

REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ

ISSN: 0073-9855 (impresso)
ISSN: 1983-3814 (on-line)
RIALA6



Volume 74 número 3, 2015





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

REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ

Volume 74 número 3, 2015
Julho – Setembro 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(3)

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 (3)

■ ARTIGO ORIGINAL/ORIGINAL ARTICLE

- 1652 Estudo colaborativo nacional para o estabelecimento do material de referência de trabalho da vacina contra sarampo/caxumba e rubéola: evolução para a autossuficiência na produção nacional da vacina tríplice viral**
National collaborative study for establishing the working reference material of the vaccine against measles/mumps and rubella: evolution to the self-sufficiency in the national production of triple viral vaccine
Danielle da Silva ALMEIDA, Paulo César DICK, Carlos José da SILVA, Ingrid Pinheiro de MEDEIROS, Carina Cantelli Pacheco de OLIVEIRA, Darcy Akemi HOKAMA, Jarbas Emilio dos SANTOS, Patricia dos Santos ALVES, Lucia Maria Correa WERNECK, Lilia Ribeiro SERÓDIO, Karen FRIEDRICH, Katherine Antunes de MATTOS..... 178-189
- 1653 Determinação simultânea de Rifampicina, Isoniazida, Pirazinamida e Etambutol em comprimidos com doses fixas combinadas**
Method for simultaneously determining the Rifampin, Isoniazid, Pyrazinamide and Ethambutol in the combined fixed-dose tablets
Patrícia Condé de LIMA, André Luiz Mazzei ALBERT, Kátia Christina LEANDRO190-199
- 1654 *Toxoplasma gondii*: soroprevalência e fatores de risco em ovelhas no planalto serrano de Santa Catarina, Brasil**
Toxoplasma gondii: seroprevalence and risk factors in ewes in the mountainou plateau of Santa Catarina, Brazil
Anderson Barbosa de MOURA, Marcio Orides da SILVA, Natascha TREVISANI, Antonio Pereira de SOUZA, Amélia Aparecida SARTOR, Rosiléia Marinho de QUADROS..... 200-206
- 1655 Perfil sanitário e características físico-químicas da carne ovina comercializada *in natura***
The sanitary profile and the physico-chemical characteristics of lamb meat sold *in natura*
Maria Carla da Silva CAMPÊLO, Jovilma Maria Soares de MEDEIROS, Márcia Marcila Fernandes PINTO Ana Paula Pinheiro de ASSIS, Jean Berg Alves da SILVA, Patrícia de Oliveira LIMA207-215
- 1656 Influência do tempo de armazenamento sobre a concentração de alfa-tocoferol e gama-tocoferol em óleos vegetais**
Influence of the storage time on the concentration of alpha-tocopherol and gamma-tocopherol in vegetable oils
Evellyn Câmara GRILO, Priscila Nunes COSTA, Cristiane Santos Sânzio GURGEL, Dalila Fernandes BEZERRA, Paula Emília Nunes Ribeiro BELLOT, Roberto DIMENSTEIN..... 216-224
- 1657 Avaliação da contaminação de amostras de soja com resíduos de agrotóxicos pelo método QuEChERS acetato com análise por meio de CLAE-EM/EM**
Evaluation of the soy samples contamination with pesticides residues by using QuEChERS acetate methodology and applying LC-MS/MS analysis
Adherlene Vieira GOUVÊA, Maria Helena Wohlers Morelli CARDOSO, Lucia Helena Pinto BASTOS, Cristiane BARATA-SILVA, Armi Wanderley da NÓBREGA, Silvana do Couto JACOB.....225-238

1658	Análise do teor de sódio em rótulos de mortadelas comercializadas no Brasil Sodium contents in labelson the mortadellas sold in Brazil Francielly Kultz SILVESTRE, Elisvânia Freitas dos SANTOS, Gabriela Datsch BENNEMANN, Daiana NOVELLO	239-246
1659	Microbiological and physicochemical characterization of the raw milk and the colonial type cheese from the Northwestern Frontier region of Rio Grande do Sul, Brazil Caracterização microbiológica e físico-química de leite cru e queijo colonial da região Fronteira Noroeste do Rio Grande do Sul, Brasil Graciele Daiana FUNCK, Gislaine HERMANNNS, Raul VICENZI, Jéssica Tamiozzo SCHMIDT, Neila Silvia Pereira dos Santos RICHARDS, Wladimir Padilha da SILVA, Ângela Maria FIORENTINI.....	247-257
1660	Sobrevivência de patógenos de origem alimentar aderidos em aço inoxidável após aplicação de óleo essencial de <i>Cymbopogon flexuosus</i> Survival of foodborne pathogens adhered to the stainless steel after applying the <i>Cymbopogon flexuosus</i> essential oil Gleyca Ferreira de BARROS, Camila Ribeiro ROCHA, Roberta Torres CARELI, Francielle Patrícia Evangelista SILVA, Anna Christina de ALMEIDA, Eduardo Robson DUARTE, Diogo França ARRUDA	258-265
1661	Identificação da microbiota fúngica anemófila em uma indústria de polpas de frutas e susceptibilidade antifúngica a terpenos Identification of the airborne fungal microbiota in a fruit pulp industry and antifungal susceptibility to terpenes Viviane Priscila Barros de MEDEIROS, Gezaildo Santos SILVA, Edeltrudes de Oliveira LIMA, Fillipe de Oliveira PEREIRA	266-273
■ COMUNICAÇÃO BREVE/ BRIEF COMMUNICATION		
1662	Microorganismos de interesse sanitário em sushis Microorganisms of sanitary interest in sushi Thiago José Ferreira Flor de SOUZA, Joelinton do Nascimento SILVA, Carlos Roberto Marinho da SILVA FILHO, Jeronimo Galdino dos SANTOS	274-279
1663	Sobrevivência de <i>Campylobacter jejuni</i> em amostras de leite pasteurizado e UHT artificialmente contaminados e mantidas sob refrigeração Viability of <i>Campylobacter jejuni</i> in the refrigerated samples of artificially contaminated pasteurized and UHT milks Guilherme Paz MONTEIRO, Roberta Torres de MELO, Priscila Christen NALEVAIKO, Eliane Pereira MENDONÇA, Belchiolina Beatriz FONSECA, Daise Aparecida ROSSI	280-285
1664	Comparação entre a análise macroscópica realizada durante a inspeção em abatedouro bovino e o exame microscópico na detecção de processos patológicos Comparison between the macroscopic analysis during the inspection in bovine slaughterhouse and the microscopic examination to detect pathological processes Bruno Rafael Lima NASCIMENTO, Manoel Soares DAMASCENO NETO, Michelle da Silva MACIEL, Valéria Duarte CERQUEIRA, Carina Martins de MORAES, Milton Begeres de ALMEIDA	286-294
1665	Boas Práticas em Serviços de Alimentação do Mercado Municipal de Curitiba-PR Good Practices in Food Services at the Municipal Market of Curitiba – PR Gisele RAIMUNDO, Ana Lúcia SERAFIM, Laissa Benites MEDEIROS, Caroline dos Santos PEIXOTO, Náina Lopes de Souza de JESUS, Lize STANGARLIN-FIORI	295-300
■ INSTRUÇÕES AOS AUTORES.....		301-309

Estudo colaborativo nacional para o estabelecimento do material de referência de trabalho da vacina contra sarampo/caxumba e rubéola: evolução para a autossuficiência na produção nacional da vacina tríplice viral

National collaborative study for establishing the working reference material of the vaccine against measles/mumps and rubella: evolution to the self-sufficiency in the national production of triple viral vaccine

RIALA6/1652

Danielle da Silva ALMEIDA¹, Paulo César DICK¹, Carlos José da SILVA¹, Ingrid Pinheiro de MEDEIROS¹, Carina Cantelli Pacheco de OLIVEIRA¹, Darcy Akemi HOKAMA¹, Jarbas Emilio dos SANTOS², Patricia dos Santos ALVES², Lucia Maria Correa WERNECK², Lilia Ribeiro SERÓDIO³, Karen FRIEDRICH⁴, Katherine Antunes de MATTOS^{1*}

*Endereço para correspondência: ¹Laboratório de Controle de Qualidade, Departamento da Qualidade, Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Bio-Manguinhos, Fundação Oswaldo Cruz. Av. Brasil, 4365, Manguinhos, RJ, CEP: 21040-900. Tel: 21 3882-9355. E-mail: katherine.antunes@bio.fiocruz.br

²Laboratório de Vacinas Virais e Cultura de Células, Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz

³Núcleo Técnico de Produtos Biológicos, Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz

⁴Departamento de Toxicologia e Farmacologia, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz

Recebido: 22.12.2014 - Aceito para publicação: 26.08.2015

RESUMO

A monografia farmacopeica da vacina tríplice viral (sarampo/caxumba/rubéola) exige a validação de desempenho do ensaio de potência utilizando-se apropriado material de referência (MR). Com o intuito de estabelecer o primeiro MR de trabalho (MRT) nacional para a vacina tríplice viral, foi realizado o estudo colaborativo nacional com a participação de duas únicas instituições que executam o ensaio de potência desta vacina, o Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos, produtor nacional) e o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. O material candidato (cMRT_{Bio}), preparado pelo produtor, foi avaliado pelos laboratórios participantes utilizando-se as respectivas metodologias *in-house* de determinação de potência. O cMRT_{Bio} foi considerado apropriado como MR *in-house* por estar em concordância com as especificações recomendadas nas normativas de compêndios, a saber: variações intra- (< 5 %), inter-ensaios (< 10 %) e entre laboratórios (< 10 %) abaixo dos limites aceitáveis; e potência estimada (\log_{10} CCID₅₀/DH) em 3,72 para sarampo, 4,80 para caxumba e 3,70 para rubéola. Este trabalho reflete o compromisso do único produtor nacional da vacina tríplice viral com a saúde pública, descrevendo-se a expansão da tecnologia, o cumprimento às diretrizes internacionais, o cuidado com o controle da qualidade e culminância para a autossuficiência nacional na produção de vacinas.

Palavras-chave. material de referência, potência biológica, vacina tríplice viral.

ABSTRACT

The pharmacopoeia monograph for the measles/mumps and rubella (MMR) triple vaccine demands to perform the validation of the potency assay by using the suitable reference material (MR). Aiming at establishing the first work MR (MRT) for the MMR triple vaccine, a national collaborative study was performed with the participation of the two unique national institutions working on the vaccine potency evaluation test, the Immunobiological Technology Institute (Bio-Manguinhos, national manufacturer) and the National Institute for Quality Control in Health. The candidate product (cMRT_{Bio}) prepared by the manufacturer was evaluated by the participant laboratories by employing the respective *in-house* methodologies for determining the potency. The cMRT_{Bio} was considered suitable as *in-house* MR, according to the specifications based on the normative compendia, being the intra-assay (< 5 %), inter-assay (< 10 %) and between laboratories variations (< 10 %) below the acceptable limits, and the estimate potency (\log_{10} CCID₅₀/DH) in 3.72 for measles, 4.80 for mumps and 3.70 for rubella. This study reflects the commitment of the unique national MMR vaccine producer to the public health, describing the expansion of technology, the compliance with international guidelines and the careful quality control, leading to the national self-sufficiency in the vaccine production.

Keywords. reference material, biological potency, MMR vaccine.

INTRODUÇÃO

A vacina tríplice viral (sarampo/caxumba/rubéola) fornecida pelo Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos) é uma preparação mista liofilizada, na apresentação em frascos de 10 doses. Durante todas as etapas de produção há o monitoramento do produto quanto à sua qualidade requerida pelas normas nacionais e/ou internacionais vigentes, sendo o Departamento de Qualidade (DEQUA) responsável por todos os ensaios químicos e biológicos preconizados para a liberação da vacina tríplice viral, incluindo toxicidade inespecífica, esterilidade, potência, termoestabilidade, identidade, pH, umidade residual e aspecto¹.

No que diz respeito à imunogenicidade de vacinas, a determinação da concentração viral ou teste de potência, para vacinas de vírus vivo atenuado é considerada o parâmetro mais crítico, visto que o conhecimento da dose é fundamental para prever sua segurança e eficácia clínica. No caso da vacina tríplice viral, a determinação da potência é realizada desde os produtos intermediários – concentrados virais monovalentes de sarampo, caxumba e rubéola – até o produto final na forma trivalente. Além disso, conforme requerimento da Organização Mundial da Saúde (OMS)² e da Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) 17/2010³, em todas as etapas de produção é mandatória a utilização de um material de referência (MR) para validar o ensaio.

Os MRs são utilizados nos laboratórios para o controle das análises químicas, físico-químicas e microbiológicas, na calibração de equipamentos, acompanhamento e avaliação de analistas, controle/atribuição de valores a materiais e desenvolvimento de metodologias⁴. Os MR de trabalho (MRT) são produzidos no próprio laboratório e requeridos na rotina de acordo com o “Guideline for the *in-house* production of reference materials”⁵.

Uma vez que o padrão de qualidade exigido tem sido cada vez maior, seja através da intercambialidade do que se é produzido ou mesmo através da personalização de produtos,

faz-se necessária à busca pela autossuficiência do conhecimento nas técnicas produtivas e de medição. Para caracterizar uma medição, deve-se estar provido de sistemas confiáveis capazes de garantir um nível mínimo exigível como resultado⁶, entretanto, as variáveis inerentes aos produtos biológicos complexados a ensaios biológicos tornam complexa sua quantificação em termos de Unidades Internacionais (Le Système International d’Unités). Como alternativa, a atividade biológica ou o resultado de um ensaio biológico pode ser quantificado ou estimado em termos de MR, que é de conhecimento ser ativo ou conter o analito o qual é testado ao mesmo tempo em que a amostra teste⁷.

Assim, a necessidade de MRs no controle da qualidade de produtos imunobiológicos é notória e evidente. O MR é um recurso de alto valor agregado presente em inúmeros produtos dos mais diversos setores da indústria⁶, sendo primordiais, quando se considera as perspectivas urgentes de harmonização de metodologias entre laboratórios produtores e reguladores.

Visto que atualmente Bio-Manguinhos vem utilizando no controle da qualidade, lote a lote, da potência da vacina tríplice viral o MRT trivalente (sarampo/ caxumba/ rubéola) cedido através do acordo de transferência de tecnologia com GlaxoSmithKline (GSK) e diante do avançado estágio da transferência de tecnologia desta vacina, o objetivo do estudo foi estabelecer e validar um MRT que será utilizado na rotina como controle dos ensaios para a determinação de potência da vacina tríplice viral nos laboratórios de controle da qualidade de Bio-Manguinhos e do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS).

Esta iniciativa traz relevâncias para a saúde pública, uma vez que contribui para a harmonização dos parâmetros técnicos de controle da qualidade realizados pelas Instituições nacionais, atende o requerimento da ANVISA, que em sua Agenda Nacional de Prioridades de Pesquisa em Vigilância Sanitária⁸ propõe como estratégias o desenvolvimento de MRs e contribui para a evolução da autossuficiência nacional na produção de vacinas.

MATERIAL E MÉTODOS

Vírus e Células

A cepa Schwarz da vacina do sarampo, a cepa RIT 4385 - derivada da cepa Jeryl Lynn da vacina da caxumba e a cepa Wistar RA 27/3 da vacina da rubéola foram utilizadas para a elaboração do MRT. As três cepas são constituintes da vacina trivalente sarampo/caxumba/rubéola empregada no programa de vacinação pública no Brasil. As células de linhagem utilizadas para titulação do vírus foram a Vero para sarampo e caxumba e RK-13 para a rubéola.

Participantes

Dois laboratórios brasileiros participaram do estudo. O Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos Bio-Manguinhos (Bio, laboratório A) e o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS, laboratório B), responsável pela liberação de lotes de imunobiológicos utilizados no Brasil.

Candidato a material de referência de trabalho da vacina tríplice viral

O lote da vacina candidato, designado inicialmente de $cMRT_{Bio}$, foi originário de uma partida de produção de rotina. Cada dose de 0,5 mL do $cMRT_{Bio}$ reconstituído (que corresponde a dose humana, DH) contém não menos que o equivalente a 1.000, 5.000 e 1.000 $CCID_{50}$ (dose 50 % infectante em culturas de células) para o vírus do sarampo, caxumba e rubéola, respectivamente.

Materiais de referência

Os ensaios foram validados em paralelo com os MR internacional (MRI) monovalentes, provenientes do *National Institute for Biological Standards and Control* (NIBSC), sendo estes designados de MRI_{NIBSC} sarampo (MRI_{NIBSC} sarampo, code: 92/648), caxumba (MRI_{NIBSC} caxumba, code: 90/534) e rubéola (MRI_{NIBSC} rubéola, code: 91/688) e com o MRT controle (MRT_{CTRL}) originário da GSK e atual MRT de Bio-Manguinhos.

Determinação da potência ou titulação viral pelo método de $CCID_{50}$

Para a titulação, por teste foram utilizados três frascos do lote $cMRT_{Bio}$, um frasco do lote MRT_{CTRL} ou um frasco do MRI_{NIBSC} reconstituídos no diluente. Os MRTs mono ou multivalentes foram diluídas consecutivamente em fator 10 seguida pelo fator 4 (laboratório A) e fator 2 (laboratório B) em antissoros específicos que permitem a neutralização dos vírus. Para a visualização do vírus da caxumba foi utilizado o antissoro do sarampo, para a visualização dos vírus do sarampo e da rubéola foi utilizado o antissoro da caxumba.

Para cada diluição da vacina, um volume de 0,5 mL foi inoculado sobre a monocamada de células Vero (caxumba e sarampo) e RK-13 (rubéola). No laboratório A as placas foram incubadas a 33 °C por 9 dias em estufa contendo 5 % de CO_2 , e os títulos dos vírus presentes na vacina calculados pelo método de Reed-Muench. No laboratório B as placas contendo células Vero foram incubadas a 36 °C por 9 dias e as placas contendo células RK-13 foram incubadas a 32 °C por 12 dias. Após incubação, o efeito citopático foi avaliado e os títulos calculados pelo método de Spearman e Karber. Com base nas leituras dos vírus do sarampo, caxumba e rubéola, a potência foi expressa em $\log_{10} CCID_{50}/DH$.

Análise da homogeneidade do lote candidato

Para a avaliação da homogeneidade do lote $cMRT_{Bio}$, dez frascos foram selecionados aleatoriamente, sendo avaliados em quadruplicata. Os resultados de potência foram analisados quanto a variabilidade inter e intra-frasco pela determinação dos desvios-padrão (DP) e coeficientes de variação (CV), utilizando o modelo de efeitos aleatórios^{9,10} utilizando o software R Project.

Controle estatístico de processo

As cartas de controle foram confeccionadas para verificar se o processo de medição está sob controle estatístico, sendo

elaboradas pelas diferenças das médias das quadruplicatas do $cMRT_{Bio}$ e do padrão MRT_{CTRL} para cada um de seus componentes. Para isso foi utilizado o programa de controle estatístico de processo, SPC Explorer RT, da empresa Quality America Inc. Os limites de confiança de 2 ou 3 DP foram calculados a partir da dispersão das diferenças supracitadas até o vigésimo valor de cada gráfico, como recomendado pela OMS¹¹. Os valores que apresentam um círculo indicam que o processo deve ser revisto o que pode ocorrer em alguma das seguintes situações: 9 pontos sucessivos do mesmo lado da linha central e 6 pontos sucessivos subindo ou descendo. Quando um valor estiver localizado além da linha de 3 DP, este ensaio é considerado inválido e deve ser repetido, nesse caso o programa sinaliza com um círculo e um quadrado em volta do ponto.

Análises estatísticas

Os critérios de aceitação dos testes foram àqueles estabelecidos pela Farmacopeia Brasileira¹. As avaliações gráficas realizadas permitem verificar se os resultados obtidos variam de forma diferenciada conforme o dia e a amostra testada. Visando avaliar a potência média de cada componente, considerando e quantificando as variações que são devidas aos diferentes dias e amostras foi utilizado um modelo de efeitos aleatórios¹²

utilizando o software R Project. Este modelo permite estimar a proporção da variabilidade (CV e DP) em relação aos diferentes dias e amostras, além de considerar a influência destes fatores na estimação da potência média.

A consistência dentro de cada laboratório foi determinada pelo cálculo do CV do log da potência estimada do $cMRT_{Bio}$, independentemente para os três componentes virais. A variação entre os laboratórios foi expressa pelo DP e variações (menor e maior) da potência estimada de cada laboratório. A potência foi estabelecida pela combinação de todos os frascos analisados e expressos em $\log_{10} CCID_{50} / DH$ e intervalo de confiança de 95 % (IC 95 %).

RESULTADOS

Ensaio de calibração (verificação)

Visto que a OMS preconiza a calibração do MRT candidato frente ao MRI, foi realizada uma análise de equivalência entre o MRI_{NIBSC} (monovalentes) *versus* o MRT_{CTRL} (trivalente) devido à quantidade limitada do MRI_{NIBSC} . Este desenho experimental teve como objetivo utilizar o MRT_{CTRL} como referência do desempenho dos ensaios de potência do $cMRT_{Bio}$. Os resultados demonstraram equivalência da potência entre os padrões avaliados, sendo o MRT_{CTRL} validado como padrão interno de desempenho do teste de potência do $cMRT_{Bio}$ (Tabela 1).

Tabela 1. Dados obtidos no ensaio de calibração do MRT_{CTRL} frente ao MRI_{NIBSC}

Vírus componente	Potência ($\log_{10} CCID_{50} / DH$)					
	Sarampo		Caxumba		Rubéola	
Potência especificada	$\geq 3,0$		$\geq 3,7$		$\geq 3,0$	
Replicata	MRI_{NIBSC}	MRT_{CTRL}	MRI_{NIBSC}	MRT_{CTRL}	MRI_{NIBSC}	MRT_{CTRL}
1	3,60	3,90	4,47	4,90	3,47	4,26
2	3,45	3,73	4,41	4,86	3,45	4,25
3	3,47	3,90	4,74	5,20	3,51	4,11
4	3,45	4,13	4,71	4,96	3,7	4,11
Média	3,49	3,90	4,58	4,98	3,53	4,18

Homogeneidade do lote candidato ao material de referência de trabalho para o teste de potência

A homogeneidade do lote $cMRT_{Bio}$ foi avaliada pelos parâmetros de variabilidade inter e intra-frascos. Os resultados obtidos foram considerados homogêneos, visto que todos os CVs foram inferiores a 10 % (Tabela 2), estando dentro do limite de aceitação¹³. Estes limites foram embasados na recomendação da OMS (1997), que aceita o valor de acima de 50 % de variabilidade para ensaios biológicos¹⁴. Em paralelo, a análise residual indica que a variância dos resíduos é constante ($p > 0,05$) e os resíduos são normais ($p > 0,05$), reforçando que as suposições do modelo (homocedasticidade e normalidade) são válidas e o lote $cMRT_{Bio}$ pode ser considerado homogêneo.

Avaliação da potência biológica

Os dados do comportamento da análise de potência do MRT_{CTRL} e $cMRT_{Bio}$ foram agrupados pelo dia de análise. As variações relativas a estes parâmetros foram quantificadas utilizando um modelo de efeitos aleatórios⁸. Baseado nestes cálculos foi possível quantificar as fontes de variabilidade que compõem a variância da potência viral, usando o DP estimado, CV e IC 95 %. O conhecimento destes componentes de variância permite melhor avaliação de respostas a diferentes ensaios, conduzidos ou não no mesmo dia. Os valores calculados individualmente para os componentes virais do $cMRT_{Bio}$ encontrados nos dois laboratórios demonstraram o mesmo

padrão de variação (Tabela 3). Baseados nestes componentes de variância, foram calculadas as potências virais individuais obtidas pelas instituições e as potências institucionais combinadas para a obtenção do cálculo final da determinação da potência viral do $cMRT_{Bio}$ ($\log_{10} CCID_{50} / DH$) (Tabela 4).

Sarampo

Baseado nos componentes de variância, a potência média para sarampo no $cMRT_{Bio}$ pôde ser estimada e o IC 95 % calculado considerando as fontes de variação estudadas para cada um dos laboratórios. De acordo com os resultados demonstrados na Tabela 3, verificamos um DP menor que 0,5 para todas as fontes de variação (dia, inter- e intra-frasco), bem como, o CV menor que 10 % em ambos os laboratórios que realizaram o ensaio.

Assim, a potência média estimada ($\log_{10} CCID_{50} / DH$) do componente sarampo obtida pelo laboratório A deste lote foi de 3,73 e IC 95 % entre 3,48 - 3,98, enquanto do laboratório B foi de 3,72 e IC 95 % entre 3,68 - 3,77 (Tabela 4). De modo a garantir a confiabilidade dos dados apresentados, foi avaliado o perfil dos resultados através do uso de cartas controle demonstrando que o processo de medição está sob o controle estatístico, permitindo ainda, uma avaliação correta da conformidade do produto¹³. Na Figura 1A é possível observar que a partir do nono valor consecutivo do mesmo lado da linha da média, apenas três valores foram

Tabela 2. Avaliação da homogeneidade do $cMRT_{Bio}$

Medidas	Vírus componente		
	Sarampo	Caxumba	Rubéola
	Potência ($\log_{10} CCID_{50} / DH$) ^a		
Média ^b	3,56	4,57	3,45
DP inter-frasco	0,138	0,421	0,074
CV inter-frasco (%)	3,88	9,21	2,13
DP intra-frasco	0,167	0,124	0,110
CV intra-frasco (%)	4,70	2,71	3,18

^aMédia referente as quadruplicatas do frasco de $cMRT_{Bio}$; ^bMédia referente às médias de cada frasco $cMRT_{Bio}$. DP: desvio-padrão; CV: coeficientes de variação

destacados pelo programa como sinal de alerta para a revisão do processo, mas que não invalidam os ensaios. Conforme os resultados estatísticos demonstrados na Tabela 4, a potência combinada de ambos os laboratórios foram similares, o CV entre eles foi de 2,65 e média ponderada de 3,72 e IC 95 % entre 3,53 - 3,91 (\log_{10} CCID₅₀/DH).

