ± 0,38 ^A
PA total**	13,07 ± 0,68 ^B	11,32 ± 0,76 ^C	14,87 ± 0,97 ^A

¹Letras iguais na mesma linha não diferem entre si a 5 % de probabilidade de erro pelo teste Tukey; ^ADado em (°Brix); ^{**}Dado em % de descoloração do radical DPPH; ^{***} potencial antioxidante (PA)

A atividade antioxidante é a medida da capacidade das substâncias extraídas da matriz do alimento de seqüestrarem radicais livres ou de retardarem o processo de oxidação lipídica em um sistema controlado. A presença de diferentes componentes antioxidantes em tecidos vegetais, especialmente, frutas e hortaliças, faz com que seja relativamente difícil mensurar a atividade antioxidante de cada componente separadamente. Desse modo, diversos métodos têm sido desenvolvidos para calcular a atividade antioxidante total das amostras. Os pesquisadores têm testado diferentes solventes e métodos de extração para certificar a máxima solubilização dos antioxidantes⁹. Quanto à atividade antioxidante nas bebidas desenvolvidas neste experimento, BAIP apresentou resultados superiores em relação àqueles apresentados pelas outras formulações. Tal resultado pode ser devido aos diferentes tipos de arroz utilizado nas bebidas desenvolvidas, uma vez que o arroz parbolizado apresenta um teor mais elevado de compostos bioativos atuantes na captura de radicais livres. Pesquisas têm demonstrado o efeito benéfico de compostos fenólicos de diferentes fontes, inclusive do arroz, na saúde humana. Este efeito decorre de sua ação antioxidante, auxiliando na prevenção de danos celulares e de doenças crônicas, incluindo doenças cardiovasculares, envelhecimento, diabetes e câncer. No arroz, maior atividade antioxidante é observada nos grãos integrais e naqueles com pericarpo vermelho e preto, devido à maior concentração de polifenóis²⁸. A utilização de três solventes de diferentes polaridades (éter etílico, etanol e água) possibilitou a solubilização de compostos mais polares (extrato aquoso), de polaridade intermediária (extrato

alcoólico) e apolar (extrato etéreo) da amostra em estudo. Nota-se que a maior atividade antioxidante das bebidas foi encontrada no extrato aquoso, mostrando que, mesmo após o processamento térmico, as bebidas mantiveram a capacidade de seqüestrar radicais livres.

Os escores médios obtidos no teste de aceitabilidade, a intenção de compra e o custo das bebidas elaboradas com quirera de arroz (BQA), arroz integral (BAI) e arroz integral parboilizado (BAIP) saborizadas com mamão e maracujá estão apresentados na Tabela 3.

Todos os atributos avaliados no teste de aceitabilidade obtiveram escores médios entre oito (gostei muito) e nove (gostei extremamente), e não diferiram ($p \leq 0,05$) entre si, constatando a boa aceitabilidade de qualquer uma das formulações desenvolvidas com extratos de arroz. Resultados inferiores foram detectados por Silva et al²⁹, ao desenvolver barras alimentícias incorporadas com farinhas de frutos do cerrado.

A adição de quirera na formulação pode resultar em redução do valor do produto final, entretanto, sabe-se que não só as melhorias no desenvolvimento de novas formulações mais nutritivas e baratas determinam o preço final do produto, uma vez que impostos, mão de obra, atravessadores dentre outras variáveis podem encarecer o produto final. Não obstante, ressalta-se que o desenvolvimento da bebida pode ser uma forma viável de aproveitamento de resíduos oriundos do beneficiamento do arroz. Como não há a adição de conservantes, nas formulações, é importante salientar que novos estudos devem ser feitos, relacionando-os a vida útil do produto desenvolvido neste trabalho.

Tabela 3. Escores médios dos atributos obtidos no teste de aceitabilidade, intensão de compra e custo das bebidas elaboradas com quirera de arroz (BQA), arroz integral (BAI) e arroz integral parboilizado (BAIP), saborizadas mamão e maracujá

Escore	Tratamentos ¹		
	BQA	BAI	BAIP
Aparência	8,57 ± 1,01 ^A	8,56 ± 1,09 ^A	8,59 ± 1,24 ^A
Cor	8,62 ± 1,02 ^A	8,59 ± 1,05 ^A	8,51 ± 1,03 ^A
Sabor	8,27 ± 1,25 ^A	8,10 ± 1,43 ^A	8,27 ± 1,65 ^A
Odor	8,35 ± 1,34 ^A	8,20 ± 1,46 ^A	8,37 ± 1,73 ^A
Intensão de compra (%)	93	90	95
Custo (R\$.L ⁻¹)	2,90	3,08	3,21

¹ Letras iguais na mesma linha não diferem entre si a 5 % de probabilidade de erro pelo teste Tukey

Os resultados médios das análises microbiológicas das bebidas elaboradas com quirera de arroz (BQA), arroz integral (BAI) e arroz integral parboilizado (BAIP), saborizadas com mamão e maracujá apresentaram ausência de bolores e leveduras, *Salmonella* sp, coliformes totais e coliformes termo-tolerantes; estando dentro dos limites estabelecidos pela RDC nº12, de 02 de janeiro de 2001, que preconiza padrões máximos de 10^4 UFC.g⁻¹ para bolores e leveduras, 10^2 NMP.g⁻¹ para coliformes a 45 °C e ausência de *Salmonella* sp. em 25 g de amostra, para néctares de frutas²⁷.

CONCLUSÃO

Os extratos de arroz podem ser utilizados como ingredientes na formulação de bebidas funcionais, sendo ótima alternativa para consumidores com intolerância à lactose e/ou alérgicos a produtos derivados de soja; além de incrementar o consumo de quirera, arroz integral e integral parboilizado.

A adição de extratos de arroz na formulação de bebidas com mamão e maracujá melhora o valor nutricional do produto, sendo considerado alimento rico em fibras, além de ter significativo potencial antioxidante. Os produtos apresentam alta aceitabilidade entre os consumidores, estando dentro dos padrões microbiológicos estabelecidos pela legislação brasileira vigente.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

1. Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB). Acompanhamento da safra brasileira: grãos, sétimo levantamento, abril 2012. [acesso 15 Jun 14]. Disponível em [http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_04_11_15_04_18_boletim_abril_2012.pdf].
2. Castro EM, Vieira NRA, Rabelo RR, Silva AS. Qualidade de grãos em arroz. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão; 1999.
3. Vieira NRA. Qualidade de grãos e padrões de classificação de arroz. *Inform Agropec*. 2004; 25(222): 94-100.
4. Carvalho JLV, Bassinello PZ. Aproveitamento Industrial. In: Santos AB, Stone LF, Vieira NRA (Eds.). A cultura do arroz no Brasil. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão; 2006. p.1007-41.
5. Santos D, Matarazzo PHM, Silva DFP, Siqueira DL, Santos DCM, Lucena CC. Caracterização de frutos cítricos apirênicos produzidos em Viçosa-Minas Gerais. *Rev Ceres*. 2010; 57(3): 393-400. <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-737X2010000300016>
6. Junior RF, Torres LBV, Campos VB, Limas AR, Oliveira AD, Mendonça JK. Caracterização físico-química de frutos de mamoeiro comercializados na EMPASA de Campina Grande – PB. *Rev Bras Prod Agroind*. 2007; 9(1): 53-8.
7. AOAC International. Official Methods of Analysis of AOAC International. 16th ed. Gaithersburg: AOAC International; 2002.
8. Wilson ED, Santos AC, Vieira EC. Energia. In: Oliveira JED, Santos AC, Wilson ED (Eds.). *Nutrição Básica*. São Paulo: Savier; 1982. p. 80-90.
9. Borguini RG, Torres EFS. Tomatoes and tomato products as dietary sources of antioxidants. *Food Rev Int*. 2009; 25(4): 313-25. doi: 10.1080/87559120903155859
10. Della Modesta RC. Manual de análise sensorial de alimentos e bebidas. Rio de Janeiro: Embrapa/CTAA; 1994.
11. International Commission on Microbiological Specifications for Foods – ICMSE. *Microorganisms in Food*. 2th ed. Toronto: University of Toronto Press; 1983.
12. Ferreira DF. Análises estatísticas por meio do SISVAR para Windows versão 4.0. In: Reunião Anual da Região Brasileira da Sociedade Internacional de Biometria, 45., 2000, São Carlos, SP. Resumos... São Carlos: UFSCar. p.235.
13. Universidade de São Paulo - USP. Tabela Brasileira de Composição de Alimentos: qualidade em informações sobre alimentos brasileiros. 2008. [acesso 23 Nov 14]. Disponível em: [http://www.fcf.usp.br/tabela].
14. Maeda RN, Pantoja L, Yuyama LKO, Chaar JM. Determinação da formulação e caracterização do néctar de camu-camu (*Myrciaria dubia* McVaugh). *Ciênc Tecnol Aliment*. 2006; 26(1): 70-4. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612006000100012>
15. Castro MV, Oliveira JP, Magalhães Júnior MJ, Assunção EAO, Brasil AP, Rabelo FLA et al. Análise química, físico-química e microbiológica de sucos de frutas industrializados. *Diálogo Ciênc*. 2007; 5(12): 1-9.

16. Vieira NRA, Carvalho JLV. Qualidade tecnológica. In: Vieira NRA, Santos AB, Sant'Ana EP (Eds.). *A cultura do arroz no Brasil*. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão; 1999. p.582-604.
17. Bassinello PZ, Castro EM. Arroz como alimento. *Inform Agropec*. 2004; 25(222): 101-8.
18. Deviri SCN, Mendez MHM. Uma visão retrospectiva da fibra e doenças cardiovasculares. In: Lajolo FM, Saura-Calixto F, Penna EW, Menezes EW (Eds.). *Fibra dietética em Iberoamérica: tecnología y salud*. São Paulo: Varela; 2001. p.411-30.
19. Matsuura FU. Estudo do albedo de maracujá e de seu aproveitamento em barra de cereais [tese de doutorado]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2005.
20. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº27, de 13 de janeiro de 1998. Aprova o Regulamento Técnico referente à Informação Nutricional Complementar [acesso 15 Jun 14]. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/27_98.htm].
21. Marlett JA, Michael IM, Joanne LS. Position of the American Dietetic Association: health implications of dietary fiber. *J Am Diet Assoc*. 2002; 102(7): 993-1000.
22. Tabela Brasileira de Composição de Alimentos – TACO. Campinas: Universidade de Campinas (UNICAMP); 2006.
23. Iha MH, Castro SC, Ribeiro EGA, Andrade RO, Sabino M. Avaliação físico-química e microbiológica de suco e néctares de maçã comercializados em cidades do Estado de São Paulo. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2006; 65(1): 27-31.
24. Silva RA, Oliveira AB, Felipe EMF, Neres FPTJ, Maia GA, Costa JMC. Avaliação físico-química e sensorial de néctares de manga de diferentes marcas comercializadas em Fortaleza/CE. *Publ UEPG Ci Exatas Terra, Ci Agr Eng*. 2005; 11(3): 21-6.
25. Matsuura FCAU, Folegatti MIS, Cardoso RL, Ferreira DC. Sensory acceptance of mixed nectar of papaya, passion fruit and acerola. *Sci Agric*. 2004; 61(6): 604-8. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-90162004000600007>
26. Chitarra MIF, Chitarra AB. Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio. 2ª ed. Lavras: Editora UFLA; 2005.
27. Brasil. Ministério da Saúde. 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] Republica Federativa do Brasil*. Brasília, DF, 10 jan. 2001. Seção 1, nº7-E. p.45-53. [acesso 15 out 14]. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01rdc.htm].
28. Nam SH, Choi SP, Kang MY, Kozukue N, Friedman M. Antioxidative, antimutagenic, and anticarcinogenic activities of rice bran extracts in chemical and cell assays. *J Agric Food Chem*. 2005; 53(3):.816-22. doi: 10.1021/jf0490293
29. Silva EP, Siqueira HH, Lago RC, Rosell CM, Vilas Boas EV. Developing fruit-based nutritious snack bars. *J Sci Food Agric*. 2014; 94(1): 52-6. doi: 10.1002/jsfa.6282

Comparação de testes laboratoriais para o diagnóstico de infecção por vírus linfotrópicos de células T humanas do tipo 1 (HTLV-1) e tipo 2 (HTLV-2) em pacientes infectados por HIV-1

Comparison of laboratorial tests for the diagnosis of human T-lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) and type 2 (HTLV-2) in HIV-1 infected patients

RIALA6/1637

Karoline Rodrigues CAMPOS¹, Maria Gisele GONÇALVES¹, Lucila Okuyama FUKASAWA¹, Nadia Aparecida COSTA¹, Carlos Henrique BARRETO-DAMIÃO¹, Mariana Cavalheiro MAGRI², Wong Kuen ALENCAR³, Adele CATERINO-DE-ARAUJO^{1*}

*Endereço para correspondência: ¹Centro de Imunologia, Instituto Adolfo Lutz. Av. Dr. Arnaldo, 351, 11º andar, São Paulo, SP, Brasil, CEP: 01246-000. Tel/Fax: (11) 3068-2898. E-mail: caterino@ial.sp.gov.br; caterino@usp.br

²Laboratório de Investigação Médica em Hepatologia por Vírus – LIM 47, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

³Vigilância Epidemiológica, Centro de Referência e Treinamento em DST/Aids de São Paulo (CRT-DST/Aids-SP), São Paulo, SP, Brasil

Recebido: 08.12.2014 - Aceito para publicação: 25.03.2015

RESUMO

O presente estudo pesquisou o melhor algoritmo de testes laboratoriais para efetuar o diagnóstico de infecção por vírus linfotrópicos de células T humanas dos tipos 1 (HTLV-1) e 2 (HTLV-2) em pacientes HIV-1 positivos. Amostras de sangue de 1.608 pacientes do CRT DST/Aids-SP foram analisadas quanto à presença de anticorpos específicos usando-se dois ensaios de triagem (EIA Murex HTLV-I+II e Gold ELISA HTLV-I/II), dois confirmatórios [HTLV Blot 2.4 (Western Blot – WB) e INNO-LIA HTLV I/II (Line ImmunoAssay - LIA)] e um molecular (PCR em tempo real pol). Na triagem foram detectados 51(Murex) e 49 (Gold ELISA) soros reagentes. Pelo WB, 23 soros confirmaram infecção por HTLV-1, 12 HTLV-2, seis HTLV e nove apresentaram perfis indeterminados. O LIA detectou 24 soros HTLV-1 positivos, 20 HTLV-2 e seis HTLV. A PCR evidenciou segmento pol de HTLV-1 em 18 e HTLV-2 em 12 amostras de sangue. Pelos testes confirmatórios, em 50 pacientes foi confirmada a infecção por HTLV: 25 HTLV-1 (1,55 %), 21 HTLV-2 (1,31 %) e quatro HTLV (0,25 %). As sensibilidades do LIA, WB e PCR foram de 96 %, 76 % e 60 %, respectivamente. Considerando-se apenas o custo, o melhor algoritmo diagnóstico para população infectada pelo HIV-1 foi o uso da PCR seguida do LIA.