Caxumba

Na avaliação do componente caxumba, os valores da análise de variância foram estimados conforme supracitado, sendo verificadas as suposições do modelo utilizado como satisfeitas, não sendo identificados valores discrepantes. De acordo com os resultados demonstrados na Tabela 3, verificamos um DP menor que 0,5 para todas as fontes de variação (dia, inter- e intra-frasco), bem como, o CV menor que 10 %, em ambos os laboratórios que realizaram o ensaio, conforme o observado para o vírus do sarampo.

Baseado nestes componentes de variância, a potência média para caxumba no cMRT_{Bio} pôde ser estimada e IC 95 % calculado considerando as fontes de variação estudadas. Assim, a potência média estimada (\log_{10} CCID₅₀/DH) do componente caxumba para este lote foi de 4,75 e IC 95 % entre 4,57 - 4,94, enquanto do laboratório B foi de 4,81 e IC 95 % entre 4,79 - 4,84 (Tabela 4). A confiabilidade dos dados foi avaliada pela carta controle foi utilizada confirmando que o processo de medição está sob o controle estatístico e o produto em conformidade, observando-se que todos os valores encontravam-se entre as duas linhas de 2 DP (Figura 1B).

Conforme os resultados estatísticos demonstrados na Tabela 4, mostramos que as potências combinadas de ambos os laboratórios foram similares, o CV entre eles foi de 1,56 e média ponderada de 4,80 e IC 95 % entre 4,66 - 4,95 (\log_{10} CCID₅₀/DH).

Rubéola

Na avaliação do componente rubéola, os resultados da análise de variância foram estimados conforme supracitado, sendo verificadas as suposições do modelo utilizado

como satisfeitas e não sendo identificados valores discrepantes. De acordo com os resultados demonstrados na Tabela 3, verificamos um DP menor que 0,5 para todas as fontes de variação (dia, inter- e intra-frasco), bem como, o CV menor que 10 %, em ambos os laboratórios, conforme o observado para o vírus do sarampo e caxumba.

Baseado nestes componentes de variância, a potência média para rubéola no cMRT_{Bio} pôde ser estimada e seu IC 95 % calculado considerando as fontes de variação estudadas. A potência média estimada (\log_{10} CCID₅₀/DH) do componente rubéola para este lote foi de 3,67 e IC 95 % entre 3,51 - 3,83, enquanto do laboratório B foi de 3,70 e IC 95 % entre 3,67 - 3,73 (Tabela 4). A carta controle utilizada como ferramenta para acompanhar a tendência da potência do cMRT_{Bio}, confirmando que o processo de medição está sob o controle estatístico e o produto em conformidade. Na Figura 1C é possível observar que a partir do nono valor consecutivo do mesmo lado da linha da média, apenas dois valores foram destacados pelo programa como sinal de alerta para a revisão do processo, mas que não invalidam os ensaios.

Conforme os resultados estatísticos demonstrados na Tabela 4, mostramos que as potências combinadas de ambos os laboratórios foram similares, o CV entre eles foi de 2,20 e média ponderada de 3,70 e IC 95 % entre 3,54 - 3,85 (\log_{10} CCID₅₀/DH).

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

No presente estudo foi realizado o estabelecimento do primeiro MRT da vacina tríplice viral brasileira produzido pelo Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos (Bio-Manguinhos). A iniciativa de nacionalização de um MRT faz parte do processo de transferência de tecnologia e cumprimento de exigências das normativas de compêndio, uma vez que o atual MRT utilizado no controle da qualidade dos componentes virais sarampo/caxumba/rubéola para a liberação de lotes vacinais da tríplice viral pela Instituição são provenientes da empresa

Tabela 3. Componentes da variância para os vírus componentes do $cMRT_{Bio}$

Componente de variância	Vírus componente								
	Sarampo			Caxumba			Rubéola		
	DP	CV	IC	DP	CV	IC	DP	CV	IC
Análise realizada pelo laboratório A									
Entre dias	0,254	6,82	0,143 – 0,451	0,110	2,30	0 – 0,310	0,167	4,54	0,094 – 0,297
Inter-frasco	0,092	2,48	0,052 – 0,141	0,338	7,10	0,263 – 0,451	0,068	1,85	0,043 – 0,100
Intra-frasco	0,149	4,01	0,134 – 0,173	0,123	2,58	0,108 – 0,142	0,098	2,68	0,087 – 0,113
Análise realizada pelo laboratório B									
Entre dias	0,033	0,88	0,000-00,082	0,000	0,00	0-0,034	0,000	0,00	0-0,042
Inter-frasco	0,000	0,00	-	0,020	0,42	0-0,058	0,019	0,50	0-0,056
Intra-frasco	0,073	1,95	0,059-0,093	0,063	1,31	0,050-0,082	0,076	2,06	0,061-0,098

Laboratório A: Bio-Manguinhos e B: INCQS; DP: desvio-padrão; CV: coeficientes de variação; IC: intervalos de confiança de 95 %

Tabela 4. Média das potências estimadas dos laboratórios de todos os componentes virais $cMRT_{Bio}$

Vírus componente (Especificações)	Potência (\log_{10} CCID50/ DH)					
	Sarampo ($\geq 3,0$)		Caxumba ($\geq 3,7$)		Rubéola ($\geq 3,0$)	
	A	B	A	B	A	B
Laboratório						
Potência média	3,73	3,72	4,75	4,81	3,67	3,70
Potência combinada	3,72		4,80		3,70	
DP	0,007		0,042		0,021	
CV	2,65		1,56		2,20	

Laboratório A: Bio-Manguinhos e B: INCQS; DP: desvio-padrão; CV: coeficientes de variação

fornecedora da tecnologia, a GSK. O lote de MRT_{Bio} produzido originou 2.000 ampolas com a mesma concentração de material suficiente para a realização dos ensaios da potência biológica da vacina de rotina. O MRT_{Bio} foi estocado de forma estável, liofilizado a $-20^{\circ}C$ e monitorado sua qualidade e homogeneidade. O estabelecimento do MRT_{Bio} foi obtido pelo estudo colaborativo nacional, constituído do único produtor nacional da vacina e pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) demonstrando concordância entre laboratórios e ensaios, sendo considerado apropriado como MRT , segundo as normas da OMS.

Seguindo as premissas de produção e elaboração de MRs biológicos recomendados pela OMS⁴ e as adequações destas normas para MR secundários para vacinas¹⁵ foi realizado

o planejamento para o estabelecimento do candidato a MRT_{Bio} , denominado em um momento inicial de $cMRT_{Bio}$. Apesar da não obrigatoriedade do $cMRT_{Bio}$ ser originário de um lote comercial, a formulação combinada similar à da vacina (trivalente) produzida atualmente pela Instituição traz vantagens na comparabilidade frente aos MRs monovalentes, além de reduzir possíveis interferentes presente em outra formulação.

Após a conclusão que o lote produzido para o preparo do $cMRT_{Bio}$ apresentou características como integridade, composição e potência em conformidade com as especificações exigidas, a etapa seguinte recomendada pela OMS foi à verificação frente ao MRI. No contexto de ensaios biológicos e especificamente para a avaliação da potência dos componentes virais

da vacina tríplice, o MR é utilizado como controle positivo, ou seja, é um padrão para a determinação da eficácia do desempenho do ensaio¹⁵. Assim, foi elaborado o desenho experimental cruzado, onde inicialmente realizou-se a análise de equivalência entre o MRT_{NIBSC} versus o MRT_{CTRL} , atual MRT de Bio-Manguinhos utilizado na rotina laboratorial. Uma vez reafirmada a eficiência do MRT_{CTRL} como controle do ensaio, este foi utilizado no controle de todos os ensaios de determinação da potência dos componentes virais do $cMRT_{Bio}$. A importância da recalibração do MRT_{CTRL} frente ao MRT_{NIBSC} trouxe outra relevância: a revalidação do desempenho do ensaio de potência utilizado pela Instituição e previamente validado e protocolado junto a ANVISA, uma vez que, tanto o MRT_{NIBSC} como o MRT_{CTRL} apresentou resultados de potência dentro das especificações dos fornecedores.

Seguindo as etapas de caracterização do lote $cMRT_{Bio}$ foram selecionados 10 frascos aleatórios para o estudo de homogeneidade. Estes foram avaliados em quadruplicatas, sendo a variação no mesmo frasco (CV-intra-frasco) inferior a 5 % e entre os frascos (CV inter-frascos), inferior a 10 %. As variações encontradas para todos os componentes virais foram consideradas de baixa relevância quando levado em conta o quantitativo aceitável para ensaios biológicos (superior a 50 %) pela OMS¹⁴. Assim, a partir de análises estatísticas, considerando as variáveis importantes na determinação da homogeneidade de um lote candidato, o $cMRT_{Bio}$ foi considerado homogêneo.

Apesar do manual da OMS¹⁵ explicitar que é possível a elaboração do MRT sem o estudo colaborativo, quando se trata de um grande e único produtor da vacina em âmbito nacional, no presente trabalho é realizado um estudo colaborativo com o INCQS, responsável pela liberação de todos os lotes de vacina utilizados no Brasil, de modo a fortalecer o estudo e estabelecer um valor de consenso nacional da potência dos componentes virais do $cMRT_{Bio}$.

Para a avaliação da potência biológica dos vírus que compõem o $cMRT_{Bio}$, optou-se pela avaliação da potência inter- e intra-frascos,

para ter um suporte quantitativo de valores de potência que reflitam o valor estimado mais próximo ao real e com menos interferentes, uma vez que as variáveis decorrentes do perfil biológico do ensaio e do MR justificarem estas variações. Em um primeiro momento, foi realizado uma análise de comportamento entre as médias dos frascos do $cMRT_{Bio}$ e MRT_{CTRL} e verificado que as potências oscilam de acordo com o dia, sendo este perfil pareado com o padrão MRT_{CTRL} . De posse deste entendimento, foi realizada uma análise das variáveis que influenciam, principalmente, os limites de potência, utilizando um cálculo de efeitos aleatórios, levando em consideração as variáveis dia, inter- e intra-frascos. Estes cálculos foram aplicados para os ensaios realizados pelas duas instituições colaboradoras. Uma vez ajustado o modelo, a potência estimada de cada componente viral do $cMRT_{Bio}$ foi calculada em $(\log_{10} CCID_{50}/DH)$ 3,72 para sarampo, 4,80 para caxumba e 3,70 para rubéola.

De modo a determinar a consistência dos valores de potência estimados, o cálculo do CV foi realizado para todos os componentes da vacina, sendo observado que os valores foram inferiores a 5 % para o CV intra-frasco e menores que 10 % para o CV inter-frascos, levando em consideração o aceitável pela OMS, estas pequenas variações intrínsecas e características de ensaios biológicos são justificadas. Corroborando com estes dados, o DP de todos os ensaios foi menor que 0,5 para todas as fontes de variação (entre dias, inter- e intra-frasco), porém, esta fonte de variação não representa um valor referencial, dificultando sua interpretação.

Devido à falta de parâmetro da variabilidade aceitável para MR biológico, a proposta de que o índice de 10 % de variação seria um ótimo resultado de confiança dos testes foi reforçada por alguns estudos colaborativos descritos na literatura. Baseado nestes dados a consistência da potência viral da vacina tríplice viral oriunda de diferentes laboratórios produtores foi determinada pelo cálculo do CV, sendo observados valores de até 7,7 % para sarampo, 11,6 % para caxumba

e 11,7 % para rubéola quando analisadas as diferentes vacinas e de 10,8 % para sarampo, 16,9 % para o vírus da caxumba e 13,7 % para o vírus da rubéola quando avaliada a média do MR_{NIBISC} entre os laboratórios participantes de um estudo colaborativo¹⁶. Em contrapartida, os CVs encontrados no estudo atual foram de 2,65 % para sarampo, 1,56 % para caxumba e 2,20 % para rubéola demonstrando que o $cMRT_{Bio}$ apresenta consistência da potência estimada com pouca variabilidade quando avaliada por diferentes laboratórios, apesar das diferenças metodológicas. Porém, a maior variabilidade encontrada no trabalho supracitado¹⁷ pode ser decorrente da pouca consistência entre os laboratórios envolvidos neste estudo colaborativo, sendo este perfil de variação já relatado previamente em um estudo internacional com variações aceitáveis pela OMS de (\log_{10}): 1,0 para sarampo, 2,0 para caxumba e 2,0 para rubéola. Assim, visto que não existe um padrão de variação definido e por se tratar de um ensaio biológico, foi considerado que os valores de CV e DP encontrados nas variáveis avaliadas são insignificantes, ponderando os valores aceitáveis pela OMS¹⁴. Isto reforça que os valores encontrados neste trabalho trazem grande credibilidade a potência estimada para os componentes virais do $cMRT_{Bio}$.

Tendo conhecimento que as variações encontradas no MR podem ocorrer por alteração da atividade do produto, do próprio método (insumos, reagentes, equipamentos, operadores, ambiente) e de outros fatores envolvidos (como linhagens celulares), o uso de uma abordagem que permita quantificar a porção da variabilidade final que é devida a cada uma destas fontes foi considerado um ganho relevante no conhecimento do perfil dos resultados do MR, na avaliação das tendências dos resultados obtidos durante os ensaios de potência biológica dos componentes virais do $cMRT_{Bio}$. Nesse sentido, os valores atribuídos para o $cMRT_{Bio}$ em cada ensaio foram avaliados utilizando uma importante ferramenta estatística: a confecção de cartas controle dos componentes virais do $cMRT_{Bio}$ para análise de tendências dos resultados e variações no processo de produção, sendo esta uma recomendação da OMS^{14,18}.

Visto que as potências biológicas flutuam,

principalmente, de acordo com os dias e sendo esta afirmativa embasada no perfil comparativo com o MRT_{CTRL} , foram analisadas as cartas controle do processo de caracterização do $cMRT_{Bio}$ pela diferença entre a sua potência estimada e a do MRT_{CTRL} . Esta estratégia visou o conhecimento e quantificação da interferência da variável dia na determinação dos limites de controle (2DP e 3DP), parâmetros estes utilizados na realização de testes de desempenho^{14,18}. De acordo com os gráficos, foi verificado que o desempenho dos testes estava sob o controle estatístico, apresentando flutuações dentro dos limites esperados para um produto biológico avaliado por um ensaio biológico. Esta ferramenta também é utilizada para dar suporte na avaliação do perfil de variação do MRT_{CTRL} utilizado na rotina de Bio-Manguinhos. A partir dos dados obtidos pela Instituição no ano de 2013, foi verificado que os CVs inter-frasco dos componentes virais do MRT_{CTRL} são similares aos resultados demonstrados neste estudo com o $cMRT_{Bio}$ (dados não mostrados), sendo um interessante ponto de referência interno para o estudo, uma vez que estes são dados provenientes de uma mesma rotina laboratorial.

Assim, esta ferramenta traz confiabilidade aos resultados declarados para as potências estimadas dos componentes virais do $cMRT_{Bio}$ reforçando a conformidade do produto e assegurando a sua qualidade mas, principalmente, sendo mais um controle e critério de validação do ensaio e, conseqüentemente dos resultados obtidos com as amostras.

Este artigo apresenta os resultados dos estudos realizados com $cMRT_{Bio}$ da vacina tríplice viral (contra sarampo/ caxumba/ rubéola) para ser utilizada na rotina da determinação de potência da vacina tríplice viral em substituição ao atual MRT controle fornecida pelo produtor mundial e responsável pela transferência de tecnologia (GSK). Os estudos foram baseados nas normativas de compêndios que preconizam os estudos de caracterização do lote candidato utilizando ferramentas estatísticas adequadas, visando à atribuição do seu valor, atendendo aos propósitos desejados e agregando maior confiabilidade aos ensaios de potência realizados por ambos participantes.

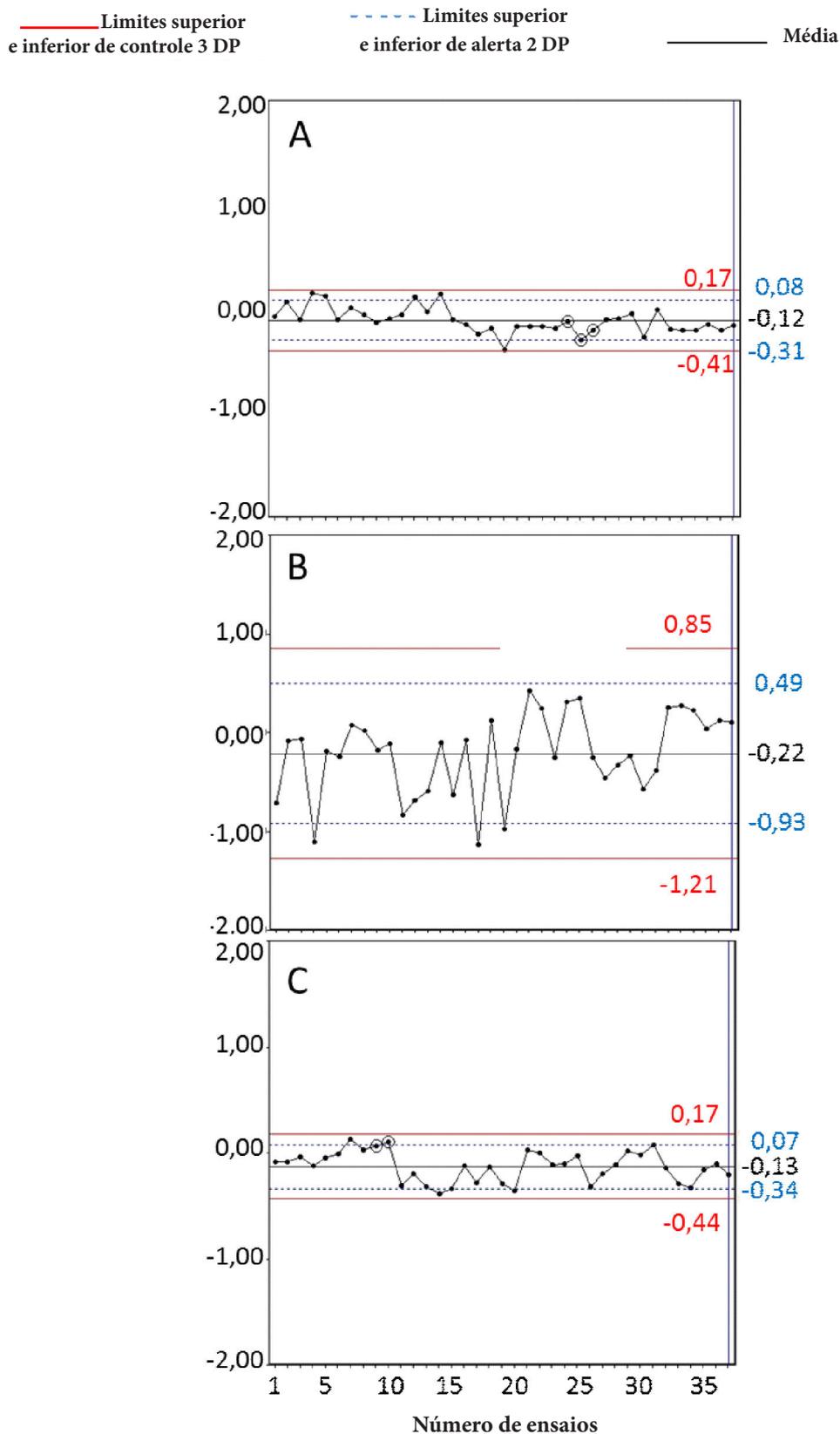


Figura 1. Cartas controle da potência biológica do componente viral sarampo (A), caxumba (B) e rubéola (C) do $cMTR_{Bio}$ comparando com o atual MTR (MTR_{CTRL})

Assim, de acordo com os resultados obtidos neste trabalho, foi verificado que o cMRT_{Bio} apresentou todas as características exigidas para ser utilizado como MRT, atendendo todas as recomendações da OMS¹⁵, sendo este material protocolado e rastreável na Instituição. Com a produção e caracterização do MRT_{Bio}, a Instituição conclui mais uma etapa do processo da transferência de tecnologia da vacina tríplice viral do produtor mundial (GSK) para a Instituição nacional produtora (Bio-Manguinhos), que suprirá todo o mercado nacional. Portanto, este estudo é de extrema relevância em saúde pública, descrevendo a expansão da tecnologia, obedecendo às diretrizes internacionais, cuidado com a qualidade e evolução para a autossuficiência nacional.

AGRADECIMENTOS

À Direção e à Coordenação de Pós-Graduação do INCQS/ FIOCRUZ pelo apoio na realização deste trabalho que foi baseado na dissertação de mestrado profissional vinculado ao programa de Pós-graduação em Vigilância do INCQS no ano de 2014 e à Bio-Manguinhos/FIOCRUZ pelo suporte financeiro e técnico para realização dos ensaios. Agradecimento especial à Daniel da Silva Guedes Jr. pela revisão do trabalho.

REFERÊNCIAS

1. Farmacopéia Brasileira, 5. Ed. Brasília: ANVISA, 2010.
2. OMS. Organización Mundial de La salud. Boas práticas da OMS para laboratórios de controle de qualidade de produtos farmacêuticos. 2010 [acesso 2015 Ago 08]. Disponível em: [http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s18681pt/s18681pt.pdf].
3. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC no 17, de 16 de abril de 2010. Dispõe sobre as boas práticas de fabricação de medicamentos. [acesso 2015 Ago 08] Disponível em: [http://brasilsus.com.br/legislações/rdc/103711-17.html].
4. World Health Organization – WHO. WHO Expert Committee on Biological Standardization. Meeting. WHO Expert Committee on Biological Standardization: Fifty- fifth Report. World Health Organization, n. 932; 2004.
5. International Laboratory Accreditation Cooperation – ILAC. Guideline for the in-house production of reference materials. LGC/VAM/1998/040, 1998.
6. World Health Organization – WHO. Technical Reports Series, Recommendations for the preparation, characterization and establishment of international and other biological reference standards. n. 932, 2006.
7. Minor P. International reference preparations for standardization of biological medicinal products. *Bundesgesundheitsbl*. 2014; 57(10):1145-51. [DOI: 10.1007/s00103-014-2027-z].
8. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Agenda Nacional de Prioridades em Vigilância Sanitária. Núcleo de Educação, Pesquisa e Conhecimento – NEPEC/ANVISA. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 2011 [acesso 2015 Out 11]. Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/3048f900474576208428d43fbc4c6735/Prioridades_de_Pesquisa_em_Vigilancia_Sanitaria.pdf?MOD=AJPERES].
9. Montgomery DC. Design and Analysis of Experiments. 7. ed. New York: John Wiley & Sons; 2008: 680.
10. Shapiro SS, Wilk MB. An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika*. 1965; 52:591-611. [DOI: 10.1093/biomet/52.3-4.591].
11. World Health Organization – WHO. Immunization surveillance, assessment and monitoring. 2012 [acesso 2014 Ago 15]. Disponível em: [http://www.who.int/immunization/monitoring_surveillance/en/].
12. Pinheiro J, Bates D. Mixed-Effects Models in S and S-PLUS (Statistics and Computing). 1 ed. Springer. 2009; 530 p.
13. World Health Organization – WHO. WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations: forty-first report. World Health Organization, n. 943, 1-156, 2007.

14. World Health Organization – WHO. A WHO guide to good manufacturing practice (GMP) requirements. Part 2: Validation. Chp.15. Validation of analytical assays. Geneva; 1997 [acesso 2015 Jul 20]. Disponível em: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/64465/2/WHO_VSQ_97.02.pdf].
15. World Health Organization – WHO. Manual for the establishment of the national and other secondary standard for vaccines. Geneva, World Health Organization, WHO/IVB/11.03; 2011.
16. Joseph L, Velayudhan A, Charuvila MV, Vayalappil MC. Reference biomaterials for biological evaluation. *J Mater Sci Mater Med*.2009; 20(1:S9-17). [DOI 10.1007/s10856-008-3522-2].
17. Forsey T, Health Alan B, Mino PD. A European collaborative study to assess the proficiency of laboratory estimates of potency of live measles, mumps and rubella tri-valent vaccines. *Biologicals*. 1993; 21(3):239-49. [DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.09.017].
18. World Health Organization – WHO. The Mumps Vaccine. 2009 [acesso 2014 Jul 10]. Disponível em: [http://www.who.int/vaccines-diseases/diseases/mumps_vaccine.shtm].

Determinação simultânea de Rifampicina, Isoniazida, Pirazinamida e Etambutol em comprimidos com doses fixas combinadas

Method for simultaneously determining the Rifampin, Isoniazid, Pyrazinamide and Ethambutol in the combined fixed-dose tablets

RIALA6/1653

Patrícia Condé de LIMA*, André Luiz Mazzei ALBERT, Kátia Christina LEANDRO

*Endereço para correspondência: Laboratório de Contaminantes Inorgânicos, Departamento de Química, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Av. Brasil, 4365, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, CEP 21040-900. Tel: 21 3865-5180. E-mail: patricia.lima@incqs.fiocruz.br

Recebido: 14.07.2015 - Aceito para publicação: 11.09.2015

RESUMO

Os comprimidos utilizados no tratamento da tuberculose possuem quatro fármacos associados, isoniazida, pirazinamida, etambutol e rifampicina, e são distribuídos gratuitamente pelo Sistema Único de Saúde. Os métodos analíticos oficiais para analisar este medicamento estão especificados na Farmacopeia Americana 36ª edição e na Farmacopeia Internacional 4ª edição. Porém, estes compêndios oficiais não possuem monografias para análise simultânea dos quatro fármacos. O objetivo deste estudo foi desenvolver uma metodologia para determinar simultaneamente os princípios ativos em comprimidos dose fixa combinada, utilizando-se cromatografia a líquido de alta eficiência com detector de ultravioleta-visível, pois é de grande importância para o controle da qualidade do medicamento. O método desenvolvido utilizou coluna cromatográfica C18 (250 x 4,6) mm e 5 µm, fase móvel constituída de fase aquosa (85 % tampão formiato de amônio 0,3 mol/L pH 5, 15 % metanol e 0,005 mol/L de Cu²⁺ ou 250 mg/L de CuSO₄.5H₂O) e fase orgânica (metanol, 0,1 % de trietilamina e 0,2 % de ácido fórmico). O fluxo foi de 1,0 mL/min e comprimento de onda de 265 nm para isoniazida, pirazinamida e o etambutol e de 335 nm para rifampicina. Este método apresentou desvio padrão relativo inferior a 2,0 % na precisão e linearidade para os quatro fármacos estudados.