Palavras-chave. HTLV-1/2, diagnóstico, sorologia, PCR, coinfeção HIV-1/HTLV, algoritmo de testes laboratoriais.

ABSTRACT

The present study aimed at investigating the best algorithm definition to be employed for diagnosing the human T lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) and type 2 (HTLV-2) in HIV-1 infected/Aids patients. Blood samples of 1,608 HIV-1 infected patients from the AIDS Reference Center (CRT DST/AIDS-SP) were tested for the presence of HTLV-1/2 antibodies using two screening assays (EIA Murex HTLV-I+II, and Gold ELISA HTLV-I/II), and confirmed by two Blots [HTLV Blot 2.4 (Western Blot –WB) and INNO-LIA HTLV I/II (Line ImmunoAssay - LIA)], and one molecular assay (pol real-time PCR). The screening tests detected 51(Murex) and 49 (Gold ELISA) reagents sera. WB , confirmed 23 HTLV-1, 12 HTLV-2, six HTLV, and nine showed HTLV indeterminate profiles. LIA confirmed 24 HTLV-1, 20 HTLV-2, and six HTLV. PCR detected 18 HTLV-1- and 12 HTLV-2-infected blood samples. By using any confirmatory assay, 50 patients confirmed HTLV infection: 25 HTLV-1 (1.55 %), 21 HTLV-2 (1.31 %) and four HTLV (0.25 %). The sensitivity of LIA, WB and PCR assays were 96 %, 76 % and 60 %, respectively. By considering the assays cost as the sole variable, the best testing algorithm for diagnosing HIV-1/HTLV-coinfection in HIV-1 infected patient was the use of PCR followed by LIA technique.

Keywords. HTLV-1/2, diagnosis, serology, PCR, HIV-1/HTLV-coinfection, algorithm tests.

INTRODUÇÃO

Os vírus linfotrópicos de células T humanas dos tipos 1 e 2 (HTLV-1 e HTLV-2) foram os primeiros retrovírus humanos a serem descritos, seguido do vírus da imunodeficiência humana (HIV-1)¹⁻³. Por compartilharem das mesmas vias de transmissão, não é raro que ocorra a coinfeção HIV-1/HTLV. Estudos revelam que a coinfeção HIV-1/HTLV pode interferir no desenvolvimento e instalação da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (Aids), variando de acordo com o tipo viral. Na infecção conjunta HIV-1/HTLV-1; por ambos os vírus terem tropismo por linfócitos T CD4+ pode haver progressão rápida para Aids pelo fato do HTLV-1 imortalizar a célula e aumentar o número de células T CD4+ e, conseqüentemente aumentar a replicação viral de reservatórios latentes⁴⁻⁶. Ao mesmo tempo, valores de CD4+ elevados interferem no início do tratamento antirretroviral, pois pode levar à falsa idéia de controle da replicação viral e de doenças⁴. Em casos de coinfeção HIV-1/HTLV-2; pode ocorrer redução da replicação do HIV-1 e progressão lenta para a síndrome, tornando-se um fator protetor. Esta proteção tem sido relacionada à resposta imune inata e a produção de quimiocinas que se ligam ao CCR5 (co-receptor para o HIV-1), impedindo sua penetração na célula hospedeira. Este tipo de coinfeção costuma ser frequente entre usuários de drogas injetáveis (UDIs)^{7,8}. Desta forma, faz-se necessário não só o diagnóstico da coinfeção HIV-1/HTLV, mas também o diagnóstico laboratorial final; com a diferenciação do tipo viral presente na dupla infecção.

Desde 1998, o Instituto Adolfo Lutz de São Paulo realiza a sorologia para HTLV-1/2 em amostras de sangue provenientes de Ambulatórios de Especialidades do SUS e de Centros de Referência em Aids e, desde então, relata dificuldades no diagnóstico, principalmente de infecção por HTLV-2⁹⁻¹⁶. Mesmo com as adaptações dos kits e a melhora na especificidade dos ensaios sorológicos para estas infecções virais, não existe até hoje um teste que seja 100 % sensível e específico para detectar todos os casos de infecção por HTLV-1 e principalmente por HTLV-2 no Brasil^{10,11,13,17-21}. Desta forma, alguns problemas

como baixa sensibilidade e especificidade dos testes de triagem sorológica^{9-12,14,15,18} e a necessidade de se reavaliar o valor do *cut off* da reação¹³ foram encontrados. Ainda, devido ao grande número de soros com padrão indeterminado no teste confirmatório de *Western Blot* (WB), ao redor de 35 %, foi sugerida a implantação de ensaios moleculares para confirmação diagnóstica^{12,15,22}. De fato foi proposta a utilização da PCR em vez de WB como ensaio de confirmação da infecção HTLV-1/2, mas um estudo piloto realizado com casuística de São Paulo detectou baixa sensibilidade da PCR quando aplicada em amostras de sangue provenientes de pacientes com HIV-1/Aids²³. Desta forma, o presente estudo objetivou ampliar e confirmar os resultados anteriormente obtidos; comparando o desempenho dos testes sorológicos de triagem e confirmatórios disponíveis no mercado, assim como da PCR em tempo real (*pol*) para definir o melhor algoritmo de diagnóstico de infecção por HTLV-1 e HTLV-2 aplicado à população infectada pelo HIV-1/Aids.

MATERIAL E MÉTODOS

Casuística

No período entre agosto de 2013 a maio de 2014, pacientes atendidos no Centro de Referência e Treinamento em Doenças Sexualmente Transmissíveis e Aids de São Paulo (CRT DST/Aids-SP) foram convidados a participar do estudo de forma aleatória de acordo com a sua ida ao laboratório para coletar amostras para os exames de rotina de contagem de linfócitos T CD4+, linfócitos T CD8+ e quantificação da Carga Viral de HIV-1. Após assinarem Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e responderem questionário tiveram seu sangue coletado em tubo contendo EDTA para a separação de plasma e células para as análises laboratoriais. O grupo de estudo compreendeu 1.608 pacientes atendidos neste Centro. No questionário houve coleta de dados sócio-demográficos, epidemiológicos, clínicos, laboratoriais e, quando necessário, foram obtidos dados complementares através do prontuário do paciente. As amostras de sangue foram encaminhadas ao Instituto Adolfo Lutz para análise.

Foram incluídos pacientes com infecção por HIV-1 confirmada segundo critérios do Ministério da Saúde, maiores de 18 anos e, que realizavam acompanhamento regular no CRT DST/Aids-SP.

Aspectos Éticos

O projeto foi aprovado pelo Comitê Científico e Diretoria Geral do IAL (CTC # 106D/2013) e pelos Comitês de Ética das Instituições envolvidas, CEPIAL parecer 187.709, e CEP CRT, parecer 201.697, e foi cadastrado na Plataforma Brasil sob número CAAE 11302512.0.0000.0059.

Preparo das amostras

Amostras de sangue total coletadas em tubo contendo EDTA e separadas após sedimentação espontânea em plasma e em leucócitos do sangue periférico (PBL) depois de choque hipotônico foram armazenadas em freezer a -20 °C.

Sorologia

A triagem dos 1.608 plasmas para detecção de anticorpos anti-HTLV-1/2 foi realizada usando dois kits comerciais: Murex HTLV-I+II, Diasorin, UK e o Gold ELISA HTLV-I+II, REM, SP, Br (ambos de 3ª geração, contendo peptídeos sintéticos e/ou proteínas recombinantes como antígenos e conjugado). Como testes confirmatórios de *Western Blot* (WB) e imunoensaio de linha (*Line ImmunoAssay* - LIA) foram utilizados os kits HTLV Blot 2.4, MP Biomedicals, USA e o INNO-LIA HTLV I/II, Innogenetics, Belgium. Todas as reações seguiram as instruções dos fabricantes.

PCR em tempo real

A extração de DNA com os PBL foi realizada usando sistema robotizado da Roche (Extrator MagNA Pure LC 2.0) e o Kit MagNA Pure LC DNA isolation Kit I, Roche Diagnostics GmbH Roche Applied Science-Mannheim, Germany, conforme orientação do fabricante.

Para a PCR em tempo real qualitativa foi utilizado o sistema *Taq Man*® (Applied Biosystems, USA) de três sequências alvo: o gene da albumina humana como controle endógeno e

os genes *pol* de HTLV-1 e de HTLV-2. Os *primers* e sondas, assim como os protocolos de reação foram os descritos por Costa et al^{12,23}.

Análise dos dados

Após a coleta das informações, foi constituído um banco de dados utilizando o programa Epi Info versão 3.5.4 para Windows, e usado o teste do Qui-Quadrado (múltiplos grupos) ou exato de Fisher (dois grupos) para a análise das variáveis categóricas.

Para as variáveis contínuas (densidade óptica nos ensaios imunoenzimáticos) foram usados os testes não paramétricos de Kruskal-Wallis (múltiplos grupos) ou Mann-Whitney (dois grupos), usando o programa estatístico GraphPad Prism 3.0. Foram consideradas associações estatisticamente significantes quando $p \leq 0,05$.

Para avaliação de custo/efetividade dos testes confirmatórios (WB, LIA e PCR em tempo real) foram considerados os valores de R\$ 210,00 para cada teste WB, R\$ 230,00 para cada teste LIA e R\$ 82,95 para a PCR em tempo real *pol*, tomando como base cotação de preços de julho de 2014 e avaliados diferentes algoritmos.

RESULTADOS

As características demográficas, clínicas e laboratoriais da população coinfectada HIV-1/HTLV são apresentadas na Tabela 1. A média de idade desta população foi de 50 anos. Houve alta prevalência de hepatite B e C, sendo 44 % e 70 % dos pacientes infectados por estes vírus respectivamente. As médias de contagens de linfócitos T CD4+ e T CD8+ em cel/mm³ não mostraram diferença significativa nos grupos HIV-1/HTLV-1, HIV-1/HTLV-2 e HIV-1/HTLV.

Noventa e quatro por cento dos casos de coinfeção HIV-1/HTLV se encontravam em uso de terapia antirretroviral. Setenta por cento dos pacientes (15 HTLV-1, 17 HTLV-2 e três HTLV) apresentaram carga viral de HIV-1 abaixo do limite de detecção do teste utilizado. No entanto, quando havia vírus circulante as médias de carga viral foram baixas, sendo maior nos casos de coinfeção HTLV-1 em relação ao HTLV-2 e HTLV (Tabela 1).

Tabela 1. Características demográficas, clínicas e laboratoriais de pacientes coinfectados HIV-1/HTLV do CRT DST/AIDS-SP, São Paulo, Brasil

Características demográficas, clínicas e laboratoriais	HTLV-1	HTLV-2	HTLV
	(n=25) ^a	(n=21) ^a	(n=4) ^a
Idade em anos ^b	49,3 (28-66)	50,6 (45-68)	50,5(48-53)
Gênero			
Masculino	15 (60 %)	9 (52,9 %)	2 (50 %)
Feminino	10 (40 %)	12 (47,1 %)	2 (50 %)
Coinfecção HCV	17 (68 %)	15 (71,4 %)	3 (75 %)
Coinfecção HBV	12 (48 %)	9 (42,8 %)	1 (25 %)
Use de TARV	23 (92 %)	21 (100 %)	3 (75 %)
Mediana de CD4 cel/mm ³	433,66 (9-1150)	520,95(65-1089)	464,5(65-944)
Mediana de CD8 cel/mm ³	850,4(230-2277)	809,3(330-1737)	1210(653-2386)
Mediana de Carga Viral HIV cópias	53912,8 (<Lim-221348)	1627,66 (<Lim-2705)	225 (<Lim-900)
WB	23 (92 %)	12 (57,1 %)	3 (75 %)
LIA	24 (96 %)	20 (95,2 %)	4 (100 %)
PCR	18 (72 %)	12 (57,1 %)	2 (1 HTLV-1 e 1 HTLV-2)

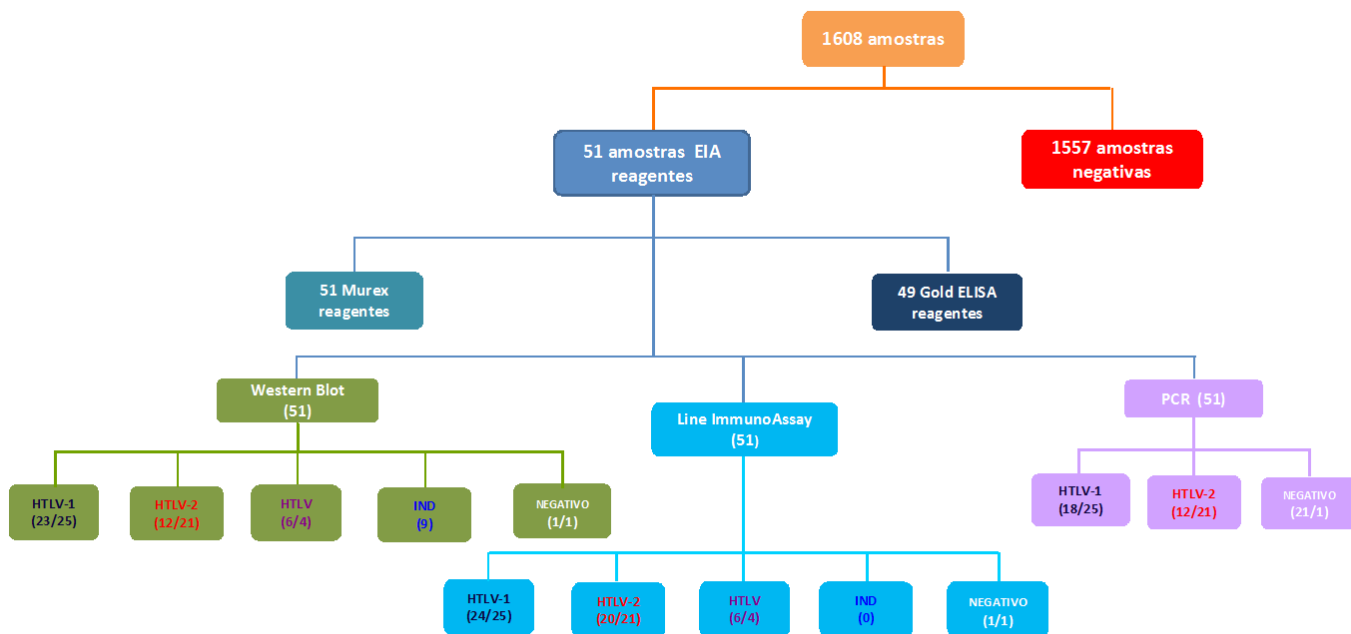
Legenda: ^atotal de casos positivos para este tipo viral considerando os resultados dos três ensaios confirmatórios. ^bmédia de idade (mínima e máxima); n= número de pacientes; HCV= vírus da hepatite C; HBV= vírus da hepatite B; TARV= terapia antirretroviral; WB= *Western Blot* 2.4; LIA= *Line ImmunoAssay*; PCR= reação em cadeia da polimerase em tempo real (*pol*)

Das 1.608 amostras analisadas, os testes de triagem detectaram 51 (Murex) e 49 (Gold ELISA) plasmas reagentes.