Palavras-chave. isoniazida, pirazinamida, etambutol, rifampicina, CLAE-UV, tuberculose.

ABSTRACT

Tablets containing isoniazid, pyrazinamide, ethambutol and rifampicin are used for tuberculosis treatment, and they are freely distributed by the Brazilian National Health System. The official analytical methods for testing those substances in fixed-dose combined tablet are described in the United States Pharmacopeia and the International Pharmacopeia. None of these official compendiums refers to the methodologies for conducting the simultaneous analysis of these four drugs. This study aimed at developing an analytical methodology to determine simultaneously all of four drugs in tablets for tuberculosis treatment, by means of high performance liquid chromatography with ultraviolet-visible detector. The developed method used a chromatographic column with octadecylsilane stationary phase (250 mm x 4.6 mm x 5 µm particle size). The mobile phase was aqueous (85 % ammonium formate buffer pH 5, 15 % methanol and 250 mg CuSO₄.5H₂O), and organic phase (methanol, 0.1 % triethylamine and 0.2 % formic acid). The flow was 1.0 mL/min, at a wavelength of 265 nm or, when the equipment allowed, a wavelength of 335 nm for isoniazid, pyrazinamide and ethambutol and 335 nm for rifampicin. The developed methodology showed satisfactory results regarding the precision parameter, with relative standard deviation lower than 2.0 % for the studied drugs.

Keywords. isoniazid, pyrazinamide, ethambutol, rifampicin, HPLC-UV, tuberculosis.

INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa que afeta principalmente os pulmões. É causada por uma bactéria em forma de pequenos bastões cujo nome científico é *Mycobacterium tuberculosis* ou Bacilo de Koch (BK)¹⁻³.

Com a evolução do estudo da doença, os países desenvolvidos acreditavam que no final do século XX a TB estaria erradicada ou confinada aos países pobres. Entretanto, com o surgimento da epidemia da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) em 1981, ocorreu um aumento no número de casos notificados de TB em pessoas infectadas pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH). Além disso, os intensos movimentos migratórios populacionais, a desestabilização dos sistemas de saúde pública, a crise social/financeira mundial, o empobrecimento da população, a urbanização caótica e a ausência de controle social vêm dificultando o controle da doença^{4,5}.

A TB continua sendo um importante problema de saúde mundial, exigindo o desenvolvimento de estratégias para o seu controle, considerando os aspectos humanitários, econômicos e de saúde pública, merecendo atenção dos profissionais de saúde e da sociedade como um todo⁶.

Segundo o Boletim Epidemiológico⁷, em 2013 foram notificados 71.123 novos casos da doença no Brasil, a taxa de incidência foi de 35,4/100 mil habitantes. Em 2012, o coeficiente de morte foi de 2,3/100 mil habitantes. Houve uma redução global do número de casos e de óbitos por TB, nas duas últimas décadas. De 2003 a 2013, a queda do coeficiente de incidência foi de 20,4 % e o de mortalidade caiu 41 % desde 1990, mesmo tendo ocorrido uma queda nos indicadores de mortalidade e de incidência no ano de 2012. A OMS recomenda uma meta cura de pelo menos 85,0 % dos casos e o Brasil não conseguiu alcançar esta meta, tendo 70,6 % de cura. Esses indicadores colocam o Brasil em 16º lugar num ranking de 22 nações consideradas de grande circulação da doença.

O controle da TB é baseado na busca de casos, no diagnóstico precoce e adequado e seu tratamento até a cura, com o objetivo de interromper a cadeia de transmissão e evitar possíveis adoecimentos. Uma vez iniciado o tratamento, ele não deve ser interrompido, salvo após uma rigorosa revisão clínica e laboratorial que determine mudanças de diagnóstico^{6,8}.

O tratamento da TB é feito através do uso de antibióticos, sendo 100 % eficaz, se realizado por um período mínimo de seis meses sem interrupção². A melhor forma de assegurar a cura do paciente é a utilização dos princípios básicos para o tratamento, que são: associação medicamentosa adequada, doses corretas e uso por tempo suficiente, evitando a persistência bacteriana e o desenvolvimento de resistência aos fármacos⁶. A utilização de esquemas terapêuticos com diferentes fármacos simultaneamente é uma forma de se evitar a seleção de bacilos resistentes, uma vez que bacilos naturalmente resistentes a um medicamento podem ser sensíveis a outro⁹.

O esquema básico com comprimidos em doses fixas combinando os quatro fármacos (4 em 1) é indicado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e mundialmente utilizado, apresentando excelentes resultados quanto à efetividade, em particular pela maior adesão ao tratamento. Os comprimidos de doses fixas combinadas (DFC) apresentam as seguintes dosagens: Rifampicina (RMP) 150 mg, Isoniazida (INH) 75 mg, Pirazinamida (PYA) 400 mg e Etambutol (EMB) 275 mg. Os DFC possuem diversas vantagens sobre os fármacos utilizados isoladamente (monoterapia), dentre elas, destaca-se a diminuição dos erros de prescrição porque as doses recomendadas são padronizadas pela OMS; a quantidade de comprimidos ingeridos é menor, dando maior conforto e favorecendo a adesão do paciente ao tratamento¹⁰. O medicamento para o tratamento da TB é disponibilizado pelo Ministério da Saúde e distribuído pelo Sistema Único de Saúde (SUS).

As farmacopeias que apresentam metodologias de análise para dosagem dos quatro fármacos presentes no comprimido de DFC são a Farmacopeia Americana (USP) 36ª edição¹¹ e a Farmacopeia Internacional (Ph. Int.) 4ª edição¹². A USP recomenda o uso de uma metodologia para a dosagem dos fármacos nos comprimidos 4 em 1 por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) com detector de Ultravioleta-Visível (UV-Vis), onde a determinação do teor de RMP, INH, PYA é realizada separadamente da determinação do EMB. Na Ph. Int. a metodologia para a determinação do teor de INH, PYA e EMB é realizada separadamente da determinação da RMP. Os diluentes para a análise de RMP só diferem nas proporções, onde a USP usa o diluente 96:4 e a Ph. Int. usa 60:40 da mistura tampão fosfato (pH ~ 7) e metanol, respectivamente. As diferentes características instrumentais entre estas metodologias estão descritas para melhor entendimento no Quadro 1. A Farmacopeia Brasileira (FB) 5ª edição¹³ possui uma metodologia para análise dos fármacos individualmente. Portanto, nenhum destes compêndios possui metodologias para análise simultânea dos quatro fármacos.

Este artigo trata do desenvolvimento de um método analítico para a determinação simultânea de INH, PYA, RMP e EMB em comprimidos de doses fixas combinadas por CLAE-UV. É um método original e relevante na área de controle de qualidade de produtos farmacêuticos, uma vez que não existem monografias para a determinação simultânea dos quatro fármacos em comprimidos nos compêndios oficiais e nem na literatura científica, sem uma etapa de derivatização prévia das amostras. A apresentação deste novo método é de grande importância no campo da Vigilância Sanitária, pois é de interesse do Ministério da Saúde monitorar a qualidade destes medicamentos distribuídos pelo SUS, principalmente levando-se em conta o grande número de casos de tuberculose no Brasil, nos dias atuais. A utilização deste método simultâneo reduzirá o tempo de análise e o consumo de solventes, gerando economia aos laboratórios.

MATERIAL E MÉTODOS

Equipamento

O método foi desenvolvido pela técnica de análise por CLAE. Foi utilizado um cromatógrafo do fabricante Gilson com detector ultravioleta-visível 152, forno Shimadzu modelo CTO-6A, bomba binária 321 e injetor automático com sistema de resfriamento 235p. O software usado para aquisição de dados foi o Unipoint®. A coluna utilizada foi uma C18 Luna (250 x 4,6) mm, 5 µm. Fabricante: Phenomenex®. Lote: 5291-82.

Reagentes

Foram utilizados padrões USP de cloridrato de etambutol, lote H CAT.NO. 25700, isoniazida, lote H CAT.NO. 34970, pirazinamida, lote G CAT.NO. 58500 e rifampicina, lote J CAT.NO. 60400. As amostras foram feitas um pool de 20 comprimidos. Os reagentes tetracloreto de carbono, trietilamina e ácido fórmico utilizados foram grau P.A da marca Merck e, os solventes metanol e acetonitrila, grau CLAE da marca Tédia. A água utilizada foi obtida através do sistema de purificação de água Milli-Q, fabricante Milipore modelo Direct-Q.

Otimização do diluente da rifampicina

Com o objetivo de solubilizar e minimizar a degradação da RMP foram testados alguns solventes: apolar (tetracloreto de carbono), polar prótico (metanol) e polar aprótico (acetonitrila) e o diluente preconizado pela USP (solução 96 % tampão fosfato pH 6,8 com 4 % metanol).

Foram feitas soluções na proporção 10 % de água e 90 % de solvente orgânico (acetonitrila ou metanol), suficiente para promover a dissolução do EMB, sem provocar alterações estruturais na RMP, pois o EMB presente no comprimido 4 em 1 está sob a forma de cloridrato, insolúvel em solventes orgânicos. Após avaliar os resultados, foram testados estes diluentes aumentando-se a proporção de água e adicionando-se à solução tampão citrato de 0,03 a 0,15 mg.mL⁻¹ (pH 7,0), como antioxidante.

Quadro 1. Métodos de análise para RMP, INH, PYA e EMB apresentados nas Farmacopeias Americana e Internacional

	SUBSTÂNCIAS	ENSAIO	SUBSTÂNCIAS	ENSAIO
FARMACOPEIA AMERICANA (USP 36 – NF31, 2013)	Rifampicina	Coluna: C18 25cm x 4,6mm x 5µm	Etambutol	Coluna: Propilamina 15cm x 4,6mm x 5µm
		Detector: UV (238 nm)		Detector: UV (200 nm)
		Fluxo: 1,5 mL/min		Fluxo: 1,0 mL/min
	Isoniazida	Volume de injeção: 20µL		Volume de injeção: 100µL
	Pirazinamida	Diluyente: 96% tampão fostato (pH=6,8) + 4% metanol		Diluyente: tampão fostato pH=6,8
		Fases Móveis: A) tampão fostato pH=6,8:acetonitrila (96:4); B) acetonitrila:tampão fostato pH=6,8 (55:45)		Fases Móveis: acetonitrila + solução de trietilamina pH=7,0 (50:50)
		Gradiente de eluição: Tempo Solução A Solução B 0 min 100% 0% 5 min 100% 0% 6 min 0% 100% 15 min 0% 100%		Método de eluição: isocrático
FARMACOPEIA INTERNACIONAL (4ª Edição, 2011)	Isoniazida	Coluna: C18 15cm x 4,6mm x 5µm	Rifampicina	Coluna: C18 25cm x 4,6mm x 5µm
		Detector: UV (270 nm)		Detector: UV (254 nm)
		Fluxo: 2,0 mL/min		Fluxo: 1,0 mL/min
	Pirazinamida	Volume de injeção: 20µL		Volume de injeção: 20µL
		Diluyente: água		Diluyente: metanol:tampão fostato pH=7,0 (4:6)
	Etambutol	Fase Móvel: solução de acetato de amônio e acetato de cobre pH=5,0:metanol (94:6)		Fase Móvel: metanol + tampão fostato pH=7,0
		Método de eluição: isocrático		Método de eluição: isocrático

Estes diluentes foram testados em soluções de RMP de 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, tanto no padrão quanto na amostra (comprimido). Foram realizados testes com a solução contendo a menor concentração de tampão citrato resfriada a 5 °C, utilizando-se o recurso de resfriamento dos autoinjetores.

Formação do complexo metal-etambutol e sua absorção no UV

O EMB não absorve na região do UV e por isso foram realizados experimentos visando a formação de complexos metal-EMB, variando-se os valores de pH e de vários íons metálicos, como: Ni^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} e Cu^{2+} . A solução padrão de EMB 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foi testada com soluções de mesma concentração desses íons metálicos, diluídos em tampão acetato e tampão fosfato variando-se o pH de 4,0 a 7,0. Essas soluções foram analisadas por espectrofotometria para verificar a complexação desses íons metálicos com EMB e sua absorção na faixa do UV-visível.

Análises por espectrofotometria UV-visível em 265 nm foram realizadas para verificar a estequiometria do complexo EMB-metal, variando-se a concentração do EMB de 16 a 96 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ em relação a uma concentração fixa de 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ da solução de íon metálico que apresentou melhor resultado no estudo de complexação.

Desenvolvimento do método analítico

Para verificar a melhor resolução cromatográfica entre INH, PYA, EMB e RMP foi preparada uma solução padrão de aproximadamente 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ desses analitos, no comprimido, pesou-se aproximadamente 1,0000 g da amostra. Essa solução foi analisada em duas fases móveis: (i) tampão acetato de amônio de 0,1 a 0,5 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (pH entre 6 e 7), metanol e solução de Cu^{2+} e (ii) tampão formiato de amônio de 0,1 a 0,5 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (pH entre 4 e 5), metanol e solução de Cu^{2+} . Através da avaliação dos resultados cromatográficos obtidos foi definida a fase móvel aquosa a ser utilizada.

Para melhorar o perfil cromatográfico da análise dentro dos parâmetros de simetria,

após 12 minutos de análise cromatográfica, foi alterada a fase móvel aquosa para a fase móvel orgânica, constituída de metanol, trietilamina e ácido fórmico, conforme Tabela 1.

Tabela 1. Rampa de programação do modo gradiente para análise da INH, PYA, EMB e RMP com trietilamina e ácido fórmico na fase orgânica

Tempo	Fase aquosa (%)	Fase orgânica (%)
0 - 12	100	0
12-20	0	100
20-35	100	0

Após definir as condições analíticas a serem utilizadas, o teste de verificação da adequação do sistema foi realizado para assegurar a performance do sistema cromatográfico no início e durante a realização das análises, provendo assim dados de qualidade aceitáveis. Foram avaliados os parâmetros fator de cauda, resolução e fator de capacidade, enquanto que a eficiência cromatográfica foi avaliada pelo número de pratos teóricos.

O método desenvolvido para a determinação simultânea do teor de INH, PYA, EMB e RMP foi submetido aos parâmetros de avaliação de linearidade e precisão. Estes parâmetros de avaliação são baseados no Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos, da Anvisa, e Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos, do Inmetro^{14, 15}.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Segundo a USP, existe uma diferença no tempo de preparo e análise da RMP das soluções padrão e amostra. A solução padrão de RMP deveria ser analisada em até 10 minutos, enquanto que a solução amostra poderia ser analisada em até 2 horas. Inicialmente, um dos objetivos deste trabalho foi apresentar alguma alternativa viável para impedir a degradação da RMP durante a análise quantitativa.

O estudo da estabilidade da RMP foi realizado através de injeções sucessivas de uma solução de amostra de RMP (comprimido),

utilizando-se o diluente indicado na técnica de análise de teor de RMP, PYA e INH da USP, por 2 horas, em temperatura ambiente. A avaliação estatística para verificar a significância da regressão das concentrações durante o intervalo de tempo estudado foi observada pela aplicação do valor p da inclinação da regressão. Se o valor de p fosse maior que 0,05 (ao nível de confiança de 95 %), a inclinação da regressão linear deverá ser considerada insignificante¹⁶.

Foram observadas degradações significativas (valores de p menores que 0,05) em todos os testes realizados, utilizando-se os seguintes diluentes: USP (96 % tampão fosfato pH ~ 7 e 4 % de MeOH), MeOH, MeCN e 90 % de MeOH e 10 % de H₂O e 90 % de MeCN e 10 % de H₂O, ambos com tampão citrato nas concentrações de 0,03 a 0,15 mg.mL⁻¹ (pH 7,0). Porém, quando os diluentes utilizados foram 90 % de MeCN e 10 % de água ou 90 % de MeOH e 10 % de água com tampão citrato 0,03 mg.mL⁻¹ (pH 7,0) e resfriados a 5 °C, o tempo de análise aumentou para 18 horas,

com valores de p de aproximadamente 0,66, observando-se que a degradação da RMP foi insignificante, como podemos observar na Figura 1.

De acordo com Farias¹⁷, os cátions formam complexos estáveis com o amoníaco e com a maioria das aminas, exceto as aminas pouco nucleofílicas. No caso do EMB, foi observada a formação de complexo com Ni²⁺ e Cu²⁺, sendo que o complexo com o Cu²⁺ foi mais estável e com maior absorvidade molar. Outro fato observado foi que o aumento do pH gerou um deslocamento batocrômico no espectro UV-visível do complexo formado.

A estequiometria do complexo Cu-EMB foi determinada por espectrofotometria UV-visível em 265 nm, variando-se a concentração de EMB e mantendo-se fixa a concentração de Cu²⁺ (10 µg.mL⁻¹)¹⁸. Através deste estudo, foi possível concluir que a estequiometria consiste de 2 mols de complexante para 1 átomo-grama de íon cúprico em tampão acetato (pH 6,0).

Os testes seguintes foram realizados

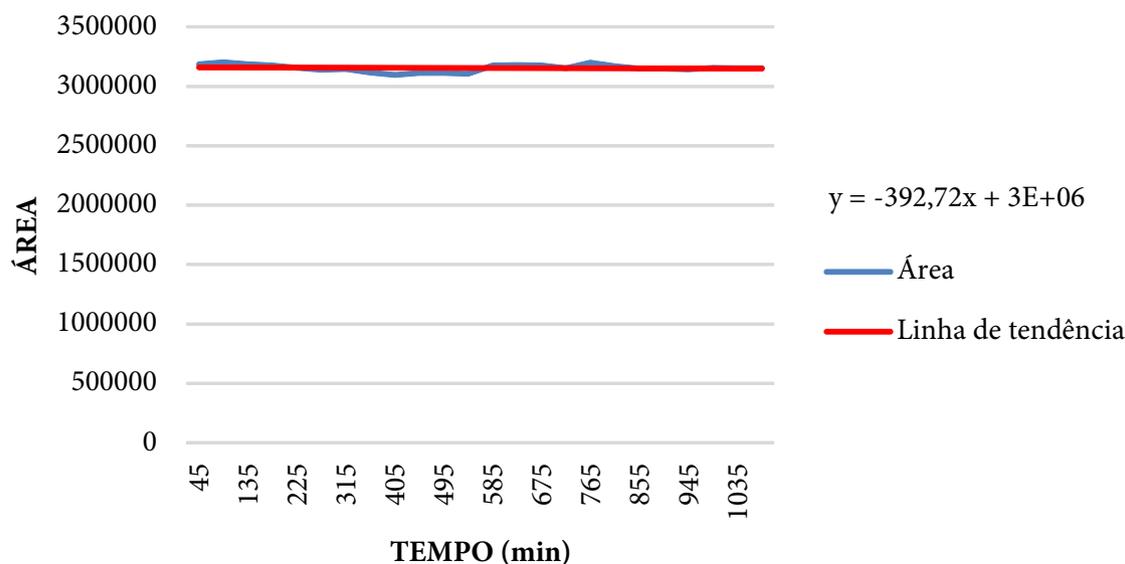


Figura 1. Gráfico da estabilidade da RMP (200 µg.mL⁻¹) no comprimido com diluente 10 % de água e 90 % de metanol a 5 °C

para a obtenção de um cromatograma contemplando os quatro fármacos, dentro dos critérios de aceitabilidade dos parâmetros de adequação do sistema cromatográfico. Como esses fármacos contêm um ou mais grupos ácidos e/ou básicos e suas retenções em fase reversa são muito sensíveis à variação do pH, utilizou-se tampão na fase móvel. Foram testados o uso do acetato de amônio em pH na faixa de 6 a 7 ($pK_{a_{HAC}} = 4,8$; 20 °C) e formiato de amônio em pH levemente ácido, na faixa de 4 a 5 ($pK_{a_{HFO}} = 3,8$; 20 °C), mesmo estando no limite ou extrapolando a capacidade tamponadora máxima. O formiato de amônio demonstrou ser o tampão mais adequado pois proporcionou uma melhor simetria dos sinais e os valores de pKa dos fármacos (INH $pK_a = 2,0$ e $3,5$; PYA $pK_a = 0,5$; EMB $pK_a = 6,35$ e $9,35$ e RMP $pK_a = 1,7$ e $7,9$) estão afastados da faixa de pH do tampão formiato.

Devido à presença de grupamentos básicos, principalmente na INH e RMP, haveria uma forte interação com o grupo silanol da fase estacionária ($pK_a \sim 3,5$), o que comprometeria a simetria dos picos. Para prevenir tal problema, foi utilizada uma coluna cuja fase estacionária era desativada (*endcapped*), bem como, foi feita a adição de uma base orgânica (trietilamina) à fase móvel.

A fase móvel aquosa foi otimizada

para a eluição dos três princípios ativos (INH, PYA e EMB) e a composição estabelecida foi: $0,3 \text{ mol.L}^{-1}$ de formiato de amônio com pH dentro da faixa de 4,5 a 5,0, 15 % de metanol e $0,005 \text{ mol.L}^{-1}$ de Cu^{2+} . O volume de fase móvel orgânica (MeOH) foi gradualmente aumentado segundo uma programação de gradiente linear até a eluição da RMP. Nestas condições cromatográficas o sinal da RMP não foi considerado apropriado. Para a adequação desta condição foi adicionado à fase móvel orgânica trietilamina e ácido fórmico, ajustando o sinal da RMP dentro dos parâmetros de simetria.

As condições finais para análise do comprimido 4 em 1 por CLAE/UV desenvolvidas no presente estudo foram: fase móvel aquosa - 85 % tampão formiato de amônio $0,3 \text{ mol.L}^{-1}$ (pH 5), 15 % metanol e $0,005 \text{ mol.L}^{-1}$ de Cu^{2+} e fase móvel orgânica - metanol, 0,1 % de trietilamina e 0,2 % de ácido fórmico em modo gradiente segundo a Tabela 1. O volume de injeção foi de $10 \mu\text{L}$ em um fluxo de 1 mL.min^{-1} , nos comprimentos de onda de 265 e 335 nm. As amostras foram mantidas no sistema cromatográfico a 5 °C durante toda a análise.

O software do equipamento utilizado (Unipoint®) permitiu a troca para um novo comprimento de onda na mesma

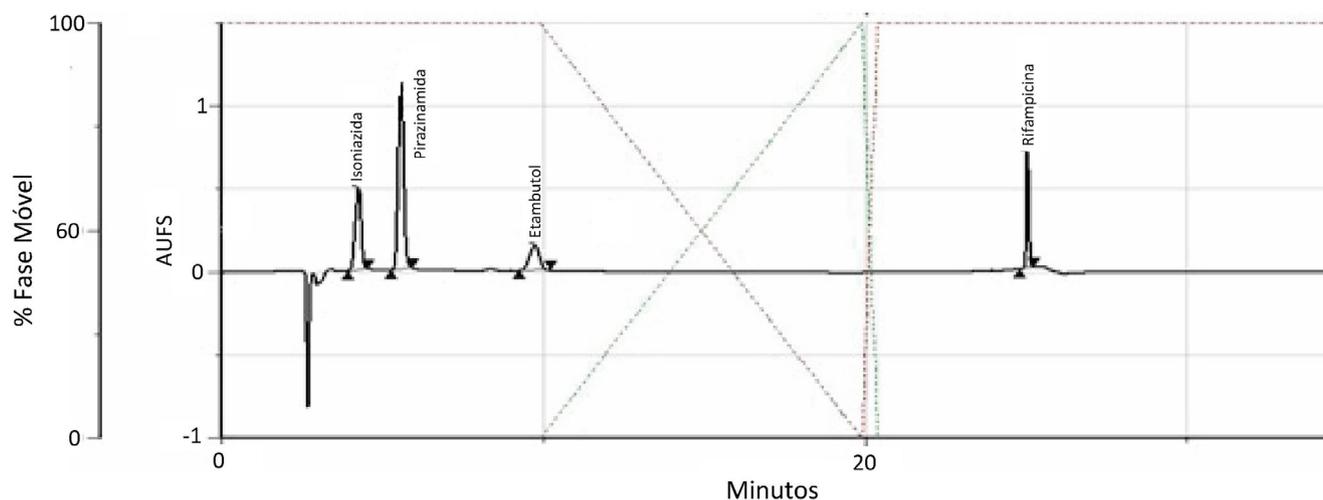


Figura 2. Cromatograma obtido da análise do comprimido 4 em 1 nos comprimentos de onda de 265 (INH, PYA e EMB) e 335 nm (RMP)

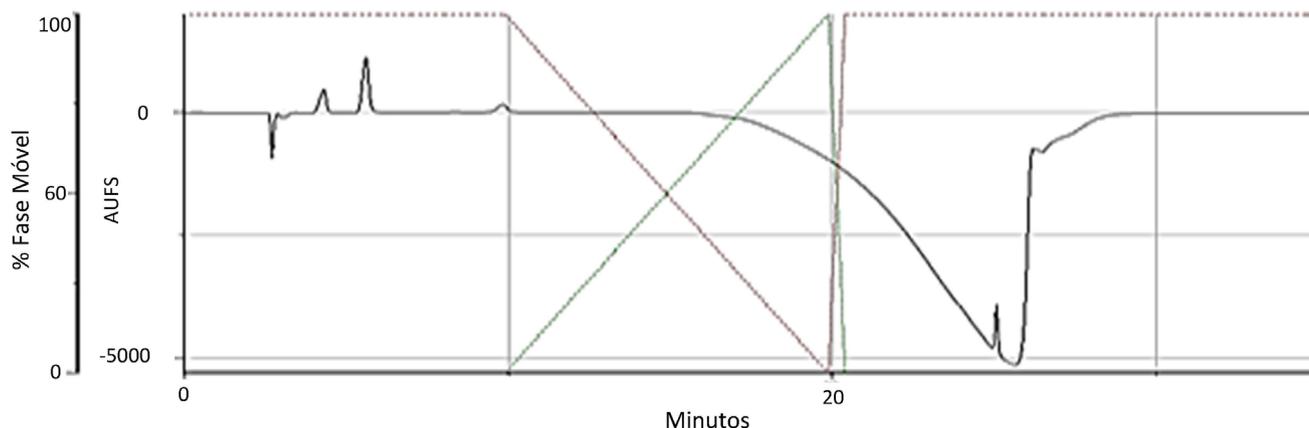


Figura 3. Cromatograma do comprimido 4 em 1 somente no comprimento de onda em 265 nm

análise cromatográfica, zerando a linha de base e ajustando a sensibilidade da célula fotomultiplicadora em três comandos de tempo. O monitoramento da INH, PYA e complexo (Cu-EMB) foi realizado no comprimento de onda de 265 nm. A partir de 12 minutos, a RMP foi monitorada no comprimento de onda de 335nm. O cromatograma da análise realizada pode ser observado na Figura 2.

Condições experimentais: cromatógrafo Gilson com detector UV, coluna C18 (250 x 4,6) mm, 5 μm com fluxo de 1 mL.min⁻¹, volume de injeção de 10 μL , comprimento de onda de 265 e 335 nm, fase aquosa - 85 % tampão formiato de amônio 0,3 mol.L⁻¹ pH 5, 15 % metanol e 0,005 mol.L⁻¹ de Cu²⁺ e fase orgânica - metanol, 0,1 % de trietilamina e 0,2 % de ácido fórmico em modo gradiente segundo a Tabela 1.

Se o cromatógrafo utilizado não possuir um software que possibilite a mudança do comprimento de onda durante a análise cromatográfica, todas as substâncias podem ser visualizadas em 265 nm, porém haverá um declínio natural da linha de base à medida que a composição da fase orgânica aumentar durante a programação do gradiente, conforme pode ser observado na Figura 3. Isto ocorre porque a fase aquosa absorve muito mais que a fase orgânica nesse comprimento de onda.

Condições experimentais: cromatógrafo

Gilson com detector UV, coluna C18 (250 x 4,6) mm, 5 μm com fluxo de 1 mL.min⁻¹, volume de injeção de 10 μL , comprimento de onda de 265 nm, fase aquosa - 85 % tampão formiato de amônio 0,3 mol.L⁻¹ pH 5, 15 % metanol e 0,005 mol.L⁻¹ de Cu²⁺ e fase orgânica - metanol, 0,1 % de trietilamina e 0,2 % de ácido fórmico em modo gradiente segundo a Tabela 1.

A aquisição dos dados experimentais (cromatogramas) foi realizada uma inspeção visual dos dados no gráfico x-y referente às respostas das áreas versus as concentrações do analito. Reportou-se o gráfico e os seguintes parâmetros de linearidade: Coeficiente de correlação (r), y-intercepto, o coeficiente angular, soma residual dos quadrados mínimos da regressão linear, o limite de detecção obtido. As curvas analíticas foram preparadas a partir de 7 níveis de concentrações dos padrões de INH, PYA, EMB e RPM, respectivamente. A linearidade da curva de calibração para a INH na faixa de concentração de 0,05 a 0,10 mg.mL⁻¹ foi observada na equação $y = 11692009x + 125632$, com $r = 0,9995$ e $R^2 = 0,9989$. Para a PYA a faixa de concentração foi de 0,27 a 0,52 mg.mL⁻¹ e a curva apresentou a equação $y = 31810254x + 4148064$, com $r = 0,9978$ e $R^2 = 0,9956$. Já o EMB a faixa de concentração foi de 0,19 a 0,36 mg.mL⁻¹

e foi observada a equação $y = 9427203x + 34120$, com $r = 0,9995$ e $R^2 = 0,9989$. A RMP a faixa de concentração foi de 0,05 a 0,1 mg.mL⁻¹ e foi observada a equação $y = 53169601x + 97065$, com $r = 0,9999$ e $R^2 = 0,9997$. O Coeficiente de correlação (r) deve ser maior ou igual a 0,99¹⁴, para os quatro fármacos o método apresentou uma resposta linear satisfatória.

A repetibilidade foi analisada contemplando a faixa linear do método em três níveis de concentração: baixa (80 %), média (100 %) e alta (120 %) da concentração teórica do fármaco no comprimido. Os resultados das repetibilidades das análises efetuadas dos quatro fármacos foram calculados através do DPR, que atestam a repetibilidade do método, e não podem ultrapassar 2,0 %¹⁴. Todo o estudo foi realizado utilizando amostras de dois fabricantes diferentes (produto 1 e produto 2). O método foi considerado preciso para os quatro fármacos com o DPR inferior a 2,0 %.

O limite de detecção foi estimado com base na relação de 3 vezes o ruído da linha de base. Construiu-se três curvas de calibração onde calculou-se a média dos resultados do coeficiente angular (a) e o desvio Padrão (DP) do coeficiente linear. Os resultados obtidos foram: 2,98E+00 para INH, 2,06E+01 para PYA, 1,17E+01 para EMB e 2,05E+00 para RMP.

O limite de quantificação foi estimado com base na relação de 10 vezes o ruído da linha de base. Construiu-se três curvas de calibração onde calculou-se a média dos resultados do coeficiente angular (a) e o DP do coeficiente linear. Os resultados obtidos foram: 8,81E+00 para INH, 6,06E+01 para PYA, 3,47E+01 para EMB e 6,12E+00 para RMP.

CONCLUSÃO

O método proposto se mostrou eficiente para a análise simultânea de INH, PYA, EMB e RMP em comprimidos 4 em 1 utilizados no tratamento da TB. A metodologia desenvolvida apresenta vantagens em relação aos métodos oficiais citados neste estudo, principalmente, em relação à análise simultânea e ao controle da estabilidade da RMP. Os sinais relativos aos quatro fármacos na análise cromatográfica podem ser visualizados a 265 nm. Caso o software utilizado permita a troca para um novo comprimento de onda na mesma análise cromatográfica, a INH, PYA e EMB podem ser visualizados em 265 nm e a RMP em 335 nm, aumentando a seletividade e a sensibilidade da RMP e correlatos. O método avaliado apresentou uma resposta linear satisfatória dentro da faixa de concentração compreendida entre 0,05 a 0,10 mg.mL⁻¹ para INH, 0,27 a 0,52 mg.mL⁻¹ para PYA, 0,19 a 0,36 mg.mL⁻¹ para EMB e 0,05 a 0,1 mg.mL⁻¹ para RMP. O método foi considerado preciso para os quatro fármacos, pois o DPR foi inferior a 2,0 %.

REFERÊNCIAS

1. Bastos D. A estrutura do *Mycobacterium tuberculosis* catalase-peroxidase e os mecanismos de ação da isoniazida: um estudo para novos ligantes [dissertação de mestrado]. Brasília (DF): Universidade de Brasília; 2006.
2. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de Controle da Tuberculose. Brasília, 2002 [acesso 2011 Dez 07]. Disponível em: [<http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/ProgramaTB.pdf>].

3. Rede TB. Rede Brasileira de Pesquisas em Tuberculose: Sobre a Tuberculose. 2012 [acesso 2012 Fev 13]. Disponível em: [<http://redetb.org/sobre-a-tuberculose>].
4. Conde MB, Souza GM, Kritski AL. Tuberculose sem medo. 1ª ed. São Paulo (SP): Atheneu; 2002.
5. Secretaria da Saúde. Divisão de Controle da Tuberculose CVE-SES/SP. Perguntas e respostas. 2010 [acesso 2012 Fev 13]. Disponível em: [<http://www.cve.saude.sp.gov.br/tuberculose>].
6. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil. Brasília, 2011 [acesso 2012 Jan 29]. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_de_recomendacoes_tb.pdf].
7. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico: O controle da Tuberculose no Brasil: avanços, inovações e desafios. Brasília, 2014 [acesso 2014 Set 13]. Disponível em: [<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/maio/29/BE-2014-45--2--tb.pdf>].
8. Lopes A C. Tratado de clínica médica. 2ª ed. São Paulo (SP): Roca; 2006.
9. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Tratamentodiretamenteobservado(TDO)datuberculose na atenção básica: protocolo de enfermagem. Brasília, 2011 [acesso 2012 Jan 29]. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_tdo_tb.pdf].
10. World Health Organization – WHO. Global tuberculosis control: epidemiology, strategy, financing. Geneva: WHO Press; 2009.
11. United States Pharmacopeial Convention. The United States Pharmacopeia 36. National Formulary 31. Rockville: US Pharmacopeial Convention, 2013.
12. The International Pharmacopoeia. 4. ed. 4st suppl. Geneva: WHO, 2011.
13. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Farmacopeia Brasileira. 5a ed. Volume 2. Brasília: ANVISA, 2010.
14. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 2 jun. 2003. Seção 1, p. 56.
15. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia – Inmetro. Orientações sobre validação de métodos analíticos: documento de caráter orientativo. Rio de Janeiro: Inmetro, 2011.
16. Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT. ISO Guia 35:2012. Materiais de referência – Princípios gerais e estatísticos para certificação. Rio de Janeiro: ABNT, 2012.
17. Farias RF. Química de coordenação: fundamentos e atualidades. Campinas (SP): Editora Átomo; 2005.
18. Likussar W, Boltz DF. Theory of continuous variations plots and a new method for spectrophotometric determination of extraction and formation constants. *Anal Chem*. 1971; 43(10):1265-72. [DOI:10.1021/ac60304a006].

Toxoplasma gondii: soroprevalência e fatores de risco em ovelhas no planalto serrano de Santa Catarina, Brasil

Toxoplasma gondii: seroprevalence and risk factors in ewes in the mountainous plateau of Santa Catarina, Brazil

RIALA6/1654

Anderson Barbosa de MOURA*, Marcio Orides da SILVA, Natascha TREVISANI, Antonio Pereira de SOUZA, Amélia Aparecida SARTOR, Rosiléia Marinho de QUADROS

*Endereço para correspondência: Departamento de Medicina Veterinária, Centro de Ciências Agroveterinárias, Universidade do Estado de Santa Catarina. Av. Luiz de Camões, 2090, Lages, SC, Brasil, CEP: 88520-000. Tel: 49 3289-9119. E-mail: anderson.moura@udesc.br

Recebido: 13.04.2015 - Aceito para publicação: 27.07.2015

RESUMO

Toxoplasma gondii pode causar problemas reprodutivos em ovinos. Com os objetivos de determinar a soroprevalência de *T. gondii* e de identificar os fatores de risco da infecção, foram coletadas 1308 amostras de sangue de ovelhas em idade reprodutiva (≥ 18 meses), em 92 propriedades de 30 municípios da mesorregião serrana de Santa Catarina-Brasil, para realizar a pesquisa de anticorpos específicos por meio de reação de imunofluorescência indireta (RIFI). Informações dos animais (manejo, frequência e tipo de transtornos reprodutivos, dieta e contato com gatos) foram obtidas por meio de questionário. Os dados foram analisados pelos testes exato de Fisher e do qui-quadrado ($p < 0,05$). Das 1308 amostras analisadas, 55,9 % (731/1308) apresentaram anticorpos IgG anti-*T. gondii*, nas diluições de 1:64 a 1:4096. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre as propriedades ou municípios avaliados, tampouco na correlação entre os resultados de sorologia e as variáveis raça e contato com gatos. Correlação positiva ($p = 0,003$) foi verificada entre a soropositividade e a dieta exclusiva de pasto nativo. Tendência ($p = 0,07$) de maior soroprevalência entre os animais com desordens reprodutivas foi observada. A infecção por *T. gondii* em ovelhas está amplamente disseminada na mesorregião serrana de Santa Catarina, o que representa risco para a saúde pública.

Palavras-chave. *Toxoplasma gondii*, ovelhas, prevalência, Santa Catarina.

ABSTRACT

Sheep are highly susceptible to *Toxoplasma gondii* infection, and it might cause reproductive problems in infected ewes. Aiming at determining the prevalence and identifying the risk factors for this infection, 1308 blood samples from ewes (≥ 18 months), in 92 properties in 30 municipalities in a mountainous environment of Santa Catarina state-Brazil, were collected for performing anti-*T. gondii* antibodies testing by indirect immunofluorescence assay (IFA). A standardized questionnaire was used to obtain information on risk factors (management, frequency and type of reproductive disorders, diet and contact with cats); these data were analyzed by Fisher exact and the chi-square tests ($p < 0.05$). IgG anti-*T. gondii* was detected in 55.9 % (731/1308) of analyzed samples, whose dilution ranged from 1:64 to 1:4096. No statistically significant differences in seroprevalence ($p > 0.05$) were observed neither between the assessed properties and municipalities, nor on the correlation between anti-*T. gondii* serology results and the variables race and contact with cats. Positive correlation ($p = 0.003$) was found between high seropositivity rate and exclusive native grasses diet. Trend ($p = 0.07$) of highest prevalence among animals with reproductive disorders was observed. *T. gondii* infection in ewes has been widespread in the mountainous region of Santa Catarina, which has represented a risk to public health.

Keywords. *Toxoplasma gondii*, ewes, prevalence, state of Santa Catarina.

INTRODUÇÃO

A toxoplasmose é uma doença de caráter zoonótico de distribuição mundial, causada pelo *Toxoplasma gondii*, protozoário capaz de parasitar animais homeotérmicos, como hospedeiros intermediários e somente os membros da Família *Felidae* (domésticos e selvagens), como hospedeiros definitivos, mas que também podem atuar como hospedeiros intermediários¹. Ocorre em animais de estimação e de produção, incluindo ovinos, caprinos, bovinos, aves, além de animais silvestres.

O agente foi descrito em 1908 por Nicolle e Manceaux, em roedores na Tunísia e, no mesmo ano, por Splendore, em São Paulo (Brasil) em coelhos. Em seguida, mais de 80 espécies animais, incluindo o ser humano foram encontradas parasitadas². É um protozoário intracelular obrigatório, pertencente ao filo Apicomplexa, classe *Sporozoa* e família *Sarcocystidae*.

O primeiro relato de toxoplasmose em ovinos foi feito por Olafson e Monlux, em 1942, nos Estados Unidos da América³. Nesta espécie animal, *T. gondii* é responsável por causar problemas reprodutivos (morte embrionária, reabsorção, mumificação fetal, aborto, natimorto e morte de recém-nascidos). Grande parte destas alterações é dependente da cepa, quantidade do inóculo e o estágio da gestação em que a transmissão transplacentária ocorre é crítico para determinar as consequências da infecção. Lesões vasculares na placenta parecem estar associadas com abortos na fase aguda da infecção⁴. A importância da transmissão transplacentária endógena em ovelhas persistentemente infectadas e seu significado clínico ainda são objetos de debates⁵.

Embora Hide et al⁶ descrevam que a transmissão vertical em ovinos tem grande importância, a principal forma de infecção nesta espécie animal ocorre pela via horizontal⁷. Após a ingestão de oocistos o protozoário se multiplica na submucosa intestinal e linfonodos e rapidamente se dissemina, através do sangue e linfa, para outros órgãos⁸. Ovinos podem apresentar diarreia, dispneia e corrimento nasal com recuperação 14 dias pós-infecção⁹.

De acordo com Millar et al¹⁰, a toxoplasmose nesses pequenos ruminantes encontra-se amplamente distribuída em todo território nacional. A infecção toxoplásmica nesta espécie é fato de grande preocupação, pois apresenta importância zoonótica¹¹ podendo ser transmitida ao ser humano por meio do consumo carne e/ou leite, bem como seus derivados sem tratamento térmico adequado.

A maioria do rebanho ovino catarinense é distribuída em pequenas propriedades com poucos animais que são utilizados para suprimento de carne e leite, demandando baixa tecnificação. Em muitos casos, há o consumo dos produtos de origem ovina na própria fazenda, de forma a propiciar a infecção por agentes patogênicos, incluindo *T. gondii*. Dessa forma, se faz importante o conhecimento da distribuição dos agentes patogênicos causadores de zoonoses para correta adoção de medidas preventivas. Assim, os objetivos do presente estudo foram determinar a prevalência de anticorpos da classe IgG contra *T. gondii* em ovelhas da mesorregião serrana de Santa Catarina e identificar possíveis fatores de risco para a infecção.

MATERIAL E MÉTODOS

No período de abril a outubro de 2014, foram colhidas 1308 amostras de sangue de ovelhas em idade reprodutiva (≥ 18 meses), em 92 propriedades de 30 municípios da mesorregião serrana do Estado de Santa Catarina, para obtenção de soro, que foi armazenado (-20 °C) até a realização da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para a detecção de anticorpos contra *T. gondii*.

A mesorregião Serrana é uma das seis mesorregiões do estado de Santa Catarina. Apresenta localização central e é formada pela união de trinta municípios agrupados em duas microrregiões (Campos de Lages e Curitibaanos). De acordo com a classificação de Koeppen, o tipo climático é predominantemente Cfb – Temperado (mesotérmico úmido e verão ameno) e Cfa – Subtropical (mesotérmico úmido, com verão quente) nos municípios de menor altitude.

A temperatura média anual varia entre 13 e 14 °C nas regiões mais frias e 17 e 18 °C nas de menor altitude, enquanto que a precipitação média anual varia entre os 1300 a 1.800 mm/ano e a umidade relativa do ar oscila entre os 76 % e 78 %.

O rebanho ovino da mesorregião serrana do Estado de Santa Catarina é composto de 73.032 animais¹². A amostragem foi constituída de 1308 animais, considerando-se uma prevalência esperada de 30 %, erro de 2,5 % e nível de confiança de 95 %¹³. A distribuição das amostras foi realizada de acordo com o tamanho dos rebanhos em cada propriedade/município e a colheita foi feita de forma aleatória dentro de cada propriedade.

A detecção de anticorpos IgG contra *T. gondii* foi realizada pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), conforme técnica descrita por Camargo¹⁴, utilizando-se como antígenos taquizoítos da cepa RH do protozoário, obtidos a partir do lavado intraperitoneal de camundongos. Foram consideradas positivas as amostras que reagiram na diluição $\geq 1:64$ ¹⁵ e estas foram tituladas por diluição sequencial, em múltiplos de quatro, até a maior diluição reagente. Incluíram-se em todas as reações realizadas, para cada lâmina, soros controles positivo e negativo para comparação.

Informações dos animais foram obtidas por meio da aplicação de questionários aos proprietários no dia da colheita de sangue e foram relacionadas ao manejo, frequência e tipo de transtornos reprodutivos nos últimos 12 meses, dieta e contato com gatos.

Os dados foram tabulados e analisados estatisticamente pelo teste exato de Fisher¹⁶ e pelo teste de qui-quadrado ($p < 0,05$) para correlacionar os resultados com os fatores de risco analisados e/ou desordens reprodutivas.

Este estudo foi conduzido dentro dos padrões exigidos 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^{os} 12, 13 e 14.

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) do CAV/UEDESC Protocolo 1.35/09,

em 29 de Setembro de 2009.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 1308 amostras de soro analisadas, 55,9 % (731/1308) apresentaram anticorpos IgG contra *T. gondii*. As amostras positivas apresentaram títulos de anticorpos de 1:64 (327; 44,7 %); 1:256 (289; 39,5 %); 1:1024 (95; 13 %) e 1:4096 (20; 2,8 %). Com exceção de uma propriedade, todas apresentaram no mínimo um animal positivo e em todos os 30 municípios avaliados foram identificados animais reagentes.

O uso da sorologia para a demonstração de anticorpos contra *T. gondii* apresenta grande valor, uma vez que existem limitações para a realização dos diagnósticos parasitológico, molecular e/ou clínico¹⁷. A adoção da diluição de 1:64 como ponto de corte foi empregada considerando-se diminuir a ocorrência de reações cruzadas com outros coccídeos.

No Brasil, a prevalência da toxoplasmose ovina varia de 18,59 %¹⁸ a 61 %¹⁹. Esses resultados discrepantes podem ser decorrentes da técnica e/ou ponto de corte empregados, da amostragem (número, idade e/ou categoria dos animais, manejo) assim como da região geográfica de origem dos animais avaliados. No presente estudo, foram avaliadas somente ovelhas em idade reprodutiva (≥ 18 meses idade).

Altos títulos de anticorpos contra *T. gondii*, associados com abortos e natimortos em ovinos já foram descritos²⁰. Em um rebanho ovino no Egito, em que 35,6 % das ovelhas apresentaram abortos, a sorologia de todos os animais que abortaram foi positiva para *T. gondii*²¹.

Na Grécia, de 289 ovelhas, criadas em sistema semi-intensivo (com menor possibilidade de contato com gatos jovens) e com histórico de aborto, 144 (49,8 %) foram positivas para *T. gondii*²². No Brasil, Gabardo et al²³ descreveram um surto de aborto em ovelhas devido ao *T. gondii*. Esses dados fazem pressupor que a sorologia para *T. gondii* em ovelhas é importante ferramenta diagnóstica e que abortos em ovelhas devem ser investigados levando-se em consideração *T. gondii*.

A análise dos fatores de risco não identificou diferenças estaticamente significativas entre as 92 propriedades ou entre os 30 municípios avaliados. Não foi observada ($p > 0,05$) correlação entre sorologia positiva para *T. gondii* e as variáveis raça e contato com gatos (Tabela 1).

Correlação fortemente positiva ($p = 0,003$) foi observada entre os animais soropositivos e a dieta exclusiva de pasto nativo (Tabela 1), sugerindo que a contaminação dos pastos com formas infectantes (oocistos) tem papel importante na disseminação da enfermidade entre os animais avaliados. Dentre as ovelhas soropositivas, 83,2 % são mantidas unicamente em pastagens, sem fornecimento de qualquer suplementação e, dentre estas, a positividade foi de 57,9 % contra 47,7 % dos animais que recebiam algum tipo de concentrado. Em um surto de toxoplasmose ovina na Itália, Zedda et al⁷ verificaram, por meio da técnica de PCR, que a pastagem, assim como a ração, estavam contaminadas com o agente. Katzer et al²⁴ relataram que a contaminação ambiental por oocistos de *T. gondii* pode ser significativa. Rizo et al²⁵ também descreveram que o uso exclusivo de pastagem aumenta o risco de infecção dos animais.

Ainda que 72,5 % das ovelhas soropositivas não tenham apresentado desordens reprodutivas,

a análise estatística (teste exato de Fischer) revelou tendência ($p = 0,07$) de alta soroprevalência entre os animais que apresentaram abortos, retorno ao cio e/ou natimortos. Entre as ovelhas com problemas reprodutivos, 52,2 % foram soropositivas para *T. gondii*.

Embora a sorologia isolada não possa ser utilizada como método diagnóstico definitivo, os resultados de levantamentos de prevalência da infecção são relevantes, pois mesmo em um estudo, cujo resultado revelou uma baixa prevalência (3,1 % - ELISA) de anticorpos IgG contra *T. gondii*, a infecção toxoplásmica em ovinos pode ser parcialmente responsável por abortos e perdas econômicas nesta espécie²⁶.

A infecção primária nem sempre gera imunidade protetiva contra a infecção fetal e/ou abortos nas gestações subsequentes²⁷ e, embora fetos ovinos apresentem capacidade para desenvolver uma resposta imune ao redor de 60 dias de gestação, esta não é suficiente para conferir proteção até o último mês antes do nascimento²⁸, ressaltando assim a importância de estudos de soroprevalência da toxoplasmose em ovinos.

Também, ovelhas soropositivas podem transmitir *T. gondii* para sua prole, via infecção transplacentária. Estudos recentes mostram que a transmissão congênita de *T. gondii* em ovinos pode ser mais comum do que se pensava^{29,30}.

Tabela 1. Prevalência de anticorpos contra *Toxoplasma gondii* (RIFI ≥ 50) em ovelhas no planalto serrano de Santa Catarina, Brasil. Por variável analisada e total. Lages, SC, 2015

Variável / Categoria		Animais		Positivos ¹		Positivos ²		p
		n	%	n	%	n	%	
Raça	Mestiça	974	74,5	552	56,7	552	75,5	0.3386
	Definida	334	25,5	179	53,6	179	24,5	
Dieta	Pastagem	1050	80,3	608	57,9	608	83,2	0.003286
	Suplementação	258	19,7	123	47,7	123	16,8	
Problemas Reprodutivos	Sim	381	29,1	199	52,2	199	27,2	0.0748
	Não	917	70,1	530	57,8	530	72,5	
	Não informado	10	0,8	2	20,0	2	0,3	
Contato com gatos	Sim	999	76,4	554	55,5	554	75,8	0.3533
	Não	299	22,8	175	58,5	175	23,9	
	Não informado	10	0,8	2	20,0	2	0,3	
Total		1308	100,0	731	-	731	100,0	

¹ Relação entre o total de animais positivos de uma categoria e o total de animais da categoria; ² Relação entre o total de animais positivos de uma categoria e o total de animais positivos; p: Nível descritivo no Teste exato de Fischer

Em cordeiros, congenitamente infectados, a toxoplasmose pode cursar com sinais neurológicos severos e morte³¹.