Pelo teste de WB houve confirmação de positividade para HTLV-1 em 23 amostras, 12 HTLV-2, seis HTLV, nove mostraram perfil indeterminado e uma resultou negativa. Pelo teste

LIA, confirmou-se 24 HTLV-1, 20 HTLV-2, seis HTLV e uma negativa. Já a PCR em tempo real detectou 18 amostras positivas para HTLV-1 e 12 para HTLV-2, uma das quais o Gold ELISA havia resultado inconclusivo (DO/CO = 0,9) e duas com perfil HTLV não tipado no WB e LIA (Figura 1). Assim, o *kit* Murex mostrou-se mais sensível.

Figura 1. Algoritmo realizado para triagem e confirmatório da infecção pelos vírus HTLV-1/2 em pacientes HIV-1



Legenda: IND (perfil indeterminado)

Uma análise mais cuidadosa dos valores da relação entre a densidade óptica sobre o valor de corte “cut off” (DO/CO) mostrou que o *kit* Gold ELISA apresentou média mais baixa nos casos de infecção por HTLV-2 quando comparada ao *kit* Murex. As médias obtidas pelos dois *kits* considerando os resultados do WB/PCR e do LIA/PCR mostraram diferença significativa para os casos de HTLV-1, HTLV-2 e HTLV ($p = 0,0006$ e $p = 0,025$), no entanto quando os *kits* Murex e Gold ELISA foram analisados de forma pareada, não houve diferença significativa (Figura 2). A sensibilidade e especificidade do *kit* Murex com esta casuística foi de 100 % e 99 %, e a do Gold ELISA de 98 % e 100 %, respectivamente.

A coinfeção por HTLV foi confirmada, considerando o resultado positivo em qualquer um dos três ensaios confirmatórios (WB, LIA ou PCR), assim, foi possível detectar a coinfeção HIV-1/HTLV em 50 pacientes: 25 HIV-1/HTLV-1 (1,55 %), 21 HIV-1/HTLV-2 (1,31 %) e quatro HIV-1/HTLV (0,25 %). As sensibilidades dos testes LIA, WB e PCR em tempo real foram de 96 %, 76 % e 60 %, respectivamente.

Em relação ao custo-benefício os possíveis algoritmos de testes confirmatórios de infecção por HTLV-1/2 estão representados na Tabela 2, onde o algoritmo C (que usa a PCR como primeiro teste confirmatório) apresentou menor custo, embora a melhor eficiência tenha sido do LIA (algoritmo B).

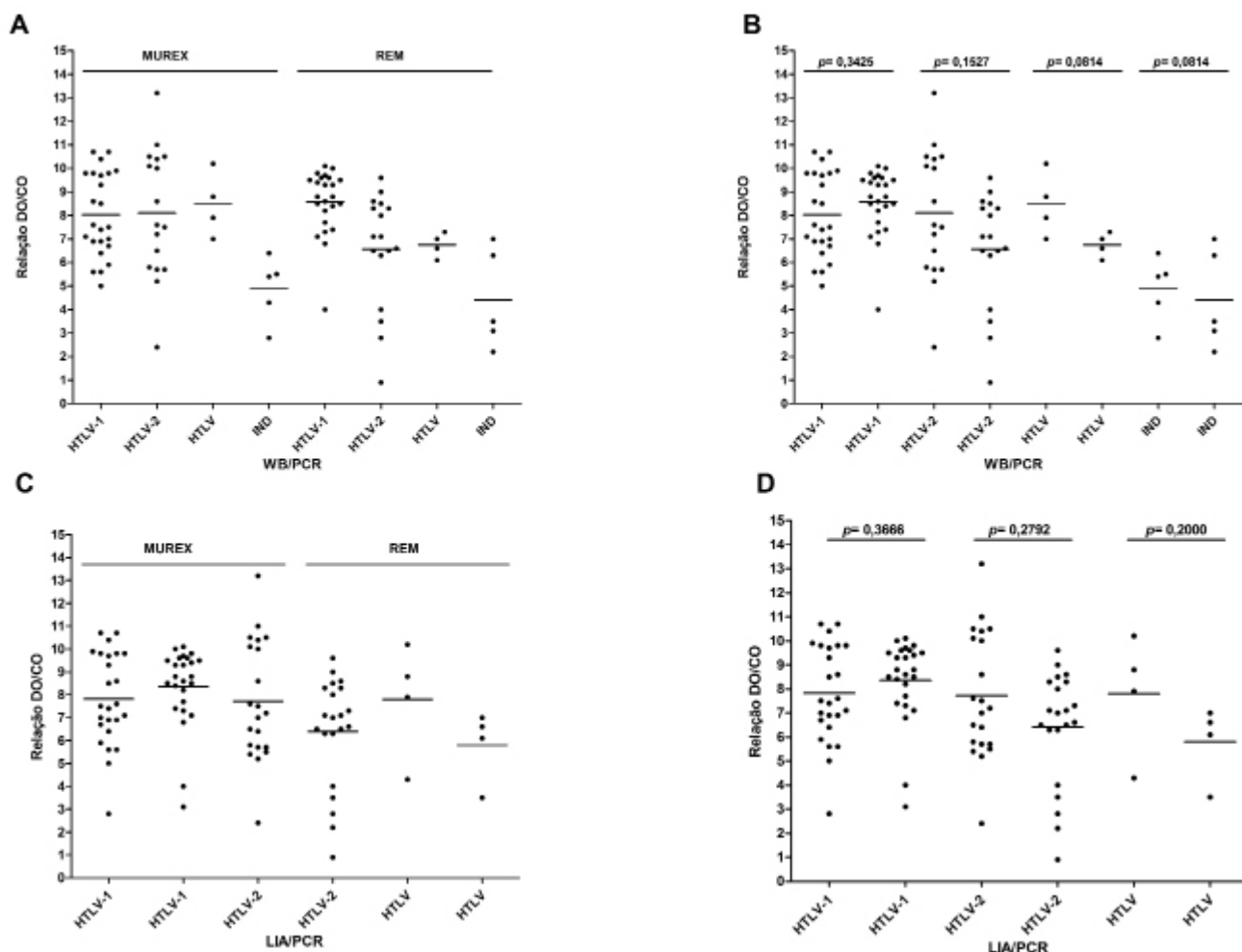


Figura 2. Resultados de DO/CO obtidos com os kits Murex e Gold ELISA dos casos de coinfeção HIV-1/HTLV em relação aos resultados de WB e PCR em tempo real *pol* para HTLV-1 e HTLV-2 [A e B] e em relação aos resultados de LIA e PCR em tempo real *pol* para HTLV-1 e HTLV-2 [C e D] usando GraphPad Prism e os programas estatísticos de Kruskal-Wallis ANOVA [A e C] ($p = 0,0006$ e $p = 0,025$ respectivamente) e Mann-Whitney U-test [B e D]

Tabela 2. Relação custo-benefício de algoritmos de testes confirmatórios de infecção por HTLV-1 e HTLV-2 utilizados em pacientes infectados por HIV-1

Custo-Benefícios dos Algoritmos Aplicados a Pacientes HIV-1/Aids					
Algoritmo A		Algoritmo B		Algoritmo C	
Teste	Custo	Teste	Custo	Teste	Custo
Western Blot (n=51)	R\$ 10.710,00	Line ImmunoAssay (n=51)	R\$ 11.730,00	PCR em tempo real (n=51)	R\$ 4.230,45
PCR em tempo real (n=16)	R\$ 1.327,20	PCR em tempo real (n=6)	R\$ 497,70	Line ImmunoAssay (n=21)	R\$ 4.830,00
Custo total	R\$ 22.313,78		R\$ 12.227,70		R\$ 9.060,45

Legenda. Algoritmo A: sequência de ensaios confirmatórios utilizados atualmente no diagnóstico da infecção por HTLV1/2 no Instituto Adolfo Lutz; Algoritmo B: melhor algoritmo confirmatório indicado para o diagnóstico de HTLV1/2 em população HIV/Aids; Algoritmo C: sugestão de algoritmo a ser aplicado visando apenas menor custo em laboratórios com estrutura para realizar ensaios de biologia molecular; Western Blot (HTLV Blot 2.4); Line ImmunoAssay (INNO-LIA HTLV I/II); PCR em tempo real *pol* (Costa et al, 2011)

DISCUSSÃO

Diante das diversas modificações no formato e composição dos *kits* de triagem para diagnóstico da infecção por HTLV-1/2; em que os de segunda geração eram mais específicos enquanto os de terceira eram demasiadamente sensíveis, e por apenas um ensaio não ser 100 % sensível para detectar todas as amostras realmente infectadas¹⁴⁻¹⁶, o algoritmo adotado no Instituto Adolfo Lutz consistia na triagem por dois ensaios imunoenzimáticos (um de segunda e outro de terceira geração). No entanto, atualmente só são comercializados *kits* de terceira geração (formato sanduíche e com antígenos recombinantes). Desta forma, o presente estudo avaliou dois *kits* disponíveis no mercado, um de procedência nacional (Gold ELISA) e outro importado (Murex) com o intuito de verificar se os dois *kits* teriam um bom desempenho e conseqüentemente qualquer um dos dois poderia ser utilizado para rotina diagnóstica. Como apresentado na Figura 2, não houve diferença significativa entre as DO/CO obtidas em ambos os testes $p > 0,05$, apesar de o Gold ELISA resultar inconclusivo em um caso positivo para HTLV-2. Entretanto, quando este *kit* for aplicado à rotina diagnóstica, deve-se considerar a zona cinza. Este fato reforça as dificuldades já descritas em estudos anteriores encontradas para o diagnóstico de HTLV-2 em pacientes coinfectados por HIV-1¹³.

Não há um consenso em relação ao ensaio confirmatório a ser utilizado, conferindo assim, ausência de um padrão ouro para o diagnóstico desta infecção. Desta forma, o WB ainda é o teste confirmatório mais utilizado em todo país, devido a sua disponibilidade no mercado e por ser uma técnica que não requer uma infraestrutura muito elaborada para sua realização. Costumava apresentar um alto número de padrões indeterminados principalmente em amostras também infectadas por HIV-1¹⁵. Neste estudo observou-se que o percentual de indeterminados diminuiu para 18 % (9) sendo 89 % dos casos HTLV-2, mostrando que mesmo com as modificações ocorridas durante o passar dos anos na composição das tiras (como incorporação de glicoproteínas recombinantes

do envelope de HTLV-1 e de HTLV-2, juntamente com a proteína recombinante transmembrana GD21 compartilhada por ambos)¹⁷, elas ainda têm baixa sensibilidade para os isolados de HTLV-2 brasileiros.

Buscando esclarecer os soros com perfil indeterminado, em 2010 Costa e colaboradores^{12,23} propuseram a utilização da PCR em tempo real como teste confirmatório de primeira escolha, seguido do WB, uma vez que o Instituto tinha estrutura implantada para um teste molecular, embora a sensibilidade da PCR tenha sido mais baixa em relação ao WB²¹. Estes resultados foram confirmados no presente estudo. A baixa sensibilidade da PCR foi explicada pelo uso da terapia antirretroviral, que suprimiu a carga viral de HIV-1, e, provavelmente, de HTLV, uma vez que a maioria dos pacientes (70 %) apresentou carga viral abaixo do limite de detecção; no entanto a PCR foi capaz de discriminar dois casos de infecção HTLV não tipados (um HTLV-1 e um HTLV-2) pelo WB e LIA. Não foi detectada nenhuma correlação entre os resultados da PCR e o número de células CD4 + e CD8 +. Curiosamente e corroborando os resultados obtidos, houve maior carga viral de HIV-1 nos casos de infecção por HTLV-1 do que por HTLV-2 ou HTLV não tipado e isto pode estar relacionado com evolução clínica do paciente. De fato, a coinfeção HIV-1/HTLV-2 parece desempenhar um papel protetor no desenvolvimento da Aids.

O LIA se mostrou o ensaio mais eficiente na confirmação e discriminação da infecção pelo HTLV-1 e HTLV-2 e, uma hipótese é de que os antígenos dotados nas tiras de nylon podem ser mais sensíveis na detecção de anticorpos anti-HTLV-2 dos isolados brasileiros. Outro ponto relevante para ser o teste confirmatório de primeira escolha é pelo fato de não ter como requisito infraestrutura de alta complexidade, permitindo que mais LACENs realizem o diagnóstico para HTLV-1 e HTLV-2, uma vez que tenham recebido treinamento, principalmente para a leitura e interpretação dos resultados. Porém, não se pode excluir a possibilidade do LIA ter um critério menos rígido de interpretação em relação ao WB.