Além dos sinais clínicos, que podem resultar em perdas para os proprietários, ovinos infectados com *T. gondii* representam importante fonte de infecção para o ser humano, por meio da ingestão de carne crua ou mal cozida com cistos teciduais do parasito e também de leite e derivados lácteos consumidos crus, sem fervura ou pasteurização, uma vez que o agente pode estar presente no leite de ovelha infectadas³². Yldz et al³³, Boughattas et al³⁴ e Gebremedhin et al³⁵ observaram correlação entre sorologia para *T. gondii* e a presença de cistos teciduais em ovinos naturalmente infectados. Esses autores detectaram cistos teciduais de *T. gondii* em aproximadamente 50 % dos ovinos soropositivos.

CONCLUSÃO

Os resultados demonstram que a infecção por *T. gondii* em ovelhas é amplamente disseminada na mesorregião serrana de Santa Catarina e que a manutenção de animais exclusivamente a pasto é um fator de risco para a toxoplasmose ovina que, além de causar prejuízos econômicos, também pode contribuir para a infecção do ser humano, representando risco para a saúde pública.

REFERÊNCIAS

1. Martins CS, Viana JA. Toxoplasmose – o que todo profissional de saúde deve saber. *Clin Vet*.1998;3(15):33-7.
2. Dubey JP. *Toxoplasma, Neospora, Sarcocystis* and other tissue cyst-forming of human and animals. *In*: Kreier JP. Parasitic protozoa. 2ª ed. San Diego: Academic Press; 1993. p.1-157.
3. Fialho CG, Teixeira MC, Araújo FAP. Toxoplasmose animal no Brasil. *Acta Sci Vet*. 2009;37(1):1-23.
4. Castaño P, Fuertes M, Ferre I, Fernandez M, Ferreras MC, Moreno-Gonzalo J, et al. Placental thrombosis in acute phase abortions during experimental *Toxoplasma gondii* infection in sheep. *Vet Res*.2014;45(1):9. [DOI: 10.1186/1297-9716-45-9].
5. Innes EA, Bartley PM, Buxton D, Katzer F. Ovine toxoplasmosis. *Parasitology*.2009;136(14):1887-94. [DOI: 10.1017/S0031182009991636].
6. Hide G, Morley EK, Hughes JM, Gerwash O, Elmahaishi MS, Elmahaishi KH, et al. Evidence for high levels of vertical transmission in *Toxoplasma gondii*. *Parasitology*.2009;136(14):1877-85. [DOI: 10.1017/S0031182009990941].
7. Zedda MT, Rolesu S, Pau S, Rosati I, Ledda S, Satta G, et al. Epidemiological study of *Toxoplasma gondii* infection in ovine breeding. *Zoonoses Public Health*.2010;57(7-8):e102-8. [DOI: 10.1111/j.1863-2378.2009.01292.x].
8. Winter A, Clarkson M. The pregnant ewe. *In*: Winter A, Clarkson M. A handbook for the sheep clinician. 7 ed. Oxfordshire: CAB International.2012:35-47. [DOI: 10.1079/9781845939731.0000].
9. Dubey JP. Toxoplasmosis of animals and humans. 2ª ed. Maryland: Boca Raton; 2010.
10. Millar PR, Sobreiro LG, Bonna ICF, Amendoeira MRR. A importância dos animais de produção na infecção por *Toxoplasma gondii* no Brasil. *Semina: Cienc Agr*.2008;29(3):693-706. [DOI: 10.5433/1679-0359.2008v29n3p693].
11. Khater HF, Khalifa NO, Barakat AMA. Serological and molecular studies of ovine and human toxoplasmosis with a trial of treatment of infected ewe. *Sci J Vet Adv*.2013;2(11):157-68. [DOI: 10.14196/sjvs.v2i11.1080].
12. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. Censo Agropecuário 2013 [acesso 2014 Mar 04]. Disponível em: [http://sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/protabl.asp?c=3939&z=t&o=24&i=P>].
13. Organización Panamericana de la Salud– OPAS. Bioestadística: procedimientos para estudios de prevalencia por muestreo. Buenos Aires: Organización Panamericana de La Salud.1979.
14. Camargo ME. Introdução as técnicas de imunofluorescência. *Rev Bras Patol Clin*. 1974;10(3):87-107.

15. Silva JG, Alves BHLS, Melo RPB, Kim PCP, Souza Neto OL, Bezerra MJG, et al. Occurrence of anti-*Toxoplasma gondii* antibodies and parasite DNA in raw milk of sheep and goats of local breeds reared in Northeastern Brazil. *Acta Trop*.2015;142:145-8. [DOI: 10.1016/j.actatropica.2014.11.011].
16. R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing. Disponível em: [http://www.R-project.org. 2009].
17. Langoni H, Camossi L, Greca H, Correa A, Silva R. Humoral response of ewes naturally infected with *Toxoplasma gondii* in Brazil. XIV International Congress of the International Society for Animal Hygiene (ISAH). Sustainable animal husbandry: prevention is better than cure, Volume 2; July 2009, Vechta: Proceedings. p. 789-91.
18. Silva R, Ullmann L, Guimaraes F, Greca H, Gaio F, Rosa E, et al. Occurrence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in sheep from Sao Paulo State, Brazil. XIV International Congress of the International Society for Animal Hygiene (ISAH). Sustainable animal husbandry: prevention is better than cure, Volume 2; July 2009, Vechta: Proceedings. p. 793-6.
19. Rossi GF, Cabral DD, Ribeiro DP, Pajuaba ACAM, Corrêa RR, Moreira R.Q et al. Evaluation of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infections in sheep from Uberlândia, Minas Gerais State, Brazil, by different serological methods. *Vet Parasitol*. 2011;175(3-4):252-9. [DOI: 10.1016/j.vetpar.2010.10.017].
20. Hussein MF, Almufarrej SI, Aljumaah RS, Al-Saiady MY, Elnabi AGAR, Abu TSZ. Serological prevalence of *Toxoplasma gondii* and its association with abortion in sheep in Saudi Arabia *Acta Vet*.2011;61(4):405-14. [DOI: 10.2298/AVB1104405H].
21. Ahmed YF, Sokkar SM, Desouky HM, Soror AH. Abortion due to toxoplasmosis in small ruminants. *Glob Vet*.2008;2(6):337-42. [DOI: 10.1007/s11250-011-9885-2].
22. Bisias G, Burriel AR, Boutsini S, Kritas SK, Leontides LS. A serological investigation of some abortion causes among small ruminant flocks in Greece. *J Vet Med*.2009;8(2):unpaginated. [DOI: 10.1016/j.rvsc.2012.07.020].
23. Gabardo MP, Oliveira JSV, Ecco R, Guedes RMC. Outbreak of ovine abortion by toxoplasmosis in southeastern Brazil. *Braz J Vet Pathol*.2013;6(1):37-41. [DOI: 10.1590/S0100-736X2011001100001].
24. Katzer F, Brulisauer F, Collantes-Fernandez E, Bartley PM, Burrells A, Gunn G, et al. Increased *Toxoplasma gondii* positivity relative to age in 125 Scottish sheep flocks; evidence of frequent acquired infection. *Vet Res*.2011;42:121. [DOI: 10.1186/1297-9716-42-121].
25. Rizzo H, Gregory L, Beraldi F, Villalobos E. Análise de fator de risco e avaliação clínica de ovinos com histórico de distúrbios reprodutivos pertencentes a criatórios do Estado de São Paulo, infectados por *Neospora caninum* e *Toxoplasma gondii*. *Vet Zoo*.2011;18(4):908-11.
26. Heidari H, Gharekhani J, Tavoosidana G. Role of toxoplasmosis in abortion of ewes in western Iran: a serological study. *Sci Parasitol*.2013;14(2):99-103. [DOI: 10.3923/ajas.2012].
27. Morley EK, Williams RH, Hughes JM, Thomasson D, Terry RS, Duncanson P, et al. Evidence that primary infection of Charollais sheep with *Toxoplasma gondii* may not prevent foetal infection and abortion in subsequent lambings. *Parasitol*.2008;135(2):169-73. [DOI: 10.1017/S0031182007003721].
28. Buxton D, Finlayson J. Experimental infection of pregnant sheep with *Toxoplasma gondii*: pathological and immunological observations on the placenta and foetus. *J Comp Pathol*.1986;96(3):319-33. [DOI: 10.1016/0021-9975(86)90052-6].
29. Edwards JF, Dubey JP. *Toxoplasma gondii* abortion storm in sheep on a Texas farm and isolation of mouse virulent atypical genotype *T. gondii* from an aborted lamb from a chronically infected ewe. *Vet Parasitol*.2013;192(1-3):129-36. [DOI: 10.1016/j.vetpar.2012.09.037].
30. Lopes WDZ, Rodriguez JD, Souza FA, Santos TR, Santos RS, Rosanese WM et al. Sexual transmission of *Toxoplasma gondii* in sheep. *Vet Parasitol*.2013;195(1-2):47-56. [DOI: 10.1016/j.vetpar.2012.12.056].
31. Atmaca HT, Ocal N, Babur C, Kul O. Reactivated and clinical *Toxoplasma gondii* infection in young lambs: clinical, serological and pathological evidences. *Small Rumin Res*.2012;105(1-3):335-40. [DOI: 10.1016/j.smallrumres.2012.02.009].

32. Camossi LG, Greca-Júnior H, Corrêa AP, Richini-Pereira VB, Silva RC, Da Silva AV et al. Detection of *Toxoplasma gondii* DNA in the milk of naturally infected ewes. *Vet Parasitol*.2011;177(3-4):256-61. [DOI: 10.1016/j.vetpar.2010.12.007].

33. Yldz K, Kul O, Gokpnr S, Atmaca HT, Gencay YE, Gazyagc A, et al. The relationship between seropositivity and tissue cysts in sheep naturally infected with *Toxoplasma gondii*. *Turk J Vet Anim Sci*.2014;38(2):169-75. [DOI: 10.3906/vet-1308-49].

34. Boughattas S, Ayari K, Sa T, Aoun K, Bouratbine A. Survey of the parasite *Toxoplasma gondii* in human consumed ovine meat in Tunis City. *PLoS One*.2014;9(1):e85044. [DOI: 10.1371/journal.pone.0085044].

35. Gebremedhin EZ, Abdurahaman M, Tessema TS, Tilahun G, Cox E, Goddeeris B et al. Isolation and genotyping of viable *Toxoplasma gondii* from sheep and goats in Ethiopia destined for human consumption. *Parasit Vectors*.2014;7:425. [DOI: 10.1186/1756-3305-7-425].

Perfil sanitário e características físico-químicas da carne ovina comercializada *in natura*

The sanitary profile and the physico-chemical characteristics of lamb meat sold *in natura*

RIALA6/1655

Maria Carla da Silva CAMPÊLO^{1*}, Jovilma Maria Soares de MEDEIROS¹, Márcia Marcila Fernandes PINTO², Ana Paula Pinheiro de ASSIS³, Jean Berg Alves da SILVA¹, Patrícia de Oliveira LIMA³

*Endereço para correspondência: ¹Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal, Departamento de Ciências Animais, Universidade Federal Rural do Semi-Árido. Av. Francisco Mota, 572, Bairro Costa e Silva, Mossoró, RN, Brasil, CEP: 59.625-900. Tel: 84 3317-8200 / 99900-3606. E-mail: carlacampelo2@hotmail.com.

²Laboratório de Nutrição Animal, Departamento de Ciências Animais, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, RN

³Laboratório de Análises Instrumentais e Sensoriais, Departamento de Ciências Animais, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, RN

Recebido: 26.06.2015 - Aceito para publicação: 10.09.2015

RESUMO

Este estudo avaliou as características físico-químicas e a qualidade sanitária da carne ovina comercializada em supermercados e mercados públicos no semiárido potiguar. Foram adquiridas amostras de carne ovina em supermercados locais e em boxes de mercados públicos da região citada. Nos pontos de comercialização, foi aplicado um checklist referente às condições higiênico-sanitárias do ambiente, equipamentos e manipuladores. As amostras foram avaliadas quanto à presença de coliformes a 35 °C e a 45 °C, enterobactérias, *Staphylococcus* spp. e *Salmonella* sp., além dos parâmetros físico-químicos de pH, cor, perda de peso por cocção, capacidade de retenção de água e força de cisalhamento. Os mercados públicos analisados apresentaram 93,34 % de não conformidade na aplicação do *checklist*. Quanto aos aspectos microbiológicos, 5 % das amostras apresentaram-se impróprias para o consumo, com contaminação por *Salmonella* sp. Os resultados encontrados nas análises físico-químicas estavam dentro dos padrões estabelecidos para carne ovina. Não houve diferença significativa entre os espécimes dos dois grupos avaliados, exceto para o parâmetro a* da análise de cor nas amostras de mercado público que apresentaram maior teor de vermelho em relação às amostras de supermercados. Portanto, apesar de apresentarem características físico-químicas satisfatórias, esses produtos são vendidos em condições higiênico-sanitárias precárias, que podem representar risco ao consumidor.

Palavras-chave. carne de ovinos, caracterização físico-química, higiene, qualidade.

ABSTRACT

This study evaluated the sanitary and the physicochemical qualities of lamb meat sold in supermarkets and public markets in the semiarid Rio Grande do Norte. Ten samples of lamb meat were obtained in the local supermarkets and ten specimens in the public market food-stalls. These sale points were evaluated by using a checklist concerning the hygiene and sanitary conditions of environment, equipment and handlers. The collected samples were analyzed for detecting coliforms at 35 °C and 45 °C, enterobacteria, *Staphylococcus* and *Salmonella* spp., and the physicochemical parameters (pH, color, weight loss by cooking, water retention capacity and shear strength) were assessed. The food-stalls of public market showed 93.34 % of non-compliance to the checklist items. Concerning the microbiological aspects, 5 % of the samples were unsuitable for consumption, being contaminated with *Salmonella* spp. The results found in the physicochemical analyzes complied with the standards established for lamb meat. No significant difference among the samples of the both groups was found, except for the a* color parameter in specimens from the public market food-stalls, which showed a higher red color contents. Despite evidencing satisfactory physicochemical characteristics, these products are sold under poor sanitary conditions, which might pose a risk to the consumer.

Keywords. meat of lamb, physicochemical characterization, hygiene, quality.

INTRODUÇÃO

A carne ovina é uma fonte de proteína semelhante às outras espécies. Embora seja menos apreciada quando comparada com a carne bovina, nos últimos anos, esta deixou de ser um produto consumido exclusivamente no meio rural do Sul e do Nordeste do Brasil, conquistando adeptos nos grandes centros urbanos brasileiros¹.

A qualidade da carne nas diferentes espécies baseia-se na interação de vários fatores como sabor, suculência, textura, cor, maciez e aparência que estão diretamente relacionados com o manejo, produção e forma de abate do animal. Todos estes fatores influenciam na aceitação do produto pelo consumidor final².

O estudo e o conhecimento dos parâmetros de qualidade são imprescindíveis para garantir a satisfação do consumidor e os resultados econômicos esperados pelos produtores³. Entre esses parâmetros de qualidade pode-se citar pH, cor, textura, perda de peso por cocção, capacidade de retenção de água, força de cisalhamento.

A qualidade das carnes pode sofrer influência também das condições higiênico-sanitárias em que o alimento é produzido, manipulado e comercializado, interferindo diretamente na qualidade microbiológica, e conseqüentemente, levando riscos à saúde do consumidor, além de reduzir o prazo de validade comercial do alimento^{4,5}.

Diante disso, vê-se a necessidade de se avaliar a qualidade físico-química e higiênico-sanitária das carnes ovinas comercializadas nos diversos tipos de estabelecimentos, verificando conformidades e não conformidades entre os ambientes de venda e a legislação vigente.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas 20 amostras de carne ovina, sendo 10 provenientes de supermercados e 10 de mercados públicos da cidade de Mossoró, Rio Grande do Norte. Após a obtenção das amostras, estas foram levadas acondicionadas, sob refrigeração para o

Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal e Laboratório de Análises Instrumentais e Sensoriais, onde procedeu-se as análises microbiológicas e físico-químicas, respectivamente. Além da obtenção das amostras, em cada local de coleta foi aplicado um *check-list* baseado no Regulamento Técnico de Boas Práticas para Serviços de Alimentação⁶, em que foram avaliadas as condições higiênico-sanitárias do ambiente de comercialização, dos equipamentos utilizados na manipulação dos alimentos bem como os manipuladores, sendo atribuídos três tipos de *status* a cada item avaliado: conforme, não conforme ou item não avaliado.

Para as análises microbiológicas, as amostras foram pesadas (25 g) de forma asséptica e transferidas para sacos plásticos estéreis, onde foram acrescidos 225 mL de água peptonada tamponada estéril com posterior homogeneização em “Stomacher” durante 2 minutos, obtendo-se assim a diluição 10^{-1} , a partir da qual foram realizadas diluições decimais até 10^{-5} . Após as diluições, as amostras foram submetidas às técnicas para determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes a 35 e 45 °C, contagem de enterobactérias e *Staphylococcus* spp., e pesquisa da presença de *Salmonella* sp. utilizando a metodologia descrita na Instrução Normativa nº 62/2003⁷.

O pH das amostras foi determinado de acordo com a metodologia estabelecida pela AOAC⁸, em pHmetro digital HANNA® modelo HI 99163, acoplado a um eletrodo de penetração, sendo o pH mensurado diretamente no músculo.

A cor foi avaliada em colorímetro Konica Minolta, CM-700d/600d (Sistema CIE $L^*a^*b^*$), cujo sistema considera as coordenadas L^* luminosidade (preto/branco), a^* teor de vermelho (verde/vermelho) e b^* teor de amarelo (azul/amarelo).

A determinação da capacidade de retenção de água (CRA) foi baseada na medição de perda de água liberada quando aplicada uma pressão sobre o tecido muscular. Através da diferença dos pesos (inicial – final) foi determinada a capacidade de retenção de água, expressa em porcentagem de peso perdido da amostra inicial⁹.

A força de cisalhamento foi medida em Texture Analyzer TA-XT-125 acoplado ao dispositivo Warner-Bratzler, o qual expressa a força em kgf/cm². Foram utilizadas as mesmas amostras da determinação de perda de peso por cocção, das quais foram retiradas amostras de 1,0 cm de diâmetro por meio de um vazador⁹.

Para a análise de perda de peso por cocção (PPC), as amostras de carne foram pesadas e envolvidas em folhas de alumínio. Em seguida, foram transferidas para um *grill*, onde permaneceram até a temperatura interna do músculo atingir 71 a 75 °C. Posteriormente, as amostras foram retiradas do *grill* e pesadas novamente para o cálculo da percentagem de perda de água durante o processo térmico¹⁰.

Para a análise da diferença significativa encontrada nos resultados obtidos nas carnes ovinas de mercados públicos e supermercados, os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) com $p \leq 0,05$, aplicando, em seguida, o teste de Fisher; todos os testes realizados no programa estatístico *Graphpad Prism 6.0* (versão free).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As porcentagens de conformidades encontradas para cada item do *check list* estão apresentadas na Figura 1.

As amostras obtidas em supermercados, em sua maioria, encontravam-se dispostas em bandejas de isopor, cobertas por filme de policloreto de polivinila (PVC) e sob refrigeração, enquanto que as carnes oriundas de mercado público estavam penduradas em ganchos metálicos, sem refrigeração.

A partir da análise das porcentagens de conformidades observadas com a aplicação do *check list* pode-se inferir que, entre os supermercados e mercados públicos visitados, os primeiros obtiveram porcentagens de conformidade iguais ou superiores para todos os itens avaliados, demonstrando melhores condições higiênico-sanitárias para a comercialização de alimentos, apesar de não apresentarem total conformidade em todos os itens.

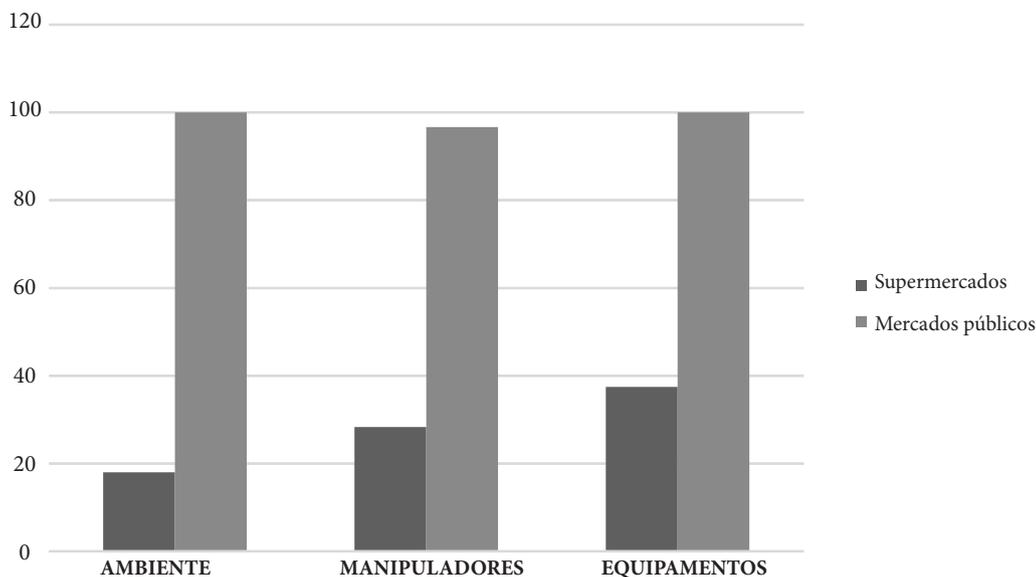


Figura 1. Avaliação das condições higiênico-sanitárias dos supermercados e mercados públicos de Mossoró-RN

Nos supermercados visitados, as conformidades mais observadas foram relacionadas à utilização de equipamentos de proteção individual (EPI) corretos, a manutenção de unhas aparadas e limpas. Em todos os boxes dos mercados públicos visitados foram observados hábitos comportamentais e higiênicos inadequados, incluindo a falta de uniforme, claro e limpo, o uso de adornos como relógios, pulseiras, anéis e bonés. Além disso, os maus hábitos de falar, tossir ou cantar durante a comercialização da carne e a falta de manutenção das unhas curtas e limpas também foram observados na maioria dos boxes. E de forma mais evidente foi notada a falta de higiene nos locais e a presença constante de animais.

As ações descritas acima podem comprometer a segurança dos alimentos e dos manipuladores, uma vez que se sabe que comportamentos inadequados dos manipuladores podem proporcionar a contaminação dos alimentos por micro-organismos. Diante disso, ressaltam-se a importância da educação sanitária e do treinamento dos manipuladores como ferramentas para garantir a qualidade dos alimentos e a saúde do consumidor¹¹.

Observa-se assim a inexistência de padronização dos procedimentos de higiene nos estabelecimentos que comercializam alimentos, principalmente os mercados públicos, e nessa perspectiva ainda acrescenta-se que, na visão dos comerciantes de carne, essa falta de padronização pode ser atribuída à ausência

de regulamentos específicos e de capacitação profissional, além da desmotivação pelo trabalho nos boxes que os impede de exercer melhor suas funções¹².

A Tabela 1 apresenta os resultados das análises microbiológicas realizadas nas amostras adquiridas nos supermercados e mercados públicos da cidade de Mossoró/RN.

Foi verificada a presença de coliformes totais em 100 % das amostras avaliadas, com contagem média de 5,0 LogNMP/g e 5,4 LogNMP/g, para supermercados e mercados públicos, respectivamente. Resultados semelhantes foram relatados por Fernandes et al⁵ que, ao analisarem carnes ovinas comercializadas em mercados públicos do Recife, encontraram coliformes totais em 100 % das amostras analisadas, indicando que as condições higiênico-sanitárias desses produtos estavam insatisfatórias.

Em relação aos coliformes termotolerantes, os resultados foram semelhantes aos encontrados por Fernandes et al⁵ e superiores aos encontrados por Vasconcelos et al¹³ que, ao analisarem cortes de carne ovina provenientes do estado do Ceará, encontraram 60 % das amostras contaminadas com coliformes termotolerantes.

Coliformes totais e termotolerantes são veiculados por alimentos de origem animal e estão constantemente envolvidos em surtos de toxinfecção alimentar, por isso a necessidade da manipulação e comercialização correta desses alimentos, garantindo a segurança ao consumidor¹¹.

Tabela 1. Análises microbiológicas de carne ovina comercializada em supermercados e mercados públicos de Mossoró-RN

Local	Coliformes totais (LogNMP/g)	Coliformes termotolerantes (LogNMP/g)	Enterobactérias (LogUFC/g)	<i>Staphylococcus</i> spp. (LogUFC/g)	<i>Salmonella</i> sp.
Supermercado	4,96 ± 0,94	4,598 ± 0,875	5,662 ± 1,170	5,963 ± 1,101	Presente (1/10)
Mercado público	5,41 ± 1,11	4,496 ± 0,907	6,573 ± 0,983	7,049 ± 0,565	Ausente

Algumas enterobactérias são patogênicas ao homem, oferecendo risco para a saúde pública, dentre elas, a *Salmonella* sp. é a mais importante. Nas amostras de carne ovina analisadas, apenas em uma amostra (5 %), identificada como amostra 6 e adquirida em um supermercado, evidenciou a presença de *Salmonella* sp., demonstrando que esse produto estava impróprio para consumo, de acordo com a Resolução nº 12/2001¹⁴, que determina a ausência de *Salmonella* sp. em 25 g de carne *in natura*. A contaminação por essa bactéria pode acontecer através de contaminações cruzadas durante o manuseio e preparação dos alimentos¹⁵.