Analisando redução de custos e melhor desempenho, o LIA deveria ser o ensaio confirmatório de primeira escolha, pois há diminuição de 45 % dos custos com testes confirmatórios trocando o algoritmo A (utilizado atualmente), em que consiste na realização do WB e as amostras negativas e ou com perfil indeterminados seguem para a PCR em tempo real, pelo B (onde há troca do WB pelo LIA), ambos representados na Tabela 2. Mesmo apresentando valor um pouco mais alto em relação ao WB ocorre a redução, uma vez que o imunoensaio de linha mostrou maior sensibilidade e eficácia na confirmação da infecção por HTLV-1/2 na população estudada; evitando que as amostras necessitassem de um segundo teste para concluir o diagnóstico. Considerando apenas a redução de custos, o melhor algoritmo é o C; em que a PCR é o teste de primeira escolha (Tabela 2) diminuindo 26 % dos gastos em relação ao B e 59 % comparado ao algoritmo atual (A), contando que o laboratório já possua estrutura para ensaios moleculares.

Como conclusão observou-se que, em pacientes infectados pelo HIV-1, o algoritmo adotado deve considerar a zona cinza na triagem sorológica; principalmente quando se utiliza apenas um *kit* EIA. Além disso, o teste confirmatório com melhor desempenho aplicado a esta população de estudo é o imunoensaio de linha.

AGRADECIMENTOS

O presente estudo foi financiado pelo Ministério da Saúde/SVS/DDAHV, BRAK57 # CA 125/13; DECIT/SCTIE/MS, CNPq, FAPESP, SES-SP/SUS # 2012/51220-8; IAL # 106D/2013 e recebeu bolsas da FAPESP IC # 2013/19775-2; TT3 # 2013/21014-0, TT3 # 2014/15845-9 e CNPq PD # 303545/2012-7.

A Terezinha Pereira de Araujo e Lúcia Cupertino Barreto pela recepção das amostras e cadastramento no SIGH, ao Alonso Fernandes pelo apoio técnico nas extrações de DNA e a Elisabete Amorim Leandro Lima e Márcia Maria Gonçalves Ribeiro pelo auxílio na prestação de contas junto as Agências de Fomento.

REFERÊNCIAS

1. Gallo RC, Sliski A, Wong-Staal F. Origin of human T-cell leukaemia-lymphoma virus. *Lancet*. 1983; 322(8356): 962-3. doi:10.1016/S0140-6736(83)90471-3
2. Kalyanaraman VS, Sarngadharan MG, Robert-Guroff M, Miyoshi I, Golde D, Gallo RC. A new subtype of human T-cell leukemia virus (HTLV-II) associated with a T-cell variant of hairy cell leukemia. *Science*. 1982; 218(4572): 571-3. doi: 10.1126/science.6981847.
3. Poesz BJ, Ruscetti FW, Gazdar AF, Bunn PA, Minna JD, Gallo RC. Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1980; 77(12): 7415-9.
4. Brites C, Sampaio J, Oliveira A. HIV-1/Human T-cell lymphotropic virus coinfection revisited: impact on AIDS progression. *AIDS Rev*. 2009; 11(1): 8-16. doi: 10.1086/595013
5. Moriuchi H, Moriuchi M, Fauci A. Factors secreted by human T lymphotropic virus type I (HTLV-I)-infected cells can enhance or inhibit replication of HIV-1 in HTLV-I-uninfected cells: implications for in vivo coinfection with HTLV-I and HIV-1. *J Exp Med*. 1998; 187(10): 1689-97.
6. Moriuchi H, Moriuchi M. In vitro induction of HIV-1 replication in resting CD4+ T cells derived from individuals with undetectable plasma viremia upon stimulation with human T-cell leukemia virus type I. *Virology*. 2000; 278(2): 514-9. doi:10.1006/viro.2000.0684
7. Bagheri F, Patel K, Samourjian E, Pathak N, Shamalov V, Gintautas J et al. Further evidence that HTLV protects against HIV-1 progression. *Infect Med J*. 2008; 1-5.
8. Roucoux DF, Murphy EL. The epidemiology and disease outcomes of human T-lymphotropic virus type II. *AIDS Rev*. 2004; 6(3): 144-54.
9. Caterino-de-Araujo A, Santos-Fortuna E, Meleiro MCZ, Suleiman J, Calabro ML, Favero A et al. Sensitivity of two ELISA tests in relation to Western blot in detecting HTLV-I and HTLV-II infection among HIV-1-infected patients from São Paulo, Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1998; 30(3): 173-82. doi:10.1016/S0732-8893(97)00236-8
10. Caterino-de-Araujo A. Best screening assays for the diagnosis of human T-cell lymphotropic virus types 1 and 2 in South America. *J Virol Methods*. 2008; 156(1-2): 150-1. doi: 10.1016/j.jviromet.2008.10.003.

11. Caterino-de-Araujo A. Diagnóstico de infecção por vírus linfotrópicos de células T humanas dos tipos 1 (HTLV-1) e -2 (HTLV-2) em população de risco: passado, presente e futuro. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2009; 68(2): 182-6.
12. Costa EAS. Introdução da reação em cadeia da polimerase em tempo real no algoritmo de testes laboratoriais para o diagnóstico de infecção por HTLV-1 e HTLV-2 [dissertação]. São Paulo (SP): Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde, 2010. 101pp.
13. Jacob F, Magri MC, Costa EAS, Santos-Fortuna E, Caterino-de Araujo A. Comparison of signal-to-cutoff values in first, second, and third generation enzyme immunoassays for the diagnosis of HTLV-1/2 infection in "at-risk" individuals from São Paulo, Brazil. *J Virol Methods*. 2009; 159(2): 288-90. doi: 10.1016/j.jviromet.2009.03.024.
14. Jacob F, Santos-Fortuna E, Azevedo RS, Caterino-de-Araujo A. Performances of HTLV serological tests in diagnosing HTLV infection in high-risk population of São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 2007; 49(6): 361-4. <http://dx.doi.org/10.1590/S0036-46652007000600005>
15. Jacob F, Santos-Fortuna E, Azevedo RS, Caterino-de-Araujo A. Serological patterns and temporal trends of HTLV-1/2 infection in high-risk populations attending Public Health Units in São Paulo, Brazil. *J Clin Virol*. 2008; 42(2): 149-55. doi: 10.1016/j.jcv.2008.01.017.
16. Jacob F, Santos-Fortuna E, Caterino-de-Araujo A. Algoritmo de testes sorológicos de triagem para infecção por HTLV-1/2 usado no Instituto Adolfo Lutz de São Paulo. *BEPA*. 2008; 5:12-8.
17. Costa JMP, Costa EAS, Segurado AAC. Infecção por HTLV-I e HTLV-II. In: Ferreira AW, Moraes SL. *Diagnóstico Laboratorial das Principais Doenças Infecciosas e Autoimunes*. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2013. p.120-34.
18. Caterino-de-Araujo A. Diagnóstico sorológico e molecular do HTLV-1 e HTLV-2. Experiência de um Laboratório de Saúde Pública do Brasil. *Rev Cienc Med PE*. 2011; 7(2): 123-7.
19. Ishaki R, Vallinoto ACR, Azevedo VN, Vicente ACP, Hall WW, Ishaki MOG. Molecular evidence for infection by HTLV-2 among individuals with negative serological screening tests for HTLV antibodies. *Epidemiol Infect*. 2007; 135(4): 604-9. doi: 10.1017/S0950268806006984.
20. Berini CA, Pascuccio MS, Bautista CT, Gendler SA, Eirin ME, Rodriguez C et al. Comparison of four commercial screening assays for the diagnosis of human T-cell Lymphotropic virus types 1 and 2. *J. Virol. Methods*. 2008; 147(2): 322-7. doi:10.1016/j.jviromet.2007.09.012.
21. Bassani S, Toro C, Jiménez V, Rodés B, Soriano V. Can the level of Immunosuppression in Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients Affect the Reliability of Human T-Cell Lymphotropic Virus Type 2 Serological Diagnosis? *Clin Vaccine Immunol*. 2006; 13(1): 160-1. doi: 10.1128/CVI.13.1.160-161.2006.
22. Morimoto HK, Morimoto AA, Reiche EMV, Ueda LT, Matsuo T, Reice FV et al. Difficulties in the diagnosis of HTLV-2 infection in HIV-1/AIDS patients from Brazil: Comparative performances of serologic and molecular assays, and detection of HTLV-2b subtype. *Rev Inst Med Trop S Paulo*. 2007; 49(4): 225-30. <http://dx.doi.org/10.1590/S0036-46652007000400006>
23. Costa EAS, Magri MC, Caterino-Araujo A. The best algorithm to confirm the diagnosis of HTLV-1 and HTLV-2 in at-risk individuals from São Paulo, Brazil. *J Virol Methods*. 2011; 173(2): 280-6. doi: 10.1016/j.jviromet.2011.02.018

Microbiological quality of water and dialysate from haemodialysis units in Southern Brazil

Qualidade microbiológica da água e dialisato em clínicas de hemodiálise do Sul do Brasil

RIALA6/1638

Izabel Cristina FIGEL², Patricia do Rocio DALZOTO¹, Ida Chapaval PIMENTEL^{1*}

*Endereço para correspondência: ¹Departamento de Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Centro Politécnico. Av. Francisco H. dos Santos, Jardim das Américas, Curitiba, PR, Brasil, CEP: 80530-900. E-mail: idinha.ufpr@gmail.com

²Laboratório de Microbiologia e Toxicologia, Instituto de Tecnologia do Paraná (Tecpar), Curitiba, PR, Brasil.

Recebido: 17.11.2014 - Aceito para publicação: 27.02.2015

ABSTRACT

Infectious diseases in renal patients may be associated with the dialysis water quality, which may be contaminated with microorganisms. In Brazil, the water quality is evaluated by analyzing total coliforms, heterotrophic bacteria, and bacterial endotoxin, but not *Pseudomonas* sp. and fungi. Water samples from haemodialysis units in Curitiba/PR were investigated on their conformity with the standard established by the Brazilian Health Ministry. Total coliforms, heterotrophic bacteria, *P. aeruginosa* and fungi counts were performed according to APHA, and LAL methodology for detecting bacterial endotoxin. All of the samples showed the total coliforms counts ≤ 1.1 MPN/100 mL, and ≥ 95 % of analyzed samples complied with the standards for heterotrophic bacteria counting. *P. aeruginosa* was recovered from 4 % of samples. In 15 % of samples, bacterial endotoxin was detected in values above the limit established by legislation. Yeasts were isolated from 26 % samples and filamentous fungi from 58 %, being 46 % characterized as melanized fungi. The fungi genera were *Cladosporium* spp., *Penicillium* spp., *Beauveria* spp., *Exophiala* spp., *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp., *Trichoderma* spp., *Acremonium* spp. and *Rinocladiella* spp.. The study highlights the significance of *P. aeruginosa* and fungi detection in those systems, as these microorganisms are potentially pathogenic to immunocompromised patients.

Keywords. *Pseudomonas aeruginosa*, coliforms, heterotrophic bacteria, endotoxins, fungi.

RESUMO

Doenças infecciosas em pacientes renais podem ser associadas à qualidade da água de diálise, que pode apresentar contaminação com microrganismos. Pelos padrões brasileiros, a qualidade da água é avaliada analisando-se coliformes totais, bactérias heterotróficas e endotoxinas bacterianas. *Pseudomonas* sp. e fungos não são investigados. Amostras de água de clínicas de hemodiálise em Curitiba/PR foram avaliadas quanto à conformidade com os padrões do Ministério da Saúde. Contagens de coliformes totais, bactérias heterotróficas, *Pseudomonas aeruginosa* e fungos foram realizadas seguindo-se APHA e detecção de endotoxina pela metodologia LAL. Todas as amostras tiveram contagens de coliformes totais abaixo de 1,1 MPN/100 mL e ≥ 95 % das amostras apresentaram padrões aceitáveis para bactérias heterotróficas. *P. aeruginosa* foi encontrada em quatro amostras. Em 15 % das amostras, endotoxinas bacterianas foram detectadas em valores acima dos permitidos pela legislação. Leveduras foram isoladas em 26 % das amostras e fungos filamentosos em 58 %, sendo 46 % melanizados e 27 % hialinos. Os gêneros fúngicos detectados foram *Cladosporium* spp., *Penicillium* spp., *Beauveria* spp., *Exophiala* spp., *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp., *Trichoderma* spp., *Acremonium* spp. e *Rinocladiella* spp.. Foi evidenciada a importância da detecção de *P. aeruginosa* e fungos nestes sistemas, uma vez que estes podem ser potencialmente patogênicos para pacientes imunocomprometidos.

Palavras-chave. *Pseudomonas aeruginosa*, coliformes, bactérias heterotróficas, endotoxinas, fungos.

INTRODUCTION

The Brazilian Society of Nephrology estimates that about 10 million people are affected by different levels of Chronic Renal Disease in Brazil¹. About 89.4 % of these patients had been submitted to hemodialysis and 10.6 % to peritoneal dialysis. The mortality observed was 15.2 % per year mostly due to the cardiovascular (37 %) and brainvascular (10 %) complications, infectious (26 %) and others not identified (27 %)².

Infectious diseases in renal patients can be associated to the dialysis water quality, in which several microorganisms, such as bacteria, viruses, fungi, protozoa, algae and also bacterial toxins can be assessed, mostly due to the inefficacy in the water treatment process³. Figel et al⁴ detected the presence of fungi in 66 % of water samples assayed from dialysis units in Southern Brazil, and observed the high prevalence (46 %) of black fungi, that can be associated to several diseases related to immunocompromised patients. The bacterial cytokine-inducing substances, as lipopolysaccharides (endotoxins), exotoxins and peptidoglycans, are also a concern, as they can

be transferred to the patient blood compartment during dialysis. The exposure to high levels of endotoxins is obviously associated with pyrogenic reactions and septicemia⁵. In Brazil, standards had been established for the certification of water quality in those systems⁶. The microbial standards for water for dialysis includes absence of coliforms, heterotrophic bacteria count limits of 200 CFU/mL and endotoxin limits of is 2 EU/mL; and for dialysate, heterotrophic bacteria count limit, the only parameter predicted for, of 2000 CFU/mL⁷. Although those parameters are important and necessary, others microorganisms and metabolites should be investigated in dialysis water systems, such as *Pseudomonas* sp., mycobacteria, fungi and mycotoxins⁸.

We aimed the evaluation of the microbial quality of water for dialysis provided by Hemodialysis Units in Curitiba, Paraná, Brazil, in attempt to verify the accomplishment of the standards demanded by Brazilian Health Ministry. In addition, counts of *Pseudomonas aeruginosa* and fungi were also performed in attempt to highlight its importance and propose its inclusion in future revisions of the standards for water for dialysis.

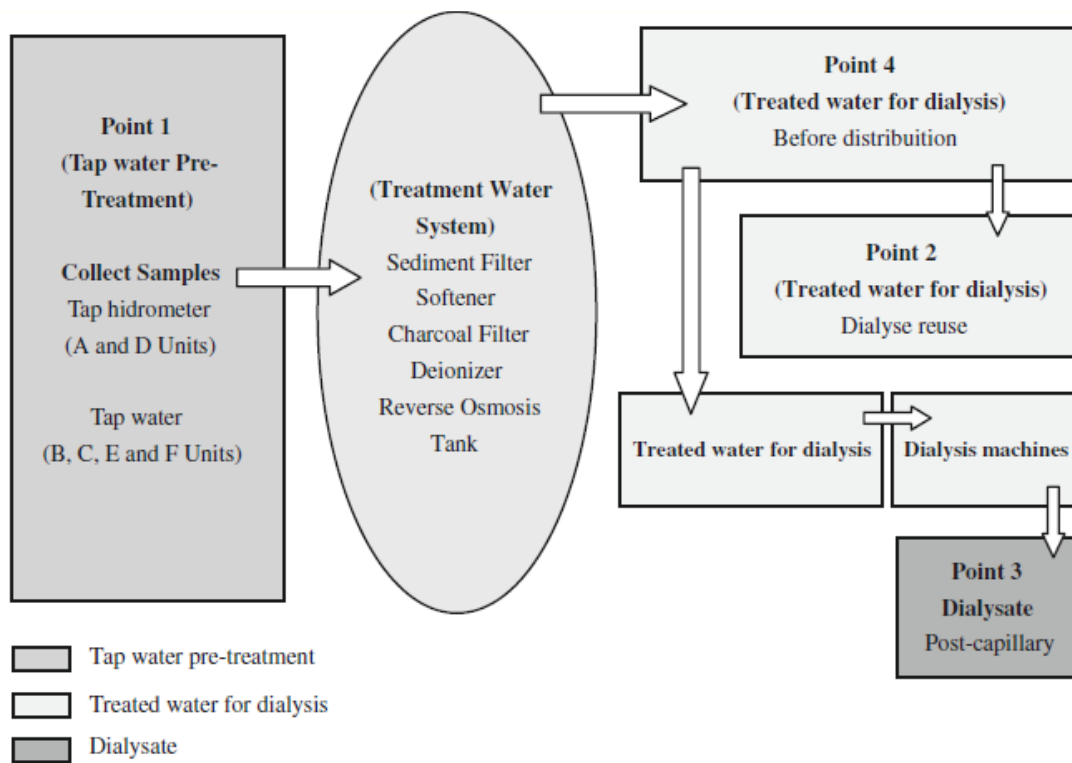


Figure 1. Points collected in clinical hemodialysis of samples of tap water, treated water for dialysis and dialysate (Figel et al, 2013)

MATERIAL AND METHODS

Water sampling

Samples of tap water (point 1), treated water for dialysis (point 2) and dialysate into the dialysis system (point 3) were obtained from six Hemodialysis Units in Curitiba, PR, Brazil (Figure 1).

The collections were performed monthly from October 2009 to November 2010. The sampling points were previously disinfected by applying 70 % alcohol to faucet and 400 mL of water flowed freely after the treatment, to prevent sample contamination with the disinfectant utilized. The samples were collected to sterile 250 mL glass flasks after 30 seconds of free flow. To the flask for the point 1 had been added 10 % sodium thiosulfate and the flasks for bacterial endotoxin analysis were previously depyrogenated.

The microbiological analysis of the samples (217) were performed within 12-h after collection, at the Laboratory of Microbiology and Toxicology of the Paraná Institute of Technology – TECPAR and LabMicro/UFPR.

The research was approved by the Committee of Ethics in Research of Federal University of Parana (CEP/SD: 799.134.09.09 CAAE: 0059.0.091.091-09).

Methods

Regarding the standard parameters for dialysis water in Brazil⁶, we performed the heterotrophic bacteria count test by pour plate method, total coliforms count test by multiple-tube method in 100 mL⁹, and detection of bacterial endotoxin by the *Limulus* amoebocyte lysate (LAL) method¹⁰. Although not necessary according to Brazilian standards, other parameters were also evaluated: *P. aeruginosa* count test by multiple-tube method and fungi count by spread plate and membrane filter method⁹.

Heterotrophic bacteria count

10 mL of the sample was added to a diluent to make a 1:10 dilution. 1-mL aliquots of the sample and the 1:10 dilution preparation were separately added to Petri dishes. The molten PCA medium (0.5 % peptone, 0.25 % yeast extract, 0.1 % glucose, 1.5 % agar; pH 7.0) was added to each

plate, which was incubated at 35 °C ± 1 °C for 48 h. At the end of the incubation period, the recovered colonies from each plate were enumerated and the results were expressed in colonies forming units (CFU) per mL⁹. The experiments were conducted in duplicate.

Total coliforms

The total coliforms counts were assessed by the most probable number (MPN) method⁹. 10-mL aliquots of the samples were added to a set of 10 tubes, each containing double-strength Lauryl Sulphate broth added of blue bromocresol (Hymedia) and an inverted Durham tube. All tubes were incubated at 35 °C ± 1 °C for 48 h. Following incubation, the tubes that were media acidification was observed and/or gas was noticed inside the Durham tubes were submitted to confirmation test for total coliform. Each presumptively positive tube was subcultured into a Brilliant Green Bile 2 % broth (Hymedia) and incubated at 35 °C ± 1 °C for 48 h. Positive results indicate the presence of total coliforms and the count was expressed as MPN/100 mL⁹.

Endotoxins

The bacterial endotoxin test was performed using the *Limulus* amoebocyte lysate (LAL) by gel-clot limit test. Each sample was diluted using water for Bacterial Endotoxins Test until the maximum valid dilution (MVD), that was calculated from equation $MVD = \text{endotoxin limit for water for dialysis} / \lambda$ [where λ is the labeled sensitivity of LAL reagent in the gel-clot technique]. Equal volumes of sample and LAL reagent were transferred to test tubes, mixed and incubated at 37 °C ± 1 °C for 1 h in water bath, in order to verify a firm gel formation at the bottom of the tubes. Positive control for endotoxin production was CSE Standard Endotoxin *E. coli* 055:B5. The results were expressed by endotoxins units (EU)/mL¹⁰.

Pseudomonas aeruginosa

P. aeruginosa count was performed by MPN/100 mL⁹. A 10-mL aliquot of the sample was inoculated into 10 tubes containing double-strength asparagin broth (Hymedia). The inoculated tubes were incubated at 35 °C ± 1 °C for 48 h. Tubes showing turbidity and/or pigmentation were submitted to

confirmation. 0.1 mL of cultures in positive tubes were inoculated into acetamide broth (Himedia) and onto the surface of cetrimide agar, all incubated at 35°C ± 1°C for 48 h. The development of a purple color at acetamide broth and presence of a green fluorescent pigment at cetrimide agar indicated the presence of *P. aeruginosa*. The results were expressed in MPN/mL.

Fungi

Fungi were counted by spread plate method and by membrane filter technique⁹.

Spread plate method

10 mL of the sample was added to a diluent to make a 1:10 dilution. 0.1-mL aliquots of the sample and the 1:10 dilution preparation were separately transferred onto Petri dishes containing Potato Dextrose Agar (Himedia) added of tartaric acid 10 %, pH 3.5, and the samples were spread over the surface of the culture medium using a sterile Drigalski spatel. The plates were incubated at 25 °C ± 1 °C for 5 days (faster growth fungi) and 20 days (slower growth fungi). The experiment was conducted in duplicates.

Membrane filter method

100 mL of sample were filtered through a sterile 47-mm, 0.45-µm-pore-diam membrane filter. The membrane was placed on PDA medium, pH 3.5 (Himedia) supplemented with tartaric acid 10 % in Petri dish, that was incubated at 25 °C ± 1 °C for 15 days. Colonies were enumerated and the results were expressed CFU/100 mL⁹. Positive cultures

of filamentous fungi were inoculated on Sabourad dextrose agar (Himedia), incubated at 25 °C ± 1 °C, and the single-spore colonies were selected for identification, carried out using macro and microscopic features. The assays were performed in duplicates.

RESULTS AND DISCUSSION

More than 95 % of the samples were considered in accordance with the standards required by valid Brazilian legislation in 2009 in regard of heterotrophic bacteria counts. All samples resulted in absence of total coliforms (< 1.1 MPN/100 mL), as predicted by legislation. Abbas et al¹² analyzed total coliforms in 225 samples from hemodialysis units in Greece and observed that 4,9 % of the samples assayed showed counts not acceptable for the established standards.

P. aeruginosa was recovered from 4 % of the samples (8/217) and this result confirm De Filippis et al³ suggestion that *P. aeruginosa* as an additional parameter for assuring the quality of water for dialysis.

15% of the samples showed bacterial endotoxin > 2 EU/mL. However, 32 % of the samples showed values < 0.125 EU/mL, in accordance to the parameters established by Brazilian legislation and standards from Italy, Sweden, Germany and Norway.

Hyaline yeasts were recovered from 26 % of the samples (57/217) and filamentous fungi, from 58 % of the samples (125/217) - 46 % characterized as melanized fungi and 27 % as hyalines. The higher isolation was observed when the membrane filter method was employed (Table 1).

Table 1. Percentage of yeasts and filamentous fungi verified in water for dialysis using spread plate and membrane filter methods

Collecting points	Spread plate	Membrane filter
	Yeasts	
All points	9 % (19/217)	26 % (56/217)
Point 1 (tap water)	1 % (1/72)	12 % (9/72)
Point 2 (dialysis water)	14 % (10/72)	39 % (28/72)
Point 3 (dialyzate)	14 % (8/58)	31 % (18/58)
Point 4 (dialysis water)	0 % (0/15)	7 % (1/15)
	Filamentous fungi	
All points	21 % (46/217)	52 % (112/217)
Point 1 (tap water)	31 % (22/72)	61 % (44/72)
Point 2 (dialysis water)	18 % (13/72)	60 % (43/72)
Point 3 (dialyzate)	16 % (9/58)	36 % (21/58)
Point 4 (dialysis water)	13 % (2/15)	27 % (4/15)

Despite of the fungi contamination observed in the dialysis units, the national and the most of the international legislation do not include these microorganisms as indicators of quality for water for dialysis, except in Sweden, where the current standards for fungi are 10 CFU/mL¹³.

The fungal isolates were identified as *Cladosporium* spp., *Penicillium* spp., *Beauveria* spp., *Exophiala* spp., *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp., *Trichoderma* spp., *Acremonium* spp. and *Rinocladiella* spp. Figel et al⁴ isolated black fungi from the water inlet of the municipal supply and in treated water for dialysis and dialysate by five dialysis clinics; three *Exophiala* species were characterized, *Exophiala pisciphila*, *E. cancerae* and *E. equina*. Schiavano et al¹⁴ evaluated 976 water samples and recovered filamentous fungi in 96 samples, yeast isolates in 28, and six samples contained both moulds and yeasts. These authors described 26 genera of fungi, many of which are known as opportunistic pathogens, such as *Cladosporium* spp., *Alternaria* spp. and *Tricophyton* spp. Fungal counts in treated water and standard dialysate solution were always below the threshold (< 10 CFU/mL), in agreement with the Italian guidelines for dialysis fluid quality, however 10.9 % of the samples of ultrapure dialysate solution were contaminated by one or several fungi types.

These results highlight the importance of contaminants detection in dialysis systems, as many infections have been described in immunocompromised patients. The parameters not practiced in Brazil, *P. aeruginosa* and fungi count, and also the detection of melanized fungi, indicate the necessity of further analysis in those systems, in regard to the patients' health.