Resultados superiores foram encontrados em carnes caprinas comercializadas nos mercados de Recife/PE, em que 29,2 % estavam contaminadas por *Salmonella* sp.¹⁶. Da mesma forma, encontrou-se positividade de *Salmonella* sp. em 8,5 % das amostras de carne bovina comercializadas em feiras livres da cidade de Alexandria/RN, mostrando a inadequação dessas carnes para o consumo¹⁷.

Quanto à contagem de *Staphylococcus* spp., todas as amostras de supermercados e mercados públicos analisadas apresentaram crescimento, com médias de 6,0 LogUFC/g e 7,0 LogUFC/g, respectivamente, sendo as maiores contagens observadas nas amostras oriundas dos mercados públicos. Observação semelhante foi relatada por Silvestre et al¹⁷ que encontraram contagens mais elevadas de *Staphylococcus* spp. em carnes

bovinas comercializadas em feiras livres, quando comparadas as carnes comercializadas em supermercados. A elevada contaminação por *Staphylococcus* spp. em carne ovina também foi relatada quando observou-se contagens superiores a 61,4 % do micro-organismo nas amostras analisadas⁵.

Os manipuladores são a fonte mais frequente de contaminação, embora os equipamentos e superfícies do ambiente também possam contaminar os alimentos. Isso justifica as maiores contagens de *Staphylococcus* spp. nas amostras provenientes dos boxes de mercados públicos, pelas piores condições higiênicas de manipulação como observado na aplicação do *check list*¹⁸. O maior agravante para contaminação da carne ovina comercializada nos mercados públicos analisados é o modo como esse alimento é exposto, pois em sua maioria encontravam-se pendurados em ganchos metálicos ou sobrepostos em bancadas, sem nenhuma proteção, refrigeração e totalmente sujeito a contaminação física, química e de manipulação pelos consumidores e pelo próprio comerciante.

Nas Tabelas 2 e 3, estão dispostos os resultados das análises físico-químicas das carnes ovinas analisadas.

As carnes de supermercados estiveram dentro da variação de pH ideal para carnes considerada normal. Entretanto, as carnes obtidas de mercados públicos apresentaram

Tabela 2. Caracterização físico-química de carne ovina comercializada em supermercados e mercados públicos de Mossoró-RN

Análises Físicas	Carne ovina		CV (%)
	Mercado público	Supermercado	
pH	6,07	5,83	7,12
CRA (%)	68,55	71,26	21,37
PPC (%)	35,79	38,63	33,97
FC (Kgf/cm ²)	5,51	3,78	42,23

CRA: capacidade de retenção de água; PPC: perda de peso por cocção; FC: força de cisalhamento; CV: coeficiente de variação

médias que as classificaram como carnes DFD (*dark, firm, dry*) – ou seja, escuras, duras e secas – e, portanto, mais expostas à deterioração microbiana e oxidativa e, conseqüentemente, com menor prazo de validade comercial¹⁹. Estudos relatam que, durante a conversão do músculo em carne, se o pH permanecer acima de 6, esta carne torna-se uma DFD; entretanto, quando o valor de pH reduz drasticamente durante a primeira hora após o abate, as carnes podem ser caracterizadas como PSE (*pale, soft, exudative*) – pálidas, moles e exudativas³.

Silva Sobrinho et al²⁰ sugerem que o valor do pH final da carne ovina pode variar entre 5,5 e 5,8. Porém valores de pH \geq 6,0 podem estar relacionados a depleção dos depósitos de glicogênio muscular antes do abate, levando a formação de carnes tipo DFD ou carnes escuras, firmes e secas.

O pH é um parâmetro de grande importância na qualidade final da carne, podendo sofrer influência de vários fatores como idade ao abate, raça, estresse pré-abate, tempo e forma de armazenamento. Estes fatores podem influenciar outros parâmetros importantes para a qualidade final das carnes, como por exemplo, capacidade de retenção de água (CRA), perda de peso por cocção (PPC) e força de cisalhamento (FC)²¹.

Quando avaliado a CRA nas amostras de carne ovina, não foi observada diferença estatística significativa entre os grupos, tendo sido verificados valores de 71,26 e 68,55 nas amostras de supermercados e mercados públicos, respectivamente. A capacidade de retenção de água é um parâmetro qualitativo que indica a sensação de suculência no momento da mastigação, sendo um fator de relevante importância para o consumidor^{2,21}.

Os valores de FC encontrados demonstram que as amostras avaliadas de carne ovina, tanto de supermercados quanto de mercados públicos, apesar da diferença estatística encontrada, estavam consideradas macias, com valores abaixo de 8 Kg-f/cm². A carne que apresenta uma força de cisalhamento acima de 11 Kg-f/cm² é classificada como dura, entre 8 e 11 Kg-f/cm² como aceitável e abaixo

de 8 Kg-f/cm² como macia³. Dentre os atributos que se relacionam com a aceitação da carne, podemos destacar a concentração de ácidos graxos e alguns parâmetros físicos como pH, cor, perda de peso na cocção, capacidade de retenção de água e força de cisalhamento, e entre os fatores que afetam diretamente a maciez da carne, destacam-se dieta, genótipo, idade e peso de abate, condições de abate e armazenamento da carne²².

A força de cisalhamento, além de outros parâmetros, pode ser influenciada pelo pH. Valores de pH menores que 5,5, possibilitam uma maior perda de peso na cocção, interferindo diretamente no rendimento do produto. Nesta faixa de pH, a carne torna-se mais firme, e conseqüentemente com valores de força de cisalhamento mais elevados²³.

A análise de perda de peso por cocção está relacionada à qualidade da carne, associando-se ao rendimento da carne no momento do consumo, sendo diretamente influenciada pela capacidade de retenção de água na estrutura da carne³. Nas análises de perda de peso por cocção não foi observada diferença significativa entre as amostras de mercado público e supermercado, demonstrando que independente da forma de armazenamento e comercialização, as carnes ovinas de supermercados e mercados públicos obtiveram resultados semelhantes de perda de peso por cocção. Entretanto, os elevados valores encontrados podem estar relacionados à alimentação dos animais, além da associação com a capacidade de retenção de água, uma vez que, quanto menor a capacidade de retenção de água maior a perda de peso por cocção, o que foi observado no experimento em questão.

A capacidade de retenção de água, perda de peso por cocção e força de cisalhamento estão relacionados devido à quantidade de água presente na carne, uma vez que a quantidade de água presente na amostra determina a suculência e maciez do produto, estando diretamente relacionados com a aceitação, preferência e satisfação do consumidor²⁴.

A avaliação dos resultados da análise de cor das amostras de carne ovina obtidas de

Tabela 3. Análise de cor de carne ovina comercializada em supermercados e mercados públicos de Mossoró-RN

Local	COR		
	L*	a*	b*
Mercado público	34,47	8,52	9,21
Supermercado	32,86	5,91	8,13
CV (%)	21,96	28,69	26,37

CV: coeficiente de variação

supermercados e mercados públicos da cidade de Mossoró/RN evidenciou diferença significativa entre os valores obtidos para o teor de vermelho (a*) das carnes adquiridas em supermercado (5,91) e mercados públicos (8,52). A cor vermelha com maior intensidade nas carnes de mercados públicos, em comparação às de supermercados, pode estar relacionada com o fato das carnes terem sido levadas para comercialização nos mercados públicos logo após o abate do animal, antes que a etapa de *rigor mortis* tenha sido concluída, o que deixaria a carne com a cor vermelha mais intensa. No entanto, para ovinos são descritos valores de a* entre 12,27 e 18,01, estando os resultados obtidos muito abaixo dos valores esperados²⁵.

Quanto aos parâmetros L* e b*, que mensuram a luminosidade e o teor de amarelo, respectivamente, os valores obtidos não diferiram entre as amostras de mercado público e supermercado. Ao analisar os valores descritos na literatura, como sendo os ideais pra estas carnes, verificou-se que, a luminosidade (L*) apresentou valores dentro da variação estipulada (31,36 a 38,0), enquanto que o teor de amarelo das carnes ovinas exibiu valores mais altos que o esperado (3,34 a 5,65)²⁵.

Normalmente, a coloração da carne é determinada pela concentração total de mioglobina (proteína envolvida nos processos de oxigenação do músculo) e pelas proporções relativas desse pigmento no tecido muscular, que pode ser encontrado na forma de mioglobina reduzida, com coloração púrpura; oximioglobina, de cor vermelho brilhante e metamioglobina, normalmente marrom²⁶. A cor da carne é um

dos parâmetros mais importantes na qualidade da carne e interfere diretamente na escolha do alimento, sendo um dos primeiros atributos observados pelo consumidor³.

CONCLUSÃO

As condições higiênico-sanitárias das carnes ovinas comercializadas em supermercados e mercados públicos de Mossoró/RN são precárias e influenciam negativamente nas características microbiológicas destes produtos, bem como acarretam a comercialização de carnes com qualidade inadequada e em desacordo com a legislação vigente, quanto aos parâmetros microbiológicos, apesar de as carnes ovinas avaliadas terem apresentado todos os parâmetros físico-químicos em conformidade com as especificações de qualidade esperadas.

REFERÊNCIAS

1. Barreto Neto AD. Posicionamento estratégico do setor de carnes de caprinos e ovinos no mercado de carnes brasileiro. *Tecnol Ciên Agropec*.2010;4(4):81-5.
2. Silva NV, Silva JHV, Coelho MS, Oliveira ERA, Araújo JA, Amâncio ALL. Características de carcaça e carne ovina: uma abordagem das variáveis metodológicas e fatores de influência. *Acta Vet Brasílica*. 2008;2(4):103-110.
3. Monte ALS, Gonsalves HRO, Villarroel ABS, Damaceno MN, Cavalcante ABD. Qualidade da carne de caprinos e ovinos: uma revisão. *Agrop Cient Semiárido*.2012;8(3):11-7.

4. Zundt M, Firetti R, Martins TR, Cardoso DT, Angelo BA, Rego FCA, et al. Qualidade microbiológica e química da carne de ovinos de duas diferentes procedências comercializada em Presidente Prudente – SP. *Coll Agrariae*.2014;10(2):75-83.
5. Fernandes EFTS, Paulino AA, Fernandes MFTS, Moura APBL, Mota RA. Qualidade microbiológica da carne de ovinos (*Ovis aries*) comercializada nos mercados públicos do Recife-PE. *Med Vet*. 2009;3(4):7-12.
6. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA Resolução nº 216, de 15 de setembro de 2004. Dispõe sobre Regulamento Técnico de Boas Práticas para Serviços de Alimentação. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 16 set. 2004.
7. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 18 set. 2003.
8. Association of Official Analytical Chemists - AOAC. Official methods of analysis of the Association. 18 ed. Gaithersburg: Maryland; 2005.
9. Hamm R. Biochemistry of meat hydration: advances in food research. Cleveland; 1960.
10. Osório JCS, Osório MTM, Jardim POC, Pimentel MA, Pouey JLO, Lüder WE, et al. Métodos para avaliação de carne ovina “in vivo”, na carcaça e na carne. Pelotas: Ed. Universitária/UFPEL;1998.
11. Martins LL, Santos IF, Franco RM, Oliveira LAT, Bezz J. Avaliação do perfil bacteriológico de salsichas tipo “hot dog” comercializadas em embalagens à vácuo e a granel em supermercados dos municípios Rio de Janeiro e Niterói, RJ/Brasil. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2008;67(3):215-20.
12. Lino GC, Pacheco MS, Rolim MB Q, Paiva JN, Moura APBL. Condições higiênico-sanitárias dos estabelecimentos de comercialização de carnes nos Mercados Públicos de Jaboatão dos Guararapes, PE. *Med Vet*. 2009;3(4):1-6.
13. Vasconcelos EC, Zapata JFF, Figueiredo EA, Castelo Branco MAA, Borges AS. A microbiota da carcaça e da carne ovina tratada com ácido acético, embalada a vácuo e maturada por 48 dias. *Ciênc Tecnol Aliment*.2002;22(3):272-77. [DOI: 10.1590/S0101-20612002000300013].
14. 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] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 10 jan. 2001. Seção 1, nº 7-E. p.45-53.
15. Fai AEC, Figueiredo EAT, Verdin SEF, Pinheiro NMS, Braga ARC, Stamford TM. *Salmonella sp* e *Listeria monocytogenes* em presunto suíno comercializado em supermercados de Fortaleza (CE, Brasil): fator de risco para a saúde pública. *Ciênc Saúde Coletiva*.2011;16(2):657-62. [DOI: 10.1590/S1413-81232011000200029].
16. Moura APBL, Pinheiro Junior JW, Oliveira RBA, Duarte DAM, Ribeiro AR, Reis EMF. Pesquisa de coliformes termotolerantes, totais e *Salmonella spp.* em carnes caprinas comercializadas na cidade do Recife, Pernambuco. *Arq Inst Biol*.2007;74 (4):239-99.
17. Silvestre MKS, Abrantes MR, Paiva WS, Souza ES, Silva JBA. Avaliação da qualidade da carne bovina *in natura* comercializada no município de Alexandria – RN. *Acta Vet Brasílica*.2013;7(4):327-31.
18. Silva N, Junqueira VCA, Silveira NFA, Taniwaki MH, Santos RFS, Gomes RAR. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. São Paulo. Varela; 2007.
19. Zapata JFF, Seabra LMJ, Nogueira CM, Barros N. Estudo da qualidade da carne ovina no Nordeste brasileiro: propriedades físicas e sensoriais. *Ciênc Tecnol Aliment*.2000;20(2):274-77. [DOI: 10.1590/S0101-20612000000200025].
20. Silva Sobrinho AG, Purchas RW, Kadim IT, Yamamoto SM. Características de qualidade da carne de ovinos de diferentes genótipos e idades ao abate. *R Bras Zootec*.2005;34(3):1070-8. [DOI: 10.1590/S1516-35982005000300040].
21. Pellegrini LG, Pellegrini LFV, Pelegrin ACRS, Pires CC. Efeito do tempo de armazenamento sob as características físico-químicas da carne ovina. *Synerg Scyent*.2012;7(1).

22. Mesquita MO, Valente TP, Zimmermann AM, Fries LLM, Terra NM. Qualidade físico-química da carne bovina *in natura* aprovada na recepção de restaurante industrial. *Vig Sanit Debate*. 2014;2(3):103-8. [DOI: 10.3395/vd.v2i3.147].

23. Santos AT, Carvalho FMN, Beserra MLS. Análise microbiológica e condições higiênicas sanitárias com propriedades da carne bovina vendida em mercados públicos de Teresina – PI. *Rev Interdiscip*.2014;7(1):25-33.

24. Souza XR, Bressan MC, Pérez JRO. Efeitos do grupo genético, sexo e peso ao abate sobre as propriedades físico-químicas da carne de cordeiros em crescimento. *Ciênc Tecnol Aliment*.2004;24(4):543-49. [DOI: 10.1590/S0101-20612004000400011].

25. Costa RG, Santos NMS, Sousa WH, Queiroga RCRE, Azevedo OS, Cartaxo FQ. Qualidade física e sensorial da carne de cordeiros de três genótipos alimentados com rações formuladas com duas relações volumoso: concentrado. *Rev Bras Zootec*.2011;40(8):1781-7.

Influência do tempo de armazenamento sobre a concentração de alfa-tocoferol e gama-tocoferol em óleos vegetais

Influence of the storage time on the concentration of alpha-tocopherol and gamma-tocopherol in vegetable oils

RIALA6/1656

Evellyn Câmara GRILLO, Priscila Nunes COSTA, Cristiane Santos Sânzio GURGEL, Dalila Fernandes BEZERRA, Paula Emília Nunes Ribeiro BELLOT, Roberto DIMENSTEIN*

*Endereço para correspondência: Laboratório de Alimentos e Bioquímica da Nutrição, Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Av. Senador Salgado Filho, 3000, Lagoa Nova, CEP 59072-970, Natal/RN, Brasil. E-mail: rdimenstein@gmail.com

Recebido: 12.12.2014 - Aceito para publicação: 25.08.2015

RESUMO

O alfa- e o gama-tocoferol estão entre os homólogos da vitamina E, que possui importante papel como antioxidante. As fontes dietéticas mais ricas em vitamina E são os óleos vegetais. Este trabalho avaliou os níveis de alfa- e gama-tocoferol nos óleos de canola, girassol, milho e soja, e averiguou sua variação com o tempo de armazenamento. Os óleos vegetais foram adquiridos nos supermercados da cidade de Natal/RN, e mantidos sob temperatura ambiente e ao abrigo da luz. As análises foram realizadas em diferentes momentos durante o armazenamento (tempo 0 e após 30, 60 e 90 dias). Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi usada para determinar as concentrações dos analitos. A análise estatística foi realizada utilizando-se o teste de variância (ANOVA) e as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$. Ao final do tempo de armazenamento (90 dias) foi verificada diminuição significativa nos níveis de alfa- e gama-tocoferol de 38,7 % e 36,0 %, no óleo de canola; 42,2 % e 22,2 %, no óleo de soja; 28,3 % e 29,2 %, no óleo de girassol; 39,0 % e 17,9 %, no óleo de milho, respectivamente. As concentrações de alfa- e gama-tocoferol nos óleos vegetais reduziram significativamente após armazenamento, sob as condições empregadas no estudo.

Palavras-chave. óleos vegetais, alfa-tocoferol, gama-tocoferol, tempo de armazenamento.

ABSTRACT

The alpha- and gamma-tocopherol are among the homologues of vitamin E which plays a key role as an antioxidant. The richest dietary sources of vitamin E are vegetable oils. This study aimed at evaluating the alpha- and gamma-tocopherol contents in oils from canola, sunflower, corn and soybeans, and to verify their variations after storage time. The vegetable oils were purchased at supermarkets in Natal / RN, and they were kept at room temperature and protected from light. The tests was made at different times during storage (time 0 and after 30, 60 and 90 days). The high performance liquid chromatography (HPLC) was used to determine their concentrations. The statistical analysis was performed using analysis of variance (ANOVA) test and the differences were considered statistically significant when $p < 0.05$. By the end of the storage time (90 days), the alpha- and gamma-tocopherol contents showed a significant decrease of 38.7 % and 36.0 % for canola oil; 42.2 % and 22.2 % in soybean oil; 28.3 % and 29.2 % in sunflower oil; 39.0 % and 17.9 % in corn oil, respectively. The concentrations of alpha- and gamma-tocopherol in vegetable oils significantly decreased after the storage period under the conditions used in this study.

Keywords. plant oils, alpha-tocopherol, gamma-tocopherol, storage time.

INTRODUÇÃO

O termo vitamina E é usado como descritor genérico dos derivados de tocol e tocotrienol. As formas encontradas naturalmente incluem quatro tocoferóis (alfa, beta, gama e delta-tocoferol) e quatro tocotrienóis (alfa, beta, gama e delta-tocotrienol)¹.

A vitamina E atua como um antioxidante não enzimático, sendo o alfa-tocoferol o principal antioxidante capaz de interromper reações de oxidação envolvendo radicais livres. Este isômero age diretamente removendo radicais peróxido e consequentemente atua na proteção dos ácidos graxos poli-insaturados das membranas celulares e lipoproteínas².

Vários estudos têm demonstrado que o gama-tocoferol também possui um importante papel antioxidante. Quando comparado ao alfa-tocoferol, o gama-tocoferol é um removedor mais potente de espécies reativas de nitrogênio. Pesquisas realizadas em animais evidenciaram a ação anticâncer do gama-tocoferol e em seres humanos, foi verificada uma associação inversa entre as concentrações séricas de gama-tocoferol e o risco de desenvolver doenças cardiovasculares^{3,4}.

Populações de países em desenvolvimento possuem maior risco para a deficiência de vitamina E em decorrência da limitada ingestão de alimentos fontes e pela maior prevalência de doenças que aceleram a depleção desta vitamina, como a infecção por HIV e a malária. Os recém-nascidos, especialmente os prematuros, são mais suscetíveis a desenvolver esta deficiência. Os principais sintomas da deficiência de vitamina E são neuropatia periférica, ataxia e anemia^{5,6}.

As formas naturais da vitamina E são sintetizadas por plantas e os óleos vegetais são as principais fontes desta vitamina, sendo o alfa-tocoferol e o gama-tocoferol os principais isômeros da vitamina E presentes nesse alimento⁷. No Brasil, o consumo anual de óleos vegetais está em torno de 3,72 milhões de toneladas, sendo o óleo de soja o mais consumido, atingindo um consumo anual equivalente a 6,3 kg per capita ou 89 % do total consumido de óleos⁸.

Os óleos de girassol, de cártamo e de gérmen de trigo são especialmente ricos em alfa-tocoferol e o gama-tocoferol é o composto predominante nos óleos de soja e de milho^{9,10}. Ainda assim, o óleo de soja é o principal contribuinte para a ingestão de vitamina E pela população¹¹.

A recomendação de ingestão diária de vitamina E equivale a 15 mg para adultos, segundo o Instituto de Medicina¹². Nos Estados Unidos, as estimativas de ingestão dietética de vitamina E sugerem que 92 % dos homens e 98 % das mulheres não ingerem a quantidade recomendada de vitamina E¹³. Um estudo realizado com 2344 brasileiros concluiu que a ingestão de vitamina E é baixa: os homens e as mulheres atingiram 42,5 % e 40,8 % da recomendação diária, respectivamente¹⁴.

Os óleos vegetais são suscetíveis à deterioração devido à ocorrência da oxidação lipídica, que pode acontecer por fatores ambientais, tais como: presença de luz, oxigênio e altas temperaturas, e os químicos, relacionados à presença de substâncias pró-oxidantes, álcalis ou oligoelementos. Esses fatores podem culminar com a perda de tocoferóis e oxidação de ácidos graxos insaturados, promovendo a formação de quinonas, dímeros e trímeros^{15,16}.

A oxidação em alimentos é responsável pela redução da vida de prateleira e a rancidez ocorre principalmente durante o processamento e armazenamento, resultando em alterações dos parâmetros de qualidade, como a cor e a produção de compostos voláteis responsáveis pelos sabores e odores desagradáveis. As principais alterações químicas nos óleos vegetais ocorrem por processos químicos, como a auto oxidação, a polimerização térmica ou a oxidação térmica¹⁷.

Alguns estudos que avaliaram o efeito do tempo de armazenamento sobre os níveis de alfa-tocoferol e gama-tocoferol em óleos vegetais detêm-se principalmente na análise de marcadores da oxidação lipídica, observando a atuação da vitamina E como protetora de ácidos graxos insaturados e não propriamente avaliando a concentração dos isômeros da vitamina E^{18,19}.

Diante da dificuldade da população em atingir o requerimento nutricional em vitamina E e da suscetibilidade dos óleos vegetais à oxidação de ácidos graxos, é necessário estabelecer as concentrações desta vitamina, bem como verificar o efeito de fatores que possam interferir nesses valores, como o tempo de armazenamento do produto. Assim, o objetivo desse trabalho foi determinar a concentração de alfa-tocoferol e gama-tocoferol em óleos vegetais comercializados em Natal/RN, em função do tempo de armazenamento.

MATERIAL E MÉTODOS

O plano de amostragem deste trabalho foi definido com base no método utilizado pela Tabela Brasileira de Composição de Alimentos – TACO²⁰. Assim, para cada tipo de óleo (canola, girassol, milho e soja), foram adquiridas 2 unidades de lotes distintos, das 3 principais marcas comercializadas nos supermercados de Natal/RN, Brasil. Foram incluídos neste estudo os óleos vegetais fabricados, no máximo, um mês antes da primeira análise bioquímica.

Em relação às condições de armazenamento, as amostras foram mantidas na própria embalagem comercial, sob temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

Quantificação de alfa- e gama-tocoferol por cromatografia líquida de alta eficiência

Foram determinadas as concentrações de alfa- e gama-tocoferol dos óleos analisados em 4 momentos distintos: a primeira análise refere-se ao tempo zero (T0h), ou seja, no dia em que os óleos foram adquiridos no supermercado; a segunda, 30 dias após a análise do tempo zero (T30d); a terceira, 60 dias após o T0h (T60d); e a quarta, após 90 dias de armazenamento dos óleos vegetais (T90d).

As concentrações de alfa-tocoferol e gama-tocoferol das amostras de óleos vegetais foram determinadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Foi realizada uma diluição de 40 µL de óleo vegetal em 960 µL de diclorometano (UV/HPLC - Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) e agitou-se por 1 min.

As amostras foram diluídas em triplicatas, as quais foram aplicadas através da técnica de injeção direta, conforme Lima e Gonçalves²¹. Foram injetados 20 µL de cada amostra em cromatógrafo de marca Shimadzu, com bomba LC-10 AD Shimadzu, acoplado a um Detector SPD-10A Shimadzu UV-VIS e integrador Chromatopac C-R6A Shimadzu, com uma coluna LC Perkin Elmer CLC-ODS (M) 4,6 mm x 250 mm. A fase móvel utilizada foi metanol a 100 %, em sistema isocrático, com fluxo de 1,0 mL/min. A identificação e quantificação do alfa-tocoferol e do gama-tocoferol das amostras foram estabelecidas por comparação com o tempo de retenção e a área dos respectivos padrões (alfa-tocoferol e gama-tocoferol, Sigma[®]). A concentração dos padrões foi confirmada pelo coeficiente de extinção específico (ϵ 1 %, 1 cm = 75,8 com comprimento de onda de 292 nm para o alfa-tocoferol e ϵ 1 %, 1 cm = 91,5 com comprimento de onda de 298 nm para o gama-tocoferol), ambos diluídos em etanol absoluto (Merck, São Paulo, Brasil)^{22,23}. O procedimento analítico de preparação das amostras foi realizado em temperatura em torno de 25 °C, em tubos protegidos da luz (embalados com papel alumínio).