REFERENCES

1. Sesso RC, Lopes AA, Thomé FS, Lugon JR, Santos DR. Relatório do censo brasileiro de diálise de 2010. *J Bras Nefrol*.2011;33(4):442-7. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-28002011000400009>
2. Sesso R, Lopes AA, Thomé FS, Bevilacqua JL, Romão Jr JE, Lugon J. Relatório do Censo Brasileiro de Diálise, 2008. *J Bras Nefrol*.2008;30(4):233-8.
3. De Filippis P, Spitaleri G, Damiani F, Panà A. Microbiological quality of haemodialysis water in various hospitals and private clinics in the Lazio region (Italy): 2000-2004. *Ig Sanita Pubbl*.2007;63(1):21-9.
4. Figel IC, Marangoni PRD, Tralamazza SM, Vicente VA, Dalzoto P do R, do Nascimento MM, et al. Black yeasts-like fungi isolated from dialysis water from Brazilian hemodialysis units. *Mycopathol*.2013;175(5-6):413-20. doi: 10.1007/s11046-013-9633-4
5. Schindler R, Christ-Kohlrausch F, Frei U, Shaldon S. Differences in the permeability of high-flux dialyzer membranes for bacterial pyrogens. *Clin Nephrol*.2003;59(6):447-54.
6. Brasil. Resolução RDC nº 154, de 15 jun. 2004. Estabelece o Regulamento Técnico para o funcionamento dos Serviços de Diálise. Diário Oficial [da] União, Brasília, DF, 17 jun 2004.
7. Montanari LB, Sartori FG, Cardoso MJO, Varo SD, Pires RH, Leite CQF, et al. Microbiological contamination of a hemodialysis center water distribution system. *Rev Inst Med Trop S Paulo*.2009;51(1):37-43. <http://dx.doi.org/10.1590/S0036-46652009000100007>
8. Pires-Gonçalves RH, Sartori FG, Montanari LB, Zaia JE, Melhem MS, Mendes-Giannini MJ, et al. Occurrence of fungi in water used at a haemodialysis centre. *Lett App Microbiol*.2008;46(5):542-7. doi: 10.1111/j.1472-765X.2008.02349.x
9. American Public Health Association (US). Standard methods for the examination of water and wastewater. 21^a ed. Washington: American Public Health Assoc; 2005.
10. United States Pharmacopeia (US). 31^a ed. Rockville: The United States Pharmacopeial Convention; 2008.
11. Kern ME, Blevins KS. *Micologia Médica*. São Paulo: Premier; 1999.
12. El-Koraie AF, Hazzah WA, Abbass AA, El-Shazly SA. Bacteriological monitoring of dialysis fluid in 2 haemodialysis units in Alexandria, Egypt. *Saudi Med J*. 2007;28(8):1234-8.
13. Nystrand R. Microbiology of water and fluids for hemodialysis. *J Chin Med Assoc*. 2008;71(5):223-9. doi: 10.1016/S1726-4901(08)70110-2
14. Schiavano GF, Parlani L, Sisti M, Sebastianelli G, Brandi G. Occurrence of fungi in dialysis water and dialysate from eight haemodialysis units in central Italy. *J Hosp Infect*. 2014;86(3):194-200. doi: 10.1016/j.jhin.2013.11.010
15. Revankar SG. Clinical and Treatment Aspects of Brown-Black Fungi. *Curr Fung Infect Rep*. 2010;4(1):46-51. doi: 10.1007/s12281-010-0004-z.

Diferentes intervalos de tempo de leitura do sistema API 20C AUX® na identificação de leveduras de interesse médico

Different reading time intervals of the API 20C AUX® system for identifying the yeasts of medical interest

RIALA6/1639

Daise Damaris Carnietto de HIPÓLITO*, Thiago Nunes ROBERTO, Miriam Rando ARAÚJO, Sandra Regina Brasil Stolf PUKINSKAS

*Endereço para correspondência: Núcleo de Micologia, Centro de Parasitologia e Micologia, Instituto Adolfo Lutz. Av. Dr. Arnaldo, 355, Cerqueira Cesar, São Paulo, SP, Brasil, CEP: 01246-000. E-mail: daise.carnietto@hotmail.com

Recebido: 06.11.2014 - Aceito para publicação: 05.02.2015

RESUMO

Infecções de corrente sanguínea por leveduras do gênero *Candida* são uma das principais causas de morbidade e mortalidade em pacientes imunocomprometidos. *Candida albicans* permanece a espécie mais isolada nestas infecções e é de fácil e rápida identificação. Contudo, existem outras espécies, como *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. krusei*, que são encontradas com menor frequência e que necessitam de maior período de tempo e de metodologias comerciais automatizadas ou semi-automatizadas para sua identificação. Neste estudo foram analisadas 146 cepas de leveduras quanto à capacidade do Sistema API 20C AUX® (Biomerieux®, França) em identificar corretamente o gênero e a espécie de microrganismos em diferentes períodos de leitura, visando-se a liberação do resultado em menor tempo. *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. pelliculosa*, *C. colliculosa*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Trichosporon mucoides* e *T. asahii* foram as leveduras cujos resultados finais puderam ser liberados nos períodos de tempo de 96, 120 e 144 h. Oitenta por cento das *C. glabrata* e 69 % das *C. tropicalis* também foram identificadas nos períodos além do tempo estabelecido. Com os resultados obtidos é possível antecipar a identificação do gênero e de algumas espécies de leveduras.

Palavras-chave. API 20C AUX, *Candida* sp, leveduras.

ABSTRACT

Bloodstream infections due to *Candida* genus are one of the leading cause of morbidity and mortality in immunocompromised patients. *Candida albicans* remains to be the yeast species which is the most commonly isolated in these infections. This species is easily and rapidly identified. However there are other species such as *Candida parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* and *C. krusei*, which are of lower frequency and they take longer to be detected; and commercially available automated or semi-automated methodologies are needed for their identification. Hundred forty-six yeast strains were analyzed for evaluating the capability of the API 20C AUX® system (Biomerieux®, France) for correctly identifying the microorganism genus and specie in different reading periods of time, and to release the final results in less time. *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *Candida pelliculosa*, *C. colliculosa*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Trichosporon mucoides* and *T. asahii* were the yeasts released in times of 96, 120 and 144 h. Eighty percent of *C. glabrata* and 69 % of *C. tropicalis* were also identified in periods beyond the established time. With the achieved results, it is feasible to anticipate the identification of the gender and of some yeast species.

Keywords. API 20C AUX, *Candida* sp, yeasts.

INTRODUÇÃO

A incidência e prevalência de infecções oportunistas e ou fatais por leveduras tem aumentado, principalmente nos imunocomprometidos¹⁻³. O laboratório de microbiologia tem um papel importante no diagnóstico dos agentes destas infecções promovendo resultados rápidos, com vistas à orientação de terapia antifúngica adequada.

Dentre as espécies patogênicas, *Candida albicans* é a mais prevalente, principalmente em casos de candidemia e candidíase mucocutânea⁴. Entretanto, percebe-se o aumento na frequência de outras espécies como *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei* e Complexo *C. parapsilosis*, consideradas atualmente espécies emergentes que muitas vezes são resistentes a antifúngicos^{5,6}. A identificação fenotípica de leveduras não *C. albicans*, por métodos clássicos, pode demorar até 20 dias para conhecimento da espécie^{7,8}.

Deste modo, a utilização de métodos comerciais automatizados ou semi-automatizados, como o sistema API 20CAUX® (Biomerieux®, França), são uma alternativa para agilizar o diagnóstico laboratorial. Sua leitura é visual e necessita de até 72 horas para conclusão da identificação. Entretanto nos finais de semana e feriados, os serviços de saúde funcionam em sistema de plantão. Sendo assim, o andamento das identificações fica prejudicado uma vez que as leituras são feitas somente nos dias úteis.

Este estudo teve por finalidade avaliar a identificação de espécies de leveduras pelo sistema API 20 C AUX® em intervalos inferiores e superiores aos propostos pelo fabricante: 48, 72, 96, 120 e 144 h.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram avaliados 138 isolados clínicos de leveduras provenientes de sangue, líquido-céfal-raquidiano (LCR) e urina, da rotina do Núcleo de Micologia do Instituto Adolfo Lutz de agosto de 2011 a março de 2012, além de 8 cepas ATCC: *C. albicans* ATCC 90028; *C. dubliniensis* MYA646; *C. tropicalis* 750; *C. famata* 62894; *C. guilliermondii* 6260; *C. parapsilosis* 22019; *C. krusei* 6258 e *Trichosporon inkin* 18020.

Todas as cepas foram purificadas em Ágar cromogênico®. Para a realização do teste, as colônias isoladas foram incubadas em meio Sabouraud com cloranfenicol por 24 h, identificadas pela micromorfologia em metodologia Dalmau plate com ágar fubá acrescido de Tween 80 e analisadas bioquimicamente pelo sistema API 20 C AUX® (Biomerieux®, França). Considerou-se como resultado positivo e negativo, respectivamente, a presença ou a ausência de turbidez nos poços de cada açúcar testado. Após estes procedimentos, quando solicitados pelo fabricante, foi feita a aplicação de testes complementares, como análises morfológicas, e os resultados das identificações de rotina foram liberados. Para este estudo os Kits foram analisados totalizando 96, 120 e 144 h.

O resultado da identificação de leveduras pelo sistema API 20C AUX® foi analisado em cinco tempos diferentes para leveduras do gênero *Candida* spp, *Trichosporon* spp, *Rhodotorula mucilaginosa* e *Saccharomyces cerevisiae*.

RESULTADOS

A habilidade de identificar isolados até a categoria espécie, em período de tempo além do recomendado pelo fabricante, diferiu para *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. famata*, *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. colliculosa*, *Candida pelliculosa* e *C. parapsilosis* (Tabela 1).

Todas as cepas de *C. guilliermondii* (n = 6), *C. parapsilosis* (n = 60) e *C. krusei* (n = 3) foram identificadas em todos os tempos propostos (48 h até 144 h).

Foram analisadas 9 cepas de três espécies do gênero *Trichosporon* (*T. asahii*, *T. inkin* e *T. mucooides*), sendo que sete foram identificadas pelo sistema API 20C AUX® nos tempos propostos, exceto duas cepas (*T. mucooides* e *T. asahii*) que não foram identificadas em 48 horas.

Foram testadas 5 cepas de *Candida albicans* identificadas dentro de 72 horas, porém a identificação foi perdida nas leituras após esse período. A cepa ATCC de *C. dubliniensis* não foi identificada em nenhum dos tempos de leitura. Estas espécies foram confirmadas por técnica de biologia molecular.

Tabela 1. Resultado da identificação das leveduras encontradas com maior frequência, em diferentes intervalos de tempo

Espécies de leveduras	n	Identificação no tempo				
		Preconizado		Proposto		
		48 h	72 h	96 h	120 h	144 h
<i>C. albicans</i>	5	NR	100 %	0 %	0 %	0 %
<i>C. parapsilosis</i>	60	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
<i>C. tropicalis</i>	32	81 %	100 %	100 %	100 %	100 %
<i>C. guilliermondii</i>	6	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
<i>C. glabrata</i>	25	84 %	84 %	80 %	80 %	80 %
<i>C. krusei</i>	3	100 %	100 %	100 %	100 %	100 %
<i>Trichosporon spp</i>	9	78 %	100 %	100 %	100 %	100 %

NR: Não realizado

Todas as cepas de *Candida tropicalis* (n = 32) foram identificadas nos períodos de 72 a 120 h, porém nos períodos de 48 e 144 h, apenas 26 e 22 cepas foram identificadas respectivamente.

Das 25 cepas de *Candida glabrata*, 21 foram identificadas no tempo de 48 e 72 h, sendo que houve dúvida na leitura de uma cepa e em outras três houve baixa discriminação. Nos demais tempos propostos, 20 cepas foram identificadas, onde uma cepa apresentou dúvida na leitura e quatro tiveram baixa discriminação.

Leveduras menos usuais como *R. mucilaginosa* (n = 1), *S. cerevisiae* (n = 1), *C. colliculosa* (n = 1), *C. famata* (n=1) e *C. pelliculosa* (n = 1), apresentaram resultados inconclusivos nas 48 h, porém foram identificadas nos demais tempos de leitura.

DISCUSSÃO

Das trinta e duas cepas de *Candida tropicalis*, seis tiveram assimilação fraca de alguns açúcares na leitura de 48 h, ocasionando dúvida na interpretação da turvação. No tempo de 144 h, 22 foram identificadas corretamente. Para Ruiz e Paula⁹, 3 isolados de *C. tropicalis* foram identificados pelo mesmo sistema como *C. guilliermondii*.

C. albicans e *C. tropicalis* não foram identificadas em alguns dos tempos analisados, porém são espécies que podem ser identificadas presuntivamente em 48 h, com a utilização de meios

cromogênicos¹⁰⁻¹². Esses meios contêm substratos que reagem com enzimas secretadas pela levedura produzindo colônias com várias pigmentações, sendo espécies-específicas, permitindo identificar os microrganismos através da cor e características da colônia¹³.

A dificuldade de identificar fenotipicamente *Candida lipolytica/Candida norvegensis* e *C. krusei/ Candida inconspícua* nos sistemas clássicos ou comerciais já foi relatada em um trabalho¹⁴, no qual foram observados problemas com a habilidade do sistema API 20C AUX® em identificar corretamente 23 cepas *C. krusei* sem a necessidade de testes suplementares. Silva e Candido¹⁵ também encontraram dificuldades em identificar isolados de *C. krusei*, utilizando o mesmo sistema.

CONCLUSÃO

O tempo de leitura ótimo para identificação das leveduras analisadas foi de 72 horas, correspondendo ao tempo recomendado pelo fabricante.

C. parapsilosis, *C. guilliermondii*, *C. pelliculosa*, *C. colliculosa*, *R. mucilaginosa*, *S. cerevisiae*, *T. mucoide*s e *T. asahii*, puderam ser identificadas nos tempos de 96, 120 e 144 h. Oitenta por cento das cepas de *C. glabrata* e 69 % das *C. tropicalis* também foram identificadas nos mesmos intervalos, demonstrando a viabilidade da aplicação do kit API 20 C AUX® nos tempos propostos.

Com os resultados obtidos é possível a antecipação da identificação do gênero e de algumas espécies de leveduras. A possibilidade de leitura dos testes pelo sistema API 20C AUX® no primeiro dia útil da semana e posterior a feriados, poderá orientar a terapia antifúngica adequada com o conhecimento das leveduras isoladas.