Relação entre a porção recomendada de óleos e o requerimento diário em vitamina E

Segundo o Guia Alimentar para a População Brasileira²⁴, a recomendação de consumo de óleos, gorduras ou sementes oleaginosas é de 1 porção por dia, o que corresponde a 8 gramas. Considerando a concentração de alfa-tocoferol nos óleos vegetais analisados no tempo zero (T0h), foram calculadas as quantidades desse composto contidas em uma porção de óleo, bem como sua relação com o requerimento nutricional diário de vitamina E, que equivale a 15 mg para adultos¹². Os óleos vegetais foram classificados como alimento fonte de vitamina E se continham acima de 5 % do valor da recomendação diária na porção usual; como boa fonte, se continham entre 10 e 20 % e como excelente fonte se continham acima de 20 %²⁵. Esses cálculos também foram realizados considerando as concentrações de alfa-tocoferol

nos óleos vegetais após os 90 dias de armazenamento.

Análise estatística

As concentrações de alfa-tocoferol e gama-tocoferol foram dadas em mg/100g de óleo vegetal, sendo expressas como média e desvio padrão. A análise estatística foi feita por meio do software Statistica7 (StatSoft, Inc, Tulsa, OK, USA). Utilizou-se o teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar a normalidade dos dados, que apresentaram distribuição normal. Sendo assim, foi aplicado o teste de análise de variância (ANOVA), com teste *post-hoc* de Tukey para verificar a diferença estatística entre as médias das concentrações de alfa- e gama-tocoferol nos diferentes tempos de armazenamento. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

As concentrações médias de alfa-tocoferol nos óleos de canola, girassol, milho e soja nos tempos 0 hora, 30, 60 e 90 dias de armazenamento estão expostas na Tabela 1 e as concentrações de gama-tocoferol em função do tempo de armazenamento estão expostas na Tabela 2.

Analisando as concentrações médias de alfa-tocoferol e gama-tocoferol em função do tempo de armazenamento, foi verificado que esses valores diminuíram de maneira acentuada 30 dias após a primeira análise (T30d), sendo que nos tempos 60 e 90 dias de armazenamento (T60d e T90d) as perdas ainda ocorreram, porém com uma redução percentual menor. Ao final do tempo de armazenamento (T90d), os níveis de alfa-tocoferol e gama-tocoferol tiveram uma redução total significativa, sendo $p < 0,05$. Após 90 dias de armazenamento dos óleos, as porcentagens de redução das concentrações de alfa-tocoferol e gama-tocoferol foram 38,7 % e 36,0 % no óleo de canola; 42,2 % e 22,2 % no óleo de soja; 28,3 % e 29,2 % no óleo de girassol; e 39,0 % e 17,9 % no óleo de milho, respectivamente.

Levando em consideração o requerimento diário de vitamina E (alfa-tocoferol) e a concentração inicial de alfa-tocoferol (T0h) nos óleos analisados, o óleo de girassol foi considerado uma excelente fonte desta vitamina (23,7 %), os óleos de canola e milho se classificaram como alimentos fontes (8,0 % e 9,7 %, respectivamente) e o óleo de soja não foi considerado alimento fonte de vitamina E (3,4 %).

Tabela 1. Concentração média de alfa-tocoferol em óleos vegetais comercializados em Natal-RN (2012), em função do tempo de armazenamento

Concentração de α -Tocoferol (mg/100g)	Tempo de armazenamento			
	Zero (T0h)	30 dias (T30d)	60 dias (T60d)	90 dias (T90d)
Canola ¹	15,0 ± 2,3 ^a	10,2 ± 2,5 ^b (-32,0 %)	9,3 ± 3,5 ^b (-38,0 %)	9,2 ± 2,4 ^b (-38,7 %)
Girassol ²	44,5 ± 7,5 ^a	35,6 ± 2,7 ^b (-20,0 %)	32,6 ± 3,3 ^b (-26,7 %)	31,9 ± 3,3 ^b (-28,3 %)
Milho ³	18,2 ± 8,5 ^a	12,3 ± 1,9 ^b (-32,4 %)	12,0 ± 1,6 ^b (-34,1 %)	11,1 ± 2,0 ^b (-39,0 %)
Soja ⁴	6,4 ± 1,3 ^a	4,6 ± 1,2 ^b (-28,1 %)	4,2 ± 0,7 ^c (-34,4 %)	3,7 ± 0,8 ^d (-42,2 %)

Letras iguais na linha não diferem significativamente entre si; letras diferentes diferem significativamente, sendo $p < 0,05$ (Teste ANOVA, com *post hoc* de Tukey)

Tabela 2. Concentração média de gama-tocoferol em óleos vegetais comercializados em Natal-RN (2012), em função do tempo de armazenamento

Concentração de γ -Tocoferol (mg/100g)	Tempo de armazenamento			
	Zero (T0h)	30 dias (T30d)	60 dias (T60d)	90 dias (T90d)
Canola ¹	15,0 \pm 2,0 ^a	10,7 \pm 2,0 ^b (-28,7 %)	9,5 \pm 1,7 ^b (-36,7 %)	9,6 \pm 1,6 ^b (-36,0 %)
Girassol ²	9,6 \pm 1,5 ^a	8,7 \pm 1,6 ^a (-9,4 %)	8,1 \pm 1,6 ^b (-15,6 %)	6,8 \pm 1,7 ^c (-29,2 %)
Milho ³	26,2 \pm 1,9 ^a	22,8 \pm 2,1 ^b (-13,0 %)	22,5 \pm 2,4 ^b (-14,1 %)	21,5 \pm 1,9 ^b (-17,9 %)
Soja ⁴	26,6 \pm 5,7 ^a	21,5 \pm 2,5 ^b (-19,2%)	21,0 \pm 3,2 ^b (-21,1%)	20,7 \pm 2,8 ^c (-22,2%)

Letras iguais na linha não diferem significativamente entre si; letras diferentes diferem significativamente, sendo $p < 0,05$ (Teste ANOVA, com post hoc de Tukey)

Quando considerada a concentração final de alfa-tocoferol nos óleos avaliados (T90d), o óleo de girassol foi classificado como boa fonte de vitamina E (17,0%), o óleo de milho foi considerado alimento fonte (5,9 %) e os óleos de canola e de soja não foram considerados alimentos fontes desta vitamina (4,9 % e 2,0 %, respectivamente).

DISCUSSÃO

No tempo zero (T0h), as concentrações de alfa-tocoferol e gama-tocoferol dos óleos vegetais analisados são condizentes com aquelas descritas na literatura^{9,26,27}. Além disso, este estudo indicou que o óleo de girassol tem maior concentração de alfa-tocoferol, enquanto os óleos de soja e milho têm maiores concentrações de gama-tocoferol, assim como foi observado em outros estudos²⁸⁻³⁰.

As reduções das concentrações de alfa-tocoferol e gama-tocoferol durante o armazenamento eram esperadas, devido ao potencial antioxidante da vitamina E que atua na proteção dos ácidos graxos insaturados dos óleos vegetais. Embora os óleos não estivessem submetidos a altas temperaturas e à exposição da luz, que são fatores externos que aceleram a oxidação, alguns fatores químicos relacionados à presença de substâncias pró-oxidantes, álcalis ou oligoelementos podem

promover e acelerar as reações de oxidação dos ácidos graxos, culminando com a degradação dos tocoferóis^{15,16}.

Foi observado também que as maiores perdas vitamínicas nos tempos de análise de 30, 60 e 90 dias ocorreram com o alfa-tocoferol em detrimento do gama-tocoferol, para todos os tipos de óleos analisados (Tabela 1). O alfa-tocoferol atua como antioxidante, enquanto o gama-tocoferol pode remover espécies de nitrogênio derivadas dos peróxidos por meio de um mecanismo não antioxidante³¹. Alguns estudos demonstraram que o alfa-tocoferol é decomposto mais rapidamente e é mais instável que o gama-tocoferol, uma vez que a velocidade de degradação do gama-tocoferol é classificada como intermediária, prolongando seu efeito protetor contra radicais livres nos óleos³²⁻³⁴.

Ao analisar a oxidação do óleo de soja durante 3 meses, Carvalho³³ verificou uma redução de 31,7 e 2,9 % nas concentrações de alfa-tocoferol e gama-tocoferol, respectivamente. Esses resultados foram inferiores aos obtidos neste estudo, por outro lado, corrobora com a redução percentual superior para o alfa-tocoferol em relação ao gama-tocoferol.

Paraginski et al³⁴ determinaram a concentração de tocoferóis em óleo de milho armazenado durante 12 meses e verificaram uma perda percentual final de 62,4 % e 39,1 % para o alfa-tocoferol e o gama-tocoferol, respectivamente,

à temperatura de armazenamento de 25 ° C. Essas perdas foram bem superiores àquelas obtidas neste estudo, provavelmente por terem sido empregados tempos de armazenamento distintos. Entretanto, assim como ocorreu neste trabalho, o conteúdo de alfa-tocoferol sofreu maiores perdas percentuais em comparação ao gama-tocoferol.

Um estudo realizado por Choe determinou a concentração de tocoferóis em óleo de girassol e verificou uma degradação significativa desses compostos em diferentes tempos de armazenamento, temperatura e exposição à luz. Além disso, o gama-tocoferol mostrou maior estabilidade do que o alfa-tocoferol durante a oxidação do óleo, tanto no escuro quanto exposto à luz³⁵.

A atividade antioxidante dos tocoferóis decorre de sua capacidade de doar o hidrogênio fenólico a um radical livre e dessa forma, retardam processos de peroxidação lipídica autocatalítica. A capacidade antioxidante dos homólogos dos tocoferóis segue a seguinte ordem: $\alpha > \beta > \gamma > \delta$ ³⁷. Segundo Player³², o alfa-tocoferol possui alta atividade antioxidante em óleos vegetais e conseqüentemente apresentam baixa estabilidade durante o armazenamento. Essa maior capacidade antioxidante do alfa-tocoferol pode explicar a maior perda percentual desse composto nos óleos vegetais, em comparação àquelas observadas para o gama-tocoferol.

Silva³⁷ comparou a oxidação de óleos de girassol, soja e milho através dos índices de peróxidos e dosagem de tocoferóis após processamento e evidenciou que o óleo de girassol apresentou maior degradação durante esse processo. Explica-se a perda considerável de tocoferóis no óleo de girassol pelos elevados níveis de ácidos graxos poli-insaturados³⁸. Em contrapartida, os dados encontrados neste estudo sugerem que o óleo de soja apresenta a maior perda percentual de alfa-tocoferol (42,2 %) e o de canola o maior decréscimo de gama-tocoferol (36,0 %) em detrimento do óleo de girassol, após os 90 dias de armazenamento.

Considerando o somatório de perdas dos dois isômeros da vitamina E analisados neste estudo, a maior redução percentual após os 90

dias de armazenamento ocorreu no óleo de canola, estando em concordância com Goffman e Mollers³⁹. Esses autores avaliaram as concentrações de alfa-tocoferol e gama-tocoferol no óleo de canola após 24 semanas (168 dias) de armazenamento, mantido em diferentes condições de temperaturas e exposição ao oxigênio atmosférico. O óleo de canola pode apresentar maiores perdas de tocoferóis em decorrência de sua alta porcentagem de ácidos graxos insaturados⁴⁰.

Neste estudo, também foi verificado que o óleo de milho apresentou menores perdas de gama-tocoferol em comparação aos demais óleos. Esse achado pode ser justificado pela boa estabilidade do óleo de milho, que está relacionada com seus altos níveis de compostos insaponificáveis, como os fitosteróis⁴⁰.

Ao fim do período de 90 dias de armazenamento, ocorreu um decréscimo nos níveis de alfa-tocoferol nos óleos vegetais, que é o isômero relacionado ao requerimento diário em vitamina E. Inicialmente, o óleo de girassol foi classificado como excelente fonte de vitamina E e ao final do tempo de armazenamento, foi considerado boa fonte. Já o óleo de canola inicialmente foi considerado alimento fonte de vitamina E e ao final do armazenamento, este produto não foi considerado fonte de vitamina E. Isso indica que esse período em que os óleos vegetais foram armazenados foi suficiente para comprometer sua qualidade nutricional quanto ao conteúdo de vitamina E.

Pela escassez de trabalhos na literatura que determinem a concentração de alfa-tocoferol e gama-tocoferol em diferentes óleos vegetais, houve a impossibilidade de algumas análises comparativas dos resultados obtidos neste estudo, sobretudo no que diz respeito às variações das concentrações vitamínicas em função do tempo de armazenamento de 30, 60 e 90 dias.

Estudos que avaliem nutrientes essenciais dos alimentos em função de fatores externos, como o tempo de armazenamento, são importantes para o monitoramento da qualidade nutricional destes produtos, bem como para a elaboração de estratégias que minimizem a perda de qualidade. Sugere-se que sejam realizados trabalhos a fim de avaliar

a influência de outros fatores externos, como a presença de luz e altas temperaturas, sobre a concentração de tocoferóis e outros compostos bioativos presentes nos óleos vegetais.

CONCLUSÃO

O tempo de armazenamento provocou reduções significativas nas concentrações de alfa-tocoferol e gama-tocoferol nos óleos vegetais avaliados, sendo mais acentuada no óleo de canola. Além disso, a concentração de alfa-tocoferol apresentou uma redução percentual superior àquela observada para o gama-tocoferol nos óleos vegetais, em todos os tempos de armazenamento.

REFERÊNCIAS

1. Traber MG. Vitamin E. In: Erdman Jr JW, Macdonald IA, Zeisel SH, eds. Present knowledge in nutrition. 10th ed. Washington, D.C: ILSI Press; 2012. p. 214–29.
2. Mocchegiani E, Costarelli L, Giacconi R, Malavolta M, Basso A, Piacenza F, et al. Vitamin E-gene interactions in aging and inflammatory age-related diseases: implications for treatment. A systematic review. *Ageing Res Rev*. 2014;14(1):81-101. [DOI: 10.1016/j.arr.2014.01.001].
3. Yu W. Anticancer actions of natural and synthetic vitamin E forms: RRR-alpha-tocopherol blocks the anticancer actions of gamma-tocopherol. *Mol Nutr Food Res*. 2009; 53:1573-81. [DOI: 10.1002/mnfr.200900011].
4. Menoyo D, Sanz-Bayón C, Nessa AH, Esatbeyoglu T, Faizan M, Pallauf K, et al. Atlantic salmon (*Salmosalar L.*) as a marine functional source of gamma-tocopherol. *Mar Drugs*. 2014;12(12):5944-59. [DOI: 10.3390/md12125944].
5. Antonakou A, Chiou A, Andrikopoulos NK, Bakoula C, Matalas A. Breast milk tocopherol content during the first six months in exclusively breastfeeding Greek women. *Eur J Nutr*. 2011;50(3):195-202. [DOI: 10.1007/s00394-010-0129-4].
6. Dror DK, Allen LH. Vitamin E deficiency in developing countries. *Food Nutr Bull*. 2011;32(2):124-43.
7. Bianchini-Pontuschka R, Penteado MVC. Vitamina E. In: Penteado MVC, ed. *Vitaminas: aspectos nutricionais, bioquímicos e analíticos*. 1 ed. Barueri, SP: Manole; 2003. p. 121-64.
8. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. Pesquisa de orçamentos familiares 2008-2009: aquisição alimentar domiciliar per capita. Rio de Janeiro (RJ): IBGE; 2010. p. 284.
9. United States Department of Agriculture - USDA. National Nutrient Database for Standard Reference, Release 21; 2008. [acesso 2014 Abr 03]. Disponível em: [http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl].
10. Caretto S, Nisi R, Paradiso A, De Gara L. Tocopherol production in plant cell cultures. *Mol Nutr Food Res*. 2010;54(5):726-30. [DOI: 10.1002/mnfr.200900397].
11. Jiang Q, Christen S, Shigenaga MK, Ames BN. Gamma-tocopherol, the major form of vitamin E in the US diet, deserves more attention. *Am J Clin Nutr*. 2001;74(6):714-22.
12. Institute of Medicine (US). Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids. Washington (DC): National Academy Press; 2000. p. 529.
13. Maras JE, Bermudez OI, Qiao N, Bakun PJ, Boody-Alter EL, Tucker KL. Intake of alpha-tocopherol is limited among US adults. *J Am Diet Assoc*. 2004;104(4):567-75. [DOI: 10.1016/j.jada.2004.01.004].
14. Pinheiro MM, Ciconelli RM, Chaves GV, Aquino L, Juzwiak CR, Genaro OS, et al. Antioxidant intake among Brazilian adults -The Brazilian Osteoporosis Study (BRAZOS): a cross-sectional study. *Nutr J*. 2011;10:39. [DOI: 10.1186/1475-2891-10-39].
15. Telles MM. Caracterização dos grãos, torta e óleo de três variedades de girassol (*Helianthus annuus L*) e estabilidade do óleo bruto [dissertação de mestrado]. Florianópolis (SC): Universidade Federal de Santa Catarina; 2001.
16. Nogala-Kalucka M, Korczak J, Dratwia M, Lampart-Szczapa E, Siger A, Buchowski M. Changes in antioxidant activity and free radical scavenging potential of rosemary extract and tocopherols in isolated rapeseed oil triacylglycerols during accelerated tests. *Food Chem*. 2005;93(2):227–35. [DOI: 10.1016/j.foodchem.2004.09.021].

17. Thode Filho S, Cabral GB, Maranhão FS, Sena MFM, Silva ER. Deterioração de óleos vegetais expostos a diferentes condições de armazenamento. *REGET*.2014;18(1):7-13. [DOI:10.5902/2236117013802].
18. Cerqueira FM, Medeiros MHG, August O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. *Quím Nova*.2007;30(2):441-9. [DOI: 10.1590/S0100-40422007000200036].
19. Sarmiento RA, Silva FM, Sbruzzi G, Schaan BD, Almeida JC. Micronutrientes antioxidantes e risco cardiovascular em pacientes com diabetes: uma revisão sistemática. *Arq Bras Cardiol*. 2013; 101(3): 240-8. [DOI: 10.5935/abc.20130146].
20. Tabela Brasileira de Composição de Alimentos - TACO. 4 ed., Campinas: NEPA/ UNICAMP, 2011.
21. Lima JR, Gonçalves LAG. Quantificação de tocoferóis em óleos de milho, soja, castanha-do-pará e castanha de caju por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em fase reversa. *Alim Nutr*.1997;8:65-73.
22. Nierenberg DW, Nann SL. A method for determining concentrations of retinol, tocopherol, and five carotenoids in human plasma and tissue samples. *Am J Clin Nutr*.1992; 56:417-26.
23. Podda M, Weber C, Traber MG, Packer L. Simultaneous determination of tissue tocopherols, tocotrienols, ubiquinols, and ubiquinones. *J Lipid Res*.1996;37(4):893-901.
24. Brasil. Ministério da Saúde. Guia Alimentar para População Brasileira promovendo a alimentação saudável (Normas e manuais técnicos). Brasília, 2008.
25. Philippi ST. Alimentação Saudável e a pirâmide dos alimentos. In: Pirâmide dos Alimentos: Fundamentos básicos da Nutrição. Barueri: Manole; 2008. p. 3-29.
26. Ahmed MK, Daun JK, Przybylski R. FT-IR based methodology for quantitation of total tocopherols, tocotrienols and plastochromanol-8 in vegetable oils. *J Food Composit Anal*.2005;18(5):359-64. [DOI: 10.1016/j.jfca.2003.12.008].
27. Monge-Rojas R, Campos H. Tocopherol and carotenoid content of foods commonly consumed in Costa Rica. *J Food Composit Anal*.2011;24(2):202-16. [DOI: 10.1016/j.jfca.2010.09.015].
28. Masuchi MH, Celeghini RMS, Goncalves LAG, Grimaldi R. Quantificação de TBHQ (Terc Butil Hidroquinona) e avaliação da estabilidade oxidativa em óleos de girassol comerciais. *Quím Nova*. 2008;31(5):1053-57. [DOI: 10.1590/S0100-40422008000500020].
29. Guinaz M, Milagres RCRM, Pinheiro-Sant'Ana HM, Chaves JBP. Tocoferóis e tocotrienóis em óleos vegetais e ovos. *Quim Nova*.2009;32(8):2098-103. [DOI: 10.1590/S0100-40422009000800021].
30. Velasco L, Del Moral L, Pérez-Vich B, Fernández-Martínez JM. Selection for contrasting seed tocopherol content in sunflower seeds. *J Agr Sci*.2010;148(4):393-400. [DOI: 10.1590/S0100-40422009000800021].
31. Azzi A, Stocker A. Vitamin E: non-antioxidant roles. *Prog Lipid Res*.2000; (39):231-55.
32. Player ME, Kim HJ, Lee HO, Min DB. Stability of α -, γ - or δ -tocopherol during soybean oil oxidation. *J. Food Sci*.2006;71(8):456-60. [DOI:10.1016/S0163-7827(00)00006-0].
33. Carvalho SM. Efeito da adição de tocoferóis sobre a qualidade de óleo de soja embalado em PET [dissertação de mestrado]. Florianópolis (SC): Universidade Federal de Santa Catarina; 2007.
34. Paraginski RT, Talhamento A, Oliveira M, Elias MC. Efeitos da temperatura nas alterações do teor de compostos com potencial antioxidante em grãos de milho durante o armazenamento. *Rev Bras Prod Agroind*.2015;17(2):159-67.
35. Choe E. Interaction of light and temperature on tocopherols during oxidation of sunflower oil. *J AOCS*.2013;90(12):1851-7. [DOI: 10.1007/s11746-013-2330-0].
36. Seppanen CM, Song Q, Csallany AS. The antioxidant functions of tocopherol and tocotrienol homologues in oils, fats, and food systems. *J AOCS*.2010;87(5):469-81. [DOI: 10.1007/s11746-009-1526-9].
37. Silva LM. Determinação da estabilidade de óleos e de compostos com atividade anti-aterosclerótica do azeite durante o processamento de alimentos [dissertação de mestrado]. Porto: Faculdade de Ciências da Universidade do Porto; 2008.

38. Henrique LR. Estabelecimento de uma metodologia de determinação do tempo de vida útil de alguns óleos [dissertação de mestrado]. Lisboa: Instituto Superior de Agronomia; 2011.

39. Goffman FD, Mollers C. Changes in tocopherol and plastochromanol-8 contents in seeds and oil of oilseed Rape (*Brassica napus* L.) during storage as influenced by temperature and air oxygen. *J Agric Food Chem*.2000;48: 1605-9. [DOI: 10.1021/jf9912755].

40. Fuentes PHA. Avaliação da qualidade de óleos de soja, canola, milho e girassol durante o armazenamento [dissertação de mestrado]. Florianópolis (SC): Universidade Federal de Santa Catarina; 2011.

Avaliação da contaminação de amostras de soja com resíduos de agrotóxicos pelo método QuEChERS acetato com análise por meio de CLAE-EM/EM

Evaluation of the soy samples contamination with pesticides residues by using QuEChERS acetate methodology and applying LC-MS/MS analysis

RIALA6/1657

Adherlene Vieira GOUVÊA^{1*}, Maria Helena Wohlers Morelli CARDOSO¹, Lucia Helena Pinto BASTOS¹, Cristiane BARATA-SILVA², Armi Wanderley da NÓBREGA¹, Silvana do Couto JACOB¹

*Endereço para correspondência: ¹Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde (INCQS), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). Av. Brasil, 4365, Mangueiras, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, CEP: 21040-900. E-mail: adherlene.gouvea@incqs.fiocruz.br; adherlene@gmail.com

²Escola Nacional de Saúde Pública (ENSP), Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ)

Recebido: 21.10.2014 - Aceito para publicação: 08.06.2015

RESUMO

O presente estudo teve por finalidade avaliar a situação atual do consumo de alimentos à base de soja disponíveis no mercado em relação à presença de resíduos de agrotóxicos. A metodologia foi validada para efetuar a determinação de 122 resíduos de pesticida na matriz soja e de 124 substâncias na matriz extrato solúvel de soja. As curvas analíticas estudadas nas duas matrizes apresentaram linearidade na faixa de trabalho analisada (0,002 a 0,200 µg.mL⁻¹). A exatidão e a precisão em dois níveis de fortificação apresentaram valores de 70 % a 119 % de recuperação e de CV (%) de 1 a 18. O Limite de Quantificação (LQ) apresentou resultados satisfatórios (0,005 a 0,215 mg.kg⁻¹ matriz soja e 0,006 a 0,028 mg.kg⁻¹ matriz extrato solúvel de soja) em relação aos Limites Máximos de Resíduo (LMRs) quando existentes. Para realizar o estudo, foram selecionadas 42 amostras de soja e materiais à base de soja. As amostras foram adquiridas, no período de 2011 a 2012, em estabelecimentos comerciais na região metropolitana do Rio de Janeiro. Esta avaliação exploratória de contaminação evidenciou o uso inapropriado dos agrotóxicos ciprodinil, pirimifós-metilico, ciazofamida e butóxido de piperonila na soja e de estar em desacordo com a legislação vigente.

Palavras-chave. soja, agrotóxicos, estudo de validação, cromatografia líquida, espectrometria de massas.

ABSTRACT

This study aimed at assessing the current status of the consumption of soy-based foods available at market regarding to the presence of pesticide residues. The methodology was validated for determining 122 pesticides residues in the matrix soybean and 124 in the matrix of soluble soy extract. The analytical curves studied in the two arrays showed linearity in the evaluated zone (0.002 to 0.200 µg.mL⁻¹). The accuracy and precision of two fortification ranges exhibited recovery values of 70 % - 119 %, and CV (%) values from 1 to 18. The limit of quantification (LQ) showed satisfactory results (0.005 to 0.215 mg.kg⁻¹ matrix of soybeans and 0.006 to 0.028 mg.kg⁻¹ matrix of soluble soy extract) regarding to the maximum residue limits (MRLs) when they occur. Forty-two soy and soy-based samples were randomly selected for this study. The samples were acquired in the period from 2011 to 2012 at commercial establishments located in the metropolitan area of Rio de Janeiro. This study evidenced the contamination of soybeans with pesticides residues as cyprodinil, pirimiphos-methyl, cyazofamid, and piperonyl butoxide, indicating their inappropriate use and being noncompliant to the legislation in force.