REFERÊNCIAS

1. Arendrup MC, Fursted K, Gahrn-Hansen B, Jensen IM, Knudsen JD, Lundgren B, et al. Seminal surveillance of fungemia in Denmark 2004-2006: increasing incidence of fungemia and numbers of isolates with reduced azole susceptibility. *J Clin Microbiol*. 2005;43(9):4434-40. doi: 10.1128/JCM.43.9.4434-4440.2005.
2. Espinel-Ingroff A, Canton E, Peman J, Rinaldi MG, Fothergill AW. Comparison of 24-hour and 48-hour voriconazole MICs as determined by the Clinical and Laboratory Standards Institute broth microdilution method (M27-A3 document) in three laboratories: results obtained with 2,162 clinical isolates of *Candida* spp. and other yeasts. *J Clin Microbiol*. 2009;47:2766-71. doi: 10.1128/JCM.00654-09.
3. Pappas PG, Kauffman CA, Andes D, Benjamin DK Jr, Calandra TF, Edwards JE, et al. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2009;48:503-35. doi: 10.1086/596757
4. Pfaller MA, Pappas PG, Wingard JR. Invasive fungal pathogens: current epidemiological trends. *Clin Infect Dis*. 2006;43:S3-S14.
5. Colombo AL, Nucci M, Park BJ, Nouér SA, Arthington-Skaggs B, da Matta DA, et al. Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers. *J Clin Microbiol*. 2006;44(8):2816-23. doi: 10.1128/JCM.00773-06.
6. da Matta DA, De Almeida LP, Machado AM, Azevedo AC, Kusano EJ, Travassos NF, et al. Antifungal susceptibility of 1000 *Candida* bloodstream isolates to 5 antifungal drugs: results of a multicenter study conducted in São Paulo, Brazil, 1995-2003. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2007; 57(4): 399-404. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2006.10.011.
7. Lacaz CS, Porto E, Martins JEC. *Micologia Médica* 8ª Ed. Editora Sarvier, São Paulo; 1991.
8. Lopes J, Dalle F, Mantelin P, Moiroux P, Nierlich AC, Pacot A, et al. A. Rapid identification of *Candida glabrata* based on trehalose and sucrose assimilation using Rosco Diagnostic Tablets. *J Clin Microbiol*. 2001;39(3):1172-4. doi: 10.1128/JCM.39.3.1172-1174.2001.
9. Ruiz LS, Paula CR. Fungemia por leveduras: perfis fenotípicos e moleculares e sensibilidade antifúngicas de amostras isoladas no Hospital das clínicas de Botucatu, São Paulo [tese de doutorado]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo, 2008.
10. Odds FC, Bernaerts R. CHROMagar *Candida*, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. *J Clin Microbiol*. 1994;32(8):1923-9.
11. Cooke V, Miles RJ, Price RG, Midgley G, Khamri W, Richardson AC. New chromogenic agar medium for the identification of *Candida* spp. *Appl Environ Microbiol*. 2002; 68(7):3622-7. doi: 10.1128/AEM.68.7.3622-3627.2002.
12. Khan ZU, Suhail A, Mokaddas E, Chandy R. Tobacco agar, a new method for differentiating *Candida dubliniensis* from *Candida albicans*. *J Clin Microbiol*. 2004;42(10):4796-8. doi: 10.1128/JCM.42.10.4796-4798.2004.
13. Baixench MT, Taillandier A, Paugam A. Clinical and experimental evaluation of a new chromogenic medium (OCCA, Oxoid) for direct identification of *Candida albicans*, *C. tropicalis* and *C. krusei*. *Mycoses*. 2006;49(4):311-5. doi: 10.1111/j.1439-0507.2006.01259.x.
14. Wadlin JK, Hanko G, Stewart R, Pape J, Nachamkin I. Comparison of three commercial systems for identification of yeasts commonly isolated in the clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol*. 1999;37(6): 1967-70.
15. Silva JO, Candido RC. Evaluation of the API20C AUX system for the identification of clinically important yeasts. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2005;38(3):261-3. <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822005000300012>.

Avaliação da implementação das boas práticas de manipulação em unidade de acolhimento institucional por meio de um Programa de Incentivo fiscal e capacitação

Evaluation of the implementation of good handling practices in an institutional inclusion unit through a tax incentive Program and training

RIALA6/1640

Cláudia WINTER, Laissa Benites MEDEIROS, Ana Lúcia SERAFIM, Lize STANGARLIN-FIORI*

*Endereço para correspondência: Departamento de Nutrição, Universidade Universidade do Paraná. Av. Lothário Meissner nº 632, Jardim Botânico, Curitiba, PR, Brasil, CEP: 80210-170. Tel: 41 9277-2506. E-mail: lizestangarlin@hotmail.com

Recebido: 02.07.2014 - Aceito para publicação: 27.02.2015

RESUMO

O objetivo deste estudo foi de avaliar a implementação das Boas Práticas de Manipulação em Unidade de Acolhimento Institucional de Santa Maria/RS, por meio de um programa de incentivo fiscal e capacitação, e o efeito do investimento realizado. No primeiro mês, aplicou-se uma lista de verificação para avaliar as Boas Práticas de Manipulação. Posteriormente elaborou-se um plano de ação para ajustar as não conformidades, levantar os custos e encaminhar o projeto para aprovação. Após aprovação, realizou-se a capacitação e estipulou-se o prazo de oito meses para efetuar adequação dos itens. No último mês aplicou-se novamente a lista de verificação. Na primeira aplicação, a Unidade apresentou 38 % de adequação; e após os investimentos a conformidade foi de 93 %. Nesta primeira aplicação, os itens controle integrado de pragas, documentação e registro, e responsabilidade não apresentaram adequação. Após os investimentos, estes itens e o abastecimento de água, manejo de resíduos, matéria-prima, ingredientes, embalagem, armazenamento e transporte do alimento preparado obtiveram 100 % de adequação; e o item com maior investimento foi de edificações, instalações, móveis e utensílios. Após a execução de investimento e capacitação houve aumento no percentual de adequação, em relação às Boas Práticas de Manipulação.

Palavras-chave. higiene dos alimentos, controle de qualidade, qualidade dos alimentos, manipulação de alimentos, Boas Práticas de Manipulação.

ABSTRACT

This study evaluated the implementation of Good Handling Practices in an Institutional Inclusion Unit in Santa Maria-RS through a program of tax incentives and training, and to assess the included investment. In the first month, a checklist was applied for assessing the adequacy of the Good Handling Practice. An action plan was developed to adjust the nonconformities, to survey the costs and to submit the project for approval. After being approved, a training was done and an eight-month period was stipulated for adjusting the nonconformities. In the last month, the checklist was applied again. In the first checklist application, the unit showed 38 % of adequacy; and after performing some investments, it came to be 93 %. In this first application, low percentage of adequacy was detected in the following issues Integrated Pest Control, Documentation and Registration, and Responsibility. After setting some investments, these items and other issues as Water Supply, Waste Management, Raw Material, Ingredients, Packaging, Storage and Transportation of Prepared-Food showed 100 % of adequacy, and the item with the highest investment was Buildings, Facilities, Furniture and Utensils. At the disposal of the investments and training, an increase in the percentage of adequacy concerning the Good Handling Practices was achieved.

Keywords. food hygiene, quality control, food quality, food handling, Good Handling Practices.

INTRODUÇÃO

As Unidades de Acolhimento Institucional são locais destinados a famílias e/ou indivíduos com vínculos familiares rompidos ou fragilizados, a fim de garantir proteção integral¹. Dentre as ações desenvolvidas nestas instituições, destaca-se a oferta de uma alimentação balanceada em quantidade e qualidade nutricional e higiênico-sanitária².

Para garantir a qualidade higiênico-sanitária dos alimentos em locais que manipulam alimentos, como as Unidades de Acolhimento Institucional, é essencial o controle nas etapas de preparação, para evitar as Doenças Transmitidas por Alimentos³. Essas Doenças vêm aumentando em países onde a cultura do povo é deficitária, os investimentos em melhorias são mínimos e o poder de fiscalização das Vigilâncias Sanitárias é restrito⁴. Em virtude do aumento destas doenças, há necessidade de implementação e sensibilização das Boas Práticas de Manipulação⁵.

Este programa estabelece as condições mínimas para a preparação de um alimento seguro e são adotadas pela legislação brasileira como uma ferramenta padrão⁶. O programa de Boas Práticas de Manipulação, apesar de ser um tema previsto em legislação vigente, ainda não está sendo implementado de maneira eficiente em locais que preparam alimentos, o que representa risco para a saúde os indivíduos⁴.

Neste contexto, o presente estudo tem o objetivo de avaliar a implementação das Boas Práticas de Manipulação em uma Unidade de Acolhimento Institucional através de um programa de incentivo fiscal e capacitação e avaliar o investimento realizado para adequação dos requisitos.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi desenvolvido em Unidade de Acolhimento Institucional do município de Santa Maria – RS, através do projeto intitulado: “Capacitar Bem para Servir Melhor: Implementação das Boas Práticas em Unidade de Acolhimento Institucional”. Este projeto faz parte de um Programa de Incentivo Fiscal intitulado: Programa de Apoio à Inclusão e Promoção Social –

Lei da Solidariedade. A viabilização deste programa é realizada através de uma parceria entre o governo estadual, entidades sociais e empresas, no qual subsidiam um valor para a realização de projetos aplicados nas unidades, com intuito de atender as necessidades dos locais.

O estudo foi aplicado nas áreas de manipulação, armazenamento e distribuição dos alimentos da Unidade, de janeiro a dezembro de 2012. No mês de janeiro, aplicou-se a lista de verificação da Portaria nº 78⁷, para avaliar o percentual de adequação geral e dos requisitos da lista, relacionados às Boas Práticas de Manipulação. No preenchimento da lista os requisitos foram avaliados em: Adequado, Inadequado e Não se aplica. A lista foi aplicada por um profissional capacitado e com experiência na área de alimentos e o percentual de adequação geral foi classificado como excelente, quando apresentou o percentual de adequação entre 91 a 100 %; Bom entre 70 a 90 %; Regular entre 50 a 69 %; Ruim entre 20 a 49 % e Péssimos de 0 a 19 %³.

Posteriormente, elaborou-se um plano de ação para ajustar as não conformidades encontradas e levantar os custos necessários, sendo realizados três orçamentos em empresas terceirizadas do município de Santa Maria – RS, selecionadas por conveniência e critério de acesso⁸. Baseado nestes orçamentos optou-se pela oferta de menor preço. Depois de estimado os custos, o projeto foi submetido, no mês de fevereiro de 2012, ao Programa de Apoio à Inclusão e Promoção Social – Lei da Solidariedade. No mês de abril de 2012 foi aprovado, sendo subsidiado pelo Programa o valor de R\$ 30.000,00 para a implementação do programa de Boas Práticas de Manipulação na Unidade.

Após aprovação, realizou-se uma capacitação com os manipuladores de alimentos. Os conteúdos programáticos abordados foram: higiene pessoal e ambiental; matérias-primas; preparação, armazenamento e exposição ao consumo do alimento preparado e documentação e registro. A capacitação foi ministrada por uma empresa terceirizada e especializada na área de alimentos, sendo realizada na própria Unidade de Acolhimento Institucional, com carga horária de 16 horas, conforme preconizado pela Portaria nº 78⁷. Utilizou-se como recurso audiovisual o

projeto multimídia e a metodologia aplicada foi aula expositiva e dialogada, com a participação direta dos manipuladores.

Após a capacitação, estipulou-se o prazo de oito meses para a adequação dos requisitos não conformes da Lista de Verificação, sendo todos os investimentos registrados em uma planilha do Microsoft Excel versão 2010. Após o prazo estipulado, aplicou-se novamente a lista de verificação da Portaria nº 78⁷, pelo mesmo profissional e seguindo a mesma metodologia da primeira avaliação.

A análise estatística foi realizada através do software *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) versão 19.0. Os dados foram descritos por meio de estatística descritiva simples (média e porcentagem).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1, constatou-se que na primeira aplicação da lista de verificação, a Unidade de Acolhimento Institucional apresentou um percentual de adequação geral de 39 %, classificado como Ruim. Na segunda aplicação, após os investimentos realizados e capacitação, o percentual de adequação geral aumentou para 93 %, sendo classificado como Excelente. Estes resultados evidenciam a importância das Unidades de Acolhimento Institucional buscar o apoio de programa de incentivo fiscal na adequação dos requisitos necessários para a garantia de um alimento seguro, assim como a realização de capacitações constantes, pois contribuiu não apenas para o aperfeiçoamento das técnicas e manipulação adequada dos alimentos, mas foi efetiva na mudança do comportamento e conscientização dos manipuladores para a implementação das Boas Práticas de Manipulação.

Os indivíduos, quando permanecem sob a responsabilidade de uma instituição devem receber cuidados adequados, principalmente em relação à alimentação. A alimentação é uma das atividades mais importantes do ser humano, tanto por razões biológicas, quanto por questões sociais e culturais que envolvem o ato de comer⁹. Neste sentido, todos os indivíduos têm o direito a uma alimentação em quantidade e qualidade suficiente¹⁰. Esta qualidade

está relacionada aos alimentos seguros que não causam danos à saúde dos indivíduos e pode ser alcançada com a implementação do Programa de Boas Práticas de Manipulação⁴.

Apesar de existirem, no Brasil, legislações bastante exigentes quanto aos critérios para a implementação das Boas Práticas de Manipulação, ainda são poucos os estabelecimentos alimentícios que aplicam este programa⁶ e, tratando-se de Unidades de Acolhimento Institucional, nenhum estudo foi encontrado a respeito da sua aplicação nestes locais. As dificuldades na implementação desse programa vão desde as financeiras até a ausência de profissionais conscientes e comprometidos em garantir a qualidade e segurança dos alimentos preparados¹¹.

O desconhecimento dos programas de incentivo fiscal, também pode ser outro fator que limita a implementação das Boas Práticas de Manipulação em Unidades de Acolhimento Institucional. Alguns responsáveis pelas unidades desconhecem a existência e viabilização destes programas e acabam não recebendo seus subsídios que seriam importantes tanto para a implementação das Boas Práticas, como para a realização de outros projetos aplicados na unidade, que poderiam atender a necessidade do local.

Na avaliação dos requisitos da lista de Verificação (Tabela 1), na primeira aplicação, constatou-se que, os itens com menor percentual de adequação foram: o controle integrado de pragas, documentação e registro e responsabilidade, com nenhum requisito adequado. Na segunda aplicação, constatou-se que todos os requisitos da lista aumentaram o percentual de adequação, após os investimentos realizados. Os itens que apresentaram maior percentual de adequação foram o controle integrado de pragas, abastecimento de água, manejo de resíduos, matéria-prima, ingredientes e embalagem, armazenamento e transporte do alimento preparado, documentação e registros e, responsabilidade, todos com 100 % de adequação quanto aos requisitos exigidos. Estes resultados demonstram que o investimento realizado e o conhecimento adquirido pelos manipuladores e responsáveis da unidade foram essenciais e suficientes para a adequação dos requisitos necessários.

Tabela 1. Avaliação do percentual de adequação geral e dos requisitos da lista de verificação em Boas Práticas de Manipulação, primeira e segunda aplicação, em Unidade de Acolhimento Institucional, Santa Maria – RS, 2012

Requisitos da Lista de Verificação	Primeira aplicação (% Méd. AD)	Segunda aplicação (% Méd. AD)
1. Edificação, instalações, equipamentos, móveis e utensílios	75	97
2. Higienização das instalações, equipamentos, móveis e utensílios	35	94
3. Controle integrado de vetores	0	100
4. Abastecimento de água	63	100
5. Manejo de resíduos	67	100
6. Manipuladores de alimentos	7	93
7. Matérias-primas, ingredientes e embalagens	67	100
8. Preparação dos alimentos	27	91
9. Armazenamento e transporte do alimento preparado	50	100
10. Exposição ao consumo do alimento preparado	22	78
11. Documentação e registro	0	100
12. Responsabilidade	0	100
13. Percentual de adequação geral	39	93

%; Percentual; Méd.: média; AD: adequação

Estudo realizado por Rodrigues, Silva e Aleixo¹², também observaram melhorias após a adequação dos requisitos descritos no planejamento das Boas Práticas de Manipulação em serviço de alimentação, na cidade de Pelotas (RS), onde verificaram 100 % de adequação nos requisitos relacionados ao controle integrado de pragas, abastecimento de água e exposição de alimentos preparados. González-Muñoz e Palomino-Camargo¹³, em estudo realizado com restaurante na cidade de Havana, em Cuba, constaram que após diagnóstico desenvolvido, 55 % das deficiências encontradas anteriormente foram resolvidas e

conseguiu-se um avanço no conhecimento sobre higiene pessoal e manipulação de alimentos.

Os envolvidos nas etapas de preparação dos alimentos devem ter conhecimento atualizado e específico sobre os procedimentos que devem ser implementados para garantir a segurança dos alimentos, e pode ser adquirido por meio de capacitações. Estudo realizado por Sung-Hee, Tong-Kyung e Hye-Ja¹⁴, revelou aumento no conhecimento dos manipuladores de alimentos após capacitação, mas não constatou diferença significativa nos procedimentos realizados no local de trabalho. Portanto, o aumento no conhecimento

nem sempre resulta em mudanças comportamentais necessárias para as práticas de trabalho. Neste sentido, as capacitações eficientes são aquelas que além do conhecimento, proporcionam mudanças de comportamento e conscientização dos manipuladores de alimentos durante as etapas de manipulação.

Na Tabela 2, constatou-se que o item “edificações, instalações, móveis e utensílios”, mesmo apresentando o maior percentual de adequação na primeira avaliação, foi o que obteve maior investimento. Foram adquiridas para a adequação deste requisito coifa, luminárias protegidas, exaustor, fogões, termômetros, liquidificador industrial, lavatório exclusivo para a higiene de mãos, com produtos necessários (sabonete líquido inodoro antisséptico; toalha de papel não reciclado e coletor de papel com pedal) e torneira com acionamento automático, instalações

elétricas e de construção.

A adequação da estrutura física na área de manipulação é essencial para garantir a qualidade e segurança dos alimentos, mas alguns responsáveis pelas empresas alimentícias não têm ou não priorizam recursos financeiros para a realização dos investimentos necessários¹⁵. A ausência das melhorias estruturais pode determinar o insucesso na implementação das Boas Práticas de Manipulação.

A adequada implementação das Boas Práticas de Manipulação em unidades que manipulam alimentos, como as Unidades de Acolhimento Institucional, é de suma importância, pois garante um aumento da qualidade higiênico-sanitária, reduz dos riscos de Doenças Transmitidas por Alimentos, proporciona maior segurança, otimiza o processo produtivo e garante maior eficiência e satisfação dos indivíduos.

Tabela 2. Investimentos para adequação dos requisitos da lista de verificação de Boas Práticas de Manipulação em Unidade de Acolhimento Institucional, Santa Maria – RS, 2012

Requisitos da lista de verificação	Valor (R\$)
Edificações, instalações, equipamentos, móveis e utensílios	15.000,00
Higienização das instalações, equipamentos, móveis e utensílios	535,00
Controle integrado de pragas	1.200,00
Abastecimento de água	700,00
Manejo de resíduos	145,00
Manipuladores de alimentos	900,00
Matérias-primas, ingredientes e embalagens	0
Preparação do alimento	600,00
Armazenamento e transporte do alimento preparado	2.390,00
Exposição ao consumo do alimento preparado	1.000,00
Documentação e registros	30,00
Responsabilidade	7.500,00
Total	30.000,00

CONCLUSÃO

Conclui-se que, após o investimento disponibilizado pelo Programa de incentivo fiscal e capacitação dos manipuladores de alimentos, houve um aumento no percentual de adequação da Unidade de Acolhimento Institucional, em relação às Boas Práticas de Manipulação, sendo os itens edificações, instalações, móveis e utensílios os que apresentaram maior investimento.

Em suma, pode-se confirmar que o programa de incentivo fiscal foi essencial para a implementação das Boas Práticas de Manipulação na Unidade de Acolhimento Institucional, pois as adequações da maioria dos requisitos necessitam de investimentos, que sem o subsídio do programa não seria possível adequá-los e a capacitação contribuiu não apenas para o aperfeiçoamento das técnicas e manipulação adequada dos alimentos, mas foi efetiva na mudança do comportamento e conscientização dos manipuladores.

REFERÊNCIAS

1. Ministério do Desenvolvimento Social. Serviço de Acolhimento Institucional. 2012. Disponível em: [<http://www.mds.gov.br/falemds/perguntas-frequentes/assistencia-social/pse-protexao-social-especial/servicos-de-alta-complexidade/servico-de-acolhimento-institucional>].
2. Ministério Público do Distrito Federal e Territórios. Abrigo para crianças e adolescentes. Manual de Orientação. 2012. Disponível em: [http://www.mp.go.gov.br/portalweb/hp/8/docs/manual_de_orientacoes_abrigos_para_crianças_e_adolescentes_mpdf.pdf].
3. Stangarlin L, Hecktheuer LH, Serafim AL, Saccol ALF. Instrumentos e Apoio para Implantação das Boas Práticas em Serviços de Nutrição e Dietética Hospitalar. 1ª ed. Rio de Janeiro: Rubio; 2013.
4. Silva Jr EA. Manual de Controle Higiênico-sanitário em Serviços de Alimentação. 6ª ed. São Paulo: Varela; 2012.
5. Unusan N. Consumer food safety knowledge and practices in the home in Turkey. *Food Control*. 2007; 18(1): 45-51. doi:10.1016/j.foodcont.2005.08.006
6. Tondo EC, Bartz, S. Microbiologia e Sistemas de Gestão da Segurança dos Alimentos. 1ª ed. Porto Alegre: Sulina; 2011.
7. Rio Grande do Sul. Secretaria da Saúde. Portaria nº 78 de janeiro de 2009. Aprova a Lista de Verificação em Boas Práticas para Serviços de Alimentação, aprova Normas para cursos de Capacitação em Boas Práticas para Serviços de Alimentação e dá outras providências. *Diário Oficial do Estado do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS*, 30 jan. 2009.
8. Crespo AA. Estatística fácil. 18º ed. São Paulo: Saraiva; 2002.
9. Proença RPC, Sousa AA, Veiros MB, Hering B. Qualidade nutricional e sensorial na produção de refeições. Florianópolis: Ed. UFSC; 2005.
10. Marongwe LS Kwazira K, Jenrich M, Thierfelder C, Kassam A. An African success: the case of conservation agriculture in Zimbabwe. *Int J Agricult Sustain*. 2011; 9 (1):153-61. <http://dx.doi.org/10.3763/ijas.2010.0556>
11. Garayoa R, Vitas AI, Díez-Leturia M, García-Jalón I. Food safety and the contract catering companies: Food handlers, facilities and HACCP evaluation. *Food Control*. 2011; 22(12): 2006-12. doi: 10.1016/j.foodcont.2011.05.021
12. Rodrigues KL, Silva JA, Aleixo JAG. Effect of the implementation of the Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP) prerequisite program in an institutional foodservice unit in Southern Brazil. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2012; 32(1): 196-200. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612012005000028>
13. González-Muñoz Y, Palomino-Camargo CE. Acciones para la gestión de la calidad sanitaria e inocuidad de los alimentos en un restaurante con servicio bufet. *Rev Gerenc Polit Salud*. 2012; 11(22): 123-40.
14. Sung-Hee P, Tong-Kyung K, Hye-Ja C. Evaluation of the food safety training for food handlers in restaurant operations. *Nutr Res Pract*. 2010; 4(1): 58-68. doi: 10.4162/nrp.2010.4.1.58
15. Saccol ALF, Stangarlin L, Hecktheuer LH. Instrumentos de apoio para a implantação das Boas Práticas em empresas alimentícias. 1ª ed. Rio de Janeiro: Rubio; 2012.

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://bvsmodeo.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: 01246-000

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. 2^a ed. Albany (NY):Delmar Publishers;1996.

Lopez D, organizador. Estudos epidemiológicos qualitativos. São Paulo: James Martim; 2009.

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

Foley KM, Gelband H, editors. Improving palliative care for cancer. Washington: National Academy Press 2001 [acesso 2003 Jul 13]. Disponível em: [http://www.nap.edu/catalog.php?record_id=10149].

Capítulos de livro:

Wirdh L. História da Epidemiologia. In: Lopez D, organizador. Estudos epidemiológicos qualitativos. São Paulo: James Martim; 2009.p.64-76.

Dissertações, teses e monografias:

Santos EP. Estabilidade química da manteiga da terra [dissertação de mestrado]. Bananeiras (PB): Universidade Federal da Paraíba;1995.

Moreschi ECP. Desenvolvimento e validação de métodos cromatográficos e avaliação da estabilidade de vitaminas hidrossolúveis em alimentos [tese de doutorado]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo; 2006.

Trabalhos de congressos, simpósios, encontros, seminários e outros:

Barboza et al. Descentralização das políticas públicas em DST/AIDS no Estado de São Paulo. III Encontro do Programa de Pós-Graduação em Infecções e Saúde Pública; agosto de 2004; São Paulo: Rev Inst Adolfo Lutz. p. 34 [resumo 32-SC].

Dados eletrônicos:

Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo – SABESP. O que fazemos/Qualidade da água. [acesso 2008 Set 17]. Disponível em: [http://www.sabesp.com.br/CalandraWeb/CalandraRedirect/?temp=4&proj=sabesp&pub=T&db=&doci].

Legislação:

Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. Diário Oficial [da] Republica Federativa do Brasil. Brasília, DF, 10 jan. 2001. Seção 1, nº7-E. p.45-53.

Autoria institucional:

Instituto Adolfo Lutz (São Paulo - Brasil). Métodos físico-químicos para análise de alimentos: normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. 4ª ed. [1ª ed. digital]. São Paulo (SP): Instituto Adolfo Lutz; 2008. Disponível em: [http://www.ial.sp.gov.br/index.php?option=com_remository&Itemid=7&func=select&orderby=1&Itemid=7].

Organización Mundial de la Salud – OMS. Como investigar el uso de medicamentos em los servicios de salud. Indicadores seleccionados del uso de medicamentos. Ginebra; 1993. (DAP. 93.1).

Patente:

Larsen CE, Trip R, Johnson CR, inventors: Novoste Corporation, assignee. Methods for procedures related to 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.

Documento/declaração	Quem assina	Quando anexar
Carta de Apresentação	Todos	Submissão
Responsabilidade pelos <u>Agradecimentos</u>	Autor responsável	Aprovação
Transferência de Direitos Autorais	Todos	Aprovação

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:

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 mais informações sobre critérios de autoria, consulte a página do ICMJE (<http://www.icjme.org>).

Um parágrafo contendo a declaração de potenciais conflitos de interesses dos autores.

Um parágrafo contendo a declaração que o trabalho não foi publicado, parcial ou integralmente, em outro periódico. Todos os autores devem ler, assinar e enviar documento transferindo os direitos autorais. O artigo só será liberado para publicação quando esse documento estiver de posse da RIAL.

4. Verificação dos itens exigidos na submissão:

1. Nome e instituição de afiliação de cada autor, incluindo e-mail e telefone do autor responsável.
2. Título do manuscrito, em português e inglês.
3. Texto apresentado em letras Times New Roman, corpo 12, em formato Word ou similar (doc, txt, rtf).

4. Resumos em dois idiomas, um deles obrigatoriamente em inglês.
5. Carta de Apresentação assinada por todos os autores.
6. Nome da agência financiadora e número(s) do processo(s).
7. No caso de artigo baseado em tese/dissertação, indicar o nome da instituição/Programa, grau e o ano de defesa.
8. Referências normalizadas segundo estilo Vancouver, ordenadas pela citação no texto e numeradas, e se todas estão citadas no texto.
9. Tabelas numeradas sequencialmente, com título e notas, e no máximo com 12 colunas, em formato Word ou similar (doc, txt, rtf).
10. Figura no formato vetorial ou em pdf, ou tif, ou jpeg ou bmp, com resolução mínima 300 dpi.

5. Revisão da redação científica: Para ser publicado, o manuscrito aprovado é submetido à revisão da redação científica, gramatical e de estilo. A RIAL se reserva o direito de introduzir alterações nos originais, visando a manutenção da homogeneidade e qualidade da publicação, respeitando, porém, o estilo e as opiniões dos autores. Inclusive a versão em inglês do artigo terá esta etapa de revisão.

6. Provas: Após sua aprovação pelos editores, o manuscrito será revisado quanto à redação científica. O autor responsável pela correspondência receberá as provas gráficas para revisão por correio eletrônico em formato pdf (portable document format). O prazo máximo para a revisão da prova é de dois dias. É importante cumprir os prazos de revisão para garantir a publicação no fascículo programado. Atrasos nesta fase poderão resultar em remanejamento do artigo para fascículos subsequentes.

7. Publicação e distribuição: Os artigos serão publicados em ordem cronológica de aprovação. As datas de recebimento e de aprovação do artigo constarão obrigatoriamente no mesmo.

É permitida a reprodução, no todo ou em parte, de artigos publicados na RIAL, desde que sejam indicados a origem e o nome do autor, de conformidade com a legislação sobre os direitos autorais.

A Revista do Instituto Adolfo Lutz é distribuída gratuitamente a entidades governamentais, culturais ou em permuta de periódicos nacionais ou estrangeiros.