Keywords. soybeans, pesticides, validation studies, liquid chromatography, mass spectrometry.

INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) pertence à família das Papilionáceas e à subordem das leguminosas. É uma planta herbácea cujos grãos são ricos em proteínas (38 %) e lipídios (18 %). A soja é rica em proteínas de boa qualidade, possui ácidos graxos poliinsaturados e fibras. Também é uma excelente fonte de minerais como cobre, ferro, fósforo, potássio, magnésio, manganês e vitaminas do complexo B^{1,2}.

A soja contém uma classe de fito-hormônios (hormônios de origem vegetal) conhecida como isoflavonas ou isoflavonóides que é de grande importância para a saúde feminina, além de também apresentar características antioxidantes^{3,4}.

A soja pode ser consumida em grãos, porém a sua maior utilização é na produção de derivados caseiros ou industrializados. Os principais alimentos à base de soja são: óleo, extrato hidrossolúvel de soja, queijo (tofu), farinha, proteína texturizada de soja e broto de soja. Esses também se fazem presentes em fórmulas de alimentação infantil e nutrição enteral^{5,6}.

A soja tem sido destacada na prevenção do câncer, de doenças cardiovasculares, como antioxidante e como fonte proteica para dietas enterais. O uso nessas dietas está associado ao alto valor nutritivo, boa tolerância e baixo custo. No entanto, deve existir atenção quanto à segurança desses alimentos, pois os organismos desses pacientes já estão debilitados em função da doença existente⁷.

Araújo e Menezes⁸ apresentam, em seu estudo, o desenvolvimento de duas formulações com o extrato hidrossolúvel de soja na sua composição para ser usado na nutrição enteral⁸. Barros e colaboradores⁶, em estudo investigativo, relatam que existe um intenso uso da proteína de soja em muitos alimentos, inclusive em fórmulas infantis e de nutrição enteral⁶. Segundo o estudo realizado por Cortez e colaboradores⁹, bebidas ou sucos à base de extrato de soja foram considerados uma boa alternativa na alimentação em substituição ao leite de vaca por pediatras e nutricionistas vinculados a hospitais públicos do Município de São Paulo no ano de 2005⁹.

Atualmente, o Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja, atrás apenas dos Estados Unidos. Na safra de 2013/2014, a produção nacional foi de 85,656 milhões de toneladas com 30,135 milhões de hectares em área plantada. A produção esperada para 2015 é de aproximadamente 95 milhões de toneladas com 31 milhões de hectares em área plantada¹⁰. O Mato Grosso é o estado brasileiro maior produtor com 87,7% da produção nacional e 28,6% da área colhida^{11,12}.

A crescente produção de soja no Brasil, de quase 260 vezes, no transcorrer de apenas quatro décadas determinou uma cadeia de mudanças sem precedentes na história do país. Junto com o trigo, foi esta leguminosa a grande responsável pelo surgimento da agricultura comercial no Brasil e, também, pela modificação e pelo enriquecimento da dieta alimentar dos brasileiros¹³.

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Soja (EMBRAPA SOJA) iniciou em 1985 um programa para incentivar a utilização de soja na alimentação humana. Este promove atividades de desenvolvimento de novas tecnologias, diferentes receitas, publicação de livros e folhetos informativos sobre os mais variados assuntos referentes à soja na alimentação¹⁴.

O Brasil atua como o maior consumidor de agrotóxicos do mundo com um consumo de 700 mil toneladas, gerando uma receita anual de US\$ 7 bilhões¹⁵.

A grande e crescente utilização dessas substâncias tem gerado uma série de preocupações no que se refere à contaminação dos alimentos e aos danos causados à saúde. Atualmente, estudos científicos vêm detectando a presença de resíduos de agrotóxicos em: amostras de sangue humano, no leite materno e em alimentos em geral consumidos pela população brasileira¹⁶.

É estabelecido para cada agrotóxico, o limite máximo de resíduo permitido (LMR), que corresponde à quantidade máxima da substância ativa ou afim, oficialmente aceita no alimento, em decorrência da aplicação adequada numa fase específica, desde sua

produção até o consumo, expresso em partes (em peso) por milhão de partes de alimento (em peso) (mg.kg^{-1})¹⁷.

Na literatura mundial, os agrotóxicos de acordo com a classe química a que pertencem e ao tipo de exposição, têm sido relacionados a diversos efeitos nocivos à saúde. Podendo causar desde dermatites até alguns tipos de cânceres¹⁸. Dentre outros principais efeitos nocivos destacam-se, a teratogenicidade, a desregulação endócrina, a neurotoxicidade, os efeitos adversos na reprodução humana e no sistema imunológico¹⁹.

A Lei nº 9.974, de 6 de junho de 2000, que altera a Lei de Agrotóxicos e Afins nº 7.802, de 11 de julho de 1989, estabelece que os agrotóxicos somente podem ser utilizados no país se forem registrados em órgão federal competente, de acordo com as diretrizes e exigências dos órgãos responsáveis pelos setores da saúde, do meio ambiente e da agricultura²⁰.

Os três órgãos envolvidos no registro de agrotóxicos: Ministério da Saúde (MS), Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e Ministério do Meio Ambiente, através do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), têm suas competências estabelecidas no Decreto nº 4.074¹⁷, de janeiro de 2002 que regulamentou a lei de agrotóxicos¹⁷.

Dentre outras competências, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), na representação do MS, é responsável pela avaliação e classificação toxicológica dos agrotóxicos e, junto com o MAPA, pelo monitoramento dos resíduos de agrotóxicos e afins em produtos de origem vegetal.

Os agrotóxicos permitidos relacionados a diferentes culturas, para uso no país, estão definidos nas monografias autorizadas pela ANVISA após o resultado da avaliação e reavaliação toxicológica dos ingredientes ativos destinados ao uso agrícola, domissanitário e não agrícola como ambientes aquáticos e preservante de madeira²¹.

Com o objetivo de avaliar os níveis de resíduos de agrotóxicos em alimentos, a ANVISA, em 2001, iniciou um programa denominado

Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos (PARA). Com base nos resultados desse monitoramento ao longo dos anos, os principais problemas encontrados são a presença de agrotóxicos em níveis acima do LMR e a utilização de agrotóxicos não autorizados (NA) para a cultura¹⁵.

O MAPA, em 31 de dezembro de 2008, através da Instrução Normativa nº 42²², instituiu o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Vegetal (PNCRC/Vegetal). Este programa tem por objetivo a inspeção e a fiscalização, com o controle dos fatores de qualidade e a segurança higiênico-sanitária dos produtos de origem vegetal, seus subprodutos e derivados de valor econômico. Os resultados desse monitoramento são publicados anualmente no Diário Oficial da União (DOU), especificados por Unidade Federativa e apontam os mesmos problemas encontrados no monitoramento do PARA²².

O IBAMA, que é o responsável em analisar as implicações do agrotóxico no meio ambiente, publicou um novo instrumento de gestão pública e informação para a sociedade sobre quais são os produtos mais usados, onde estão sendo comercializados e os índices de toxicidade ao meio ambiente dos princípios ativos autorizados. O relatório é uma obrigatoriedade legal estabelecida no artigo nº 41 do Decreto nº 4.074 de 2002^{17,23}.

Segundo o primeiro relatório, o glifosato e seus sais, a cipermetrina, o óleo mineral, o óleo vegetal, o enxofre, o 2,4-D, a atrazina, o metamidofós, o acefato e o carbendazim foram os 10 ingredientes ativos (IA) mais comercializados no Brasil em 2009 em ordem decrescente respectivamente, e representaram 76,45% do total comercializado²⁴.

A problemática da utilização de agrotóxicos na agricultura no Brasil pode ser separada em duas situações: a primeira refere-se à presença de resíduos de agrotóxicos não autorizados para a cultura, mas com o ingrediente ativo (IA) permitido para outras culturas, e a segunda refere-se à presença de resíduos de agrotóxicos proibidos no Brasil ou que nunca foram registrados no país.

Esta última situação é a de maior gravidade para a saúde pública, visto que não existem estudos toxicológicos sobre seus efeitos, registrados e reconhecidos pelos órgãos regulamentadores nacionais.

O programa PARA, realizado pela ANVISA desde 2001, não contempla a soja e os alimentos à base de soja. Já o plano PNCRC/Vegetal realizado pelo MAPA agrega apenas a soja em grãos como objeto de ação e nem sempre as análises previstas são realizadas assim como evidenciado em seus resultados publicados anualmente. Com relação aos ingredientes ativos mais utilizados descritos no relatório do IBAMA²⁴, sete (glifosato e seus sais, cipermetrina, enxofre, 2,4-D, metamidofós, acefato e carbendazim) são permitidos para o uso na cultura da soja que foi considerada uma das principais culturas pelo IBGE em 2014¹⁰.

Considerando-se o número de agrotóxicos utilizados na prática agrícola, os métodos de análise empregados atuam na determinação simultânea de diversos analitos compreendidos em distintas classes em apenas uma análise. Estes métodos são denominados “multirresíduos”²⁵.

O método multirresíduo denominado QuEChERS (“Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe”) tem como vantagens o fato de ser rápido, fácil, econômico, efetivo, robusto e seguro. Diversas modificações foram realizadas ao longo do tempo desde seu desenvolvimento em 2003 por Anastassiades e colaboradores²⁶. Estas modificações possuem o objetivo de ter aplicação em diversas matrizes, com altos percentuais de recuperação (>85%) de substâncias de diferentes polaridades e volatilidades e redução da quantidade de solventes orgânicos utilizados²⁷.

Em virtude das diversas classes de agrotóxicos permitidos com diferentes características físico-químicas, várias técnicas analíticas vêm sendo desenvolvidas com o objetivo de se obter uma maior velocidade de resposta e resultados analíticos confiáveis e com rastreabilidade.

A espectrometria de massas em conjunto com a separação cromatográfica é

uma técnica analítica de grande importância para a identificação de substâncias presentes em uma amostra. Ela fornece o tempo de retenção, a relação massa/carga (m/z) e informações sobre a abundância dos íons da fragmentação das substâncias ionizadas²⁸.

A técnica cromatográfica está entre os principais métodos físico-químicos de separação, especialmente em análises de substâncias presentes em matrizes complexas, como os alimentos, por apresentar alto grau de precisão e resposta. Agrotóxicos voláteis e estáveis termicamente são determinados por cromatografia gasosa com detectores seletivos²⁹.

No entanto, a nova geração de agrotóxicos que vem surgindo das classes das carboxiamidas, quinazolininas, pirimidinas, tiazóis, carbamatos, neonicotinóides e morfolinas são pouco voláteis, termolábeis e polares e por isso a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLAE-EM) ou “High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry” (HPLC-MS) é a técnica que vem sendo aplicada com sucesso para determinação dessas classes de substâncias em diferentes matrizes assim como em alimentos³⁰.

O desenvolvimento e o posterior aprimoramento das técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência e a espectrometria de massas sequencial representam um grande avanço da tecnologia e inovação na área da química analítica. Essa técnica possui características apropriadas para a análise de resíduos de agrotóxicos devido a sua grande sensibilidade, rapidez de análise e, principalmente, por fornecer a identidade das substâncias analisadas, ou seja, é também uma técnica de confirmação³⁰.

Em vista do aumento da utilização da soja e seus derivados na alimentação humana com ênfase em populações específicas como crianças, pessoas debilitadas, homens, mulheres e idosos, torna-se importante a avaliação desses alimentos quanto à contaminação de resíduos de agrotóxicos. Esta importância se refere à garantia do direito do consumidor às informações confiáveis a cerca dos alimentos comercializados.

Nesse contexto, o desenvolvimento do estudo teve por finalidade avaliar a situação atual do consumo desses alimentos disponíveis no mercado em relação à presença destes resíduos.

MATERIAL E MÉTODOS

Equipamento

Neste estudo, foi utilizado um cromatógrafo líquido de ultra eficiência (Waters, EUA) modelo ACQUITY UPLC™ equipado com um sistema binário de bombas, injetor automático, degaseificador e forno para a coluna. A coluna utilizada para a separação cromatográfica foi a de fase reversa, Alltima™ C₁₈, com 5 µm de tamanho de partícula, 3,2 mm de diâmetro interno e 150 mm de comprimento (Grace, EUA). A pré-coluna utilizada foi o cartucho Security Guard C₁₈, com 4 mm de diâmetro interno e 3 mm de comprimento (Phenomenex, EUA). Foi utilizado o detector de massas sequencial (Waters, EUA), modelo Quattro Premier XE™, equipado com uma fonte de ionização Electrospray Ionization (ESI) (Z-Spray™), operando no modo positivo e estação de trabalho MassLynx™ Versão 4.1.

Condições Operacionais

As condições operacionais utilizadas no cromatógrafo líquido foram o volume de injeção de 5 µL, a vazão da fase móvel constante de 0,3 mL.min⁻¹, a temperatura do forno da coluna constante de 40°C, a temperatura do compartimento das amostras constante de 8 °C e o tempo total de corrida de 38 min. Na eluição por gradiente, as fases móveis utilizadas no estudo foram a fase denominada A, composta por formato de amônio 5 x 10⁻³ mol.L⁻¹ com 10% de metanol e a fase denominada B, composta por metanol.

As condições operacionais utilizadas no espectrômetro de massas sequencial foram voltagem do capilar de 0,98 kV, temperatura da fonte ESI⁺ em 120 °C, a temperatura do gás de dessolvatação (N₂) de 400 °C, o fluxo do gás do cone (N₂) de 50 L.h⁻¹, o fluxo do gás de dessolvatação (N₂) de 800 L.h⁻¹ e a pressão do gás de colisão (Argônio) de 3,5 x 10⁻³ mbar.

Outros Equipamentos Utilizados

Outros equipamentos utilizados para a realização do trabalho foram: balanças analíticas modelos XP205 e AG245 (precisão de 5 casas decimais) fabricante Mettler Toledo (EUA), agitador modelo MS3 Digital e processador de sólidos modelo M20 fabricante IKA (EUA), banho ultrassom modelo 2510RMTM fabricante Branson Ultrasonics (EUA), centrífuga modelo T16 fabricante Beckman, liquidificador industrial modelo 36BL55 fabricante Ametek (EUA) e unidade de evaporação com fluxo de nitrogênio modelo ReactiTherm III ReactiVap III fabricante Thermo Fisher Cientific (EUA).

Os gases utilizados para o estudo foram o nitrogênio e o argônio com pureza maior que 99,995 % e 99,999 %, respectivamente.

Reagentes, solventes, soluções e acessórios

Os reagentes e solventes utilizados para o desenvolvimento do trabalho foram o acetato de etila grau resíduo, o acetato de sódio grau para análise, a acetona grau resíduo e o ácido acético glacial grau cromatografia líquida, fornecidos pela TEDIA (EUA), a acetonitrila grau cromatografia líquida, o formato de amônio grau para análise e o sulfato de magnésio anidro grau para análise, fornecidos pela Sigma-Aldrich (EUA), a água desionizada, o detergente Extran® alcalino grau para análise, fornecido pela Merck (EUA), o metanol grau espectrometria de massas, fornecido pela JT Baker (EUA), a amina primária- secundária (“primarysecondaryamine” – PSA) grau para análise, fornecida pela Varian (EUA). A unidade filtrante, fornecida pela Millex (EUA), utilizada possuía as seguintes especificações: unidade filtrante GV em polietileno com membrana Durapore® com 0,22 µm de poro, 13 mm, não estéril. As soluções estoques dos agrotóxicos foram preparadas a partir dos padrões de agrotóxicos adquiridos do Dr. Ehrenstofer (Alemanha), com certificado de análise e grau de pureza superior a 95 %, diluídos em acetato de etila e metanol dependendo da solubilidade de cada substância.

As soluções estoque foram preparadas na concentração nominal de 100 µg.mL⁻¹, de acordo com a pureza definida no seu certificado

e a aplicação pretendida. A partir dessas soluções foi preparada uma mistura na concentração nominal de $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Com essa mistura foram preparadas todas as soluções de trabalho nas seguintes concentrações nominais: 0,002; 0,004; 0,008; 0,01; 0,02; 0,04; 0,08; 0,1 e $0,2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Validação do método

Foram selecionadas cento e quarenta e quatro substâncias para a validação do método de acordo com a utilização permitida na cultura da soja, a disponibilidade do laboratório e a aplicação na técnica de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial.

O método foi validado para a determinação de 122 substâncias (85 % do total) na matriz soja e 124 (86 % do total), na matriz extrato solúvel de soja.

Amostras

Foram selecionadas para a realização do estudo, quarenta e duas amostras de soja e à base de soja. Dentre elas, cinco amostras de soja em grãos, seis de farinha de soja, onze de proteína de soja, duas de fórmula infantil à base de proteína isolada de soja, nove de extrato líquido de soja e nove de extrato em pó de soja. As amostras foram adquiridas no período de 2011 a 2012, em estabelecimentos comerciais na região metropolitana do Rio de Janeiro.

Análise

A Figura 1 apresenta o método QuEChERS acetato utilizado para análise das amostras sólidas e a Figura 2 apresenta o método utilizado para as amostras líquidas.

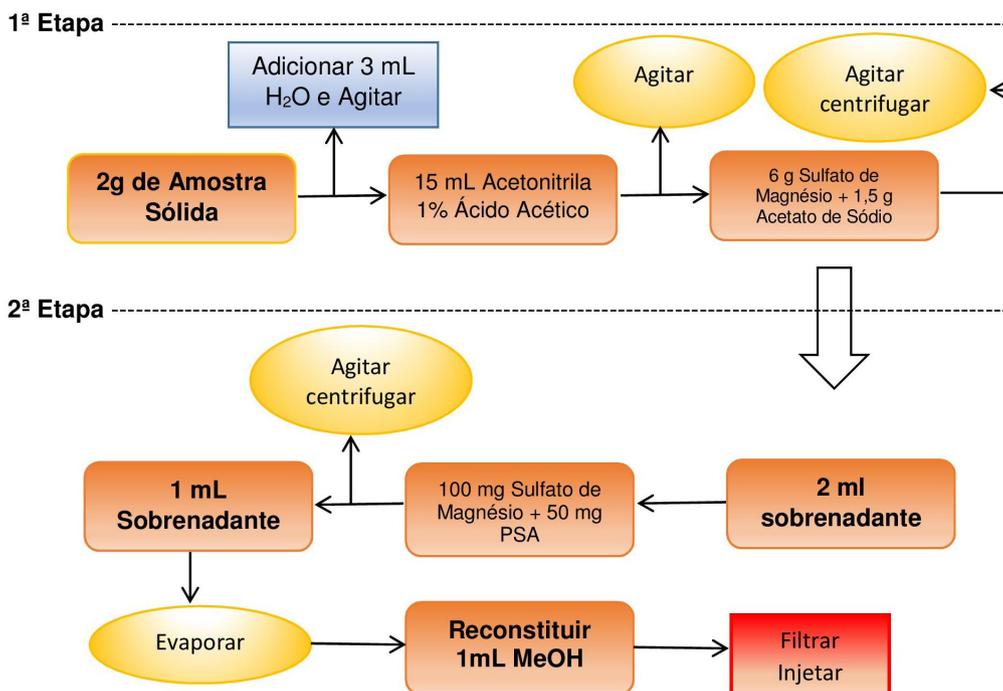


Figura 1. Método QuEChERS acetato utilizado para a extração das amostras sólidas

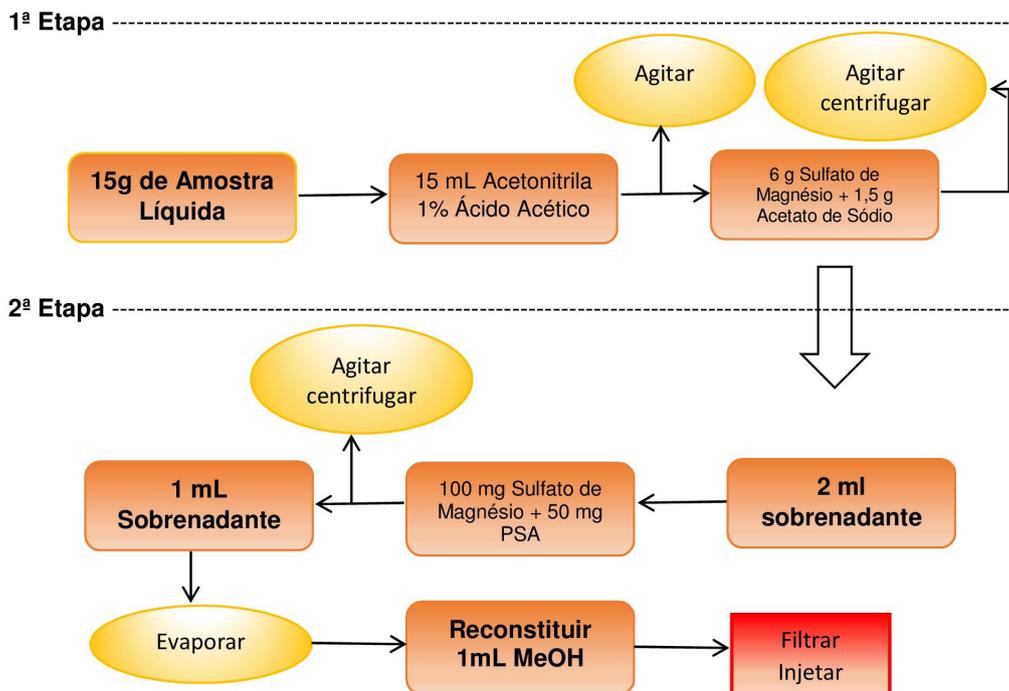


Figura 2. Método QuEChERS acetato utilizado para a extração das amostras líquidas

Parâmetros definidos no processo da validação para avaliação dos resultados das amostras

A confirmação da presença de uma substância em uma amostra de acordo com o DG SANCO²⁸ é garantida segundo o atendimento a alguns critérios. O tempo de retenção (TR) da substância na amostra não deve ultrapassar uma tolerância de $\pm 2,5\%$ do tempo de retenção da substância no padrão analítico, a razão da intensidade do íon selecionado para confirmação em relação ao íon selecionado para quantificação deve possuir uma tolerância permitida de $\pm 30\%$ e deve existir a presença confirmada de dois íons da fragmentação da substância na amostra. Estes parâmetros foram definidos para 122 substâncias (85 % do total) estudadas na matriz soja e 124 (86 % do total) na matriz extrato solúvel de soja.

RESULTADOS

Validação do método

As curvas analíticas estudadas nas duas matrizes apresentaram $R^2 \geq 0,95$ (matriz soja de 0,9643 a 0,9999 e matriz extrato solúvel de soja de 0,9616 a 0,9974) e $r \geq 0,98$ (matriz soja de 0,9820 a 1,0000 e matriz extrato solúvel de soja de 0,9806 a 0,9987), regressão linear significativa ($p < 0,001$) e homogeneidade dos resíduos ($\alpha = 0,05$) na faixa de trabalho estudada (0,002 a 0,200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Quanto ao efeito matriz, foi observado que trinta e cinco (24 %) substâncias possuíam tal interferência para a matriz soja e cinco (3 %) para a matriz extrato solúvel de soja. A exatidão e precisão em dois níveis de fortificação (matriz soja de 0,01 e 0,2 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ e matriz extrato solúvel de soja de 0,01 e 0,03 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) apresentaram valores

de 70 a 119 % de recuperação e CV(%) 1 a 18 dentro dos critérios estabelecidos de 70 a 120 % de recuperação e CV(%) ≤ 20 para as duas matrizes. Os limites de quantificação apresentaram resultados satisfatórios (0,005 a 0,215 mg.kg⁻¹ matriz soja e 0,006 a 0,028 mg.kg⁻¹ matriz extrato solúvel de soja) em relação aos LMRs quando existentes. O limite de quantificação foi definido como sendo a menor concentração adicionada na matriz que obteve resultado satisfatório para os parâmetros de linearidade, exatidão, precisão e uma relação S/R maior que 10.

Parâmetros definidos no processo da validação para avaliação dos resultados das amostras

Na Tabela 1 encontram-se relacionados os resultados para oito substâncias na matriz soja e na Tabela 2 para a matriz extrato solúvel de soja.

Análise das amostras

Na Tabela 3 encontram-se os resultados encontrados nas amostras.

Do universo de quarenta e duas amostras analisadas, foram encontrados resultados positivos de resíduos de agrotóxicos confirmados em 28 amostras (67 % do total de amostras). Destas vinte e oito amostras, três são líquidas (11 %) e o restante é sólido (89 %). Dentre as amostras sólidas, foram encontrados resíduos de agrotóxicos nas fórmulas infantis à base de proteína isolada de soja com ferro para lactentes. Este produto contém a proteína isolada de soja como um dos seus principais ingredientes.

Foram encontrados resíduos de carbendazim em 18 amostras, de pirimifós-metilico em 10 amostras, de ciprodinil em 7 amostras, de butóxido de piperonila em 2 amostras,

Tabela 1. Parâmetros de acordo com os critérios DG SANCO²⁸(2011) para oito substâncias validadas na matriz soja

Nº	Substância	Equação de Regressão		Média TR (min)	± 2,5% do TR (min) Permitido	Média Razão de Íons	Tolerância Permitida (%)	± Razão de Íons Permitido	LQ (mg.kg ⁻¹)	LMR Soja (mg.kg ⁻¹) ²¹
		a Coefic. Linear	b Coefic. Angular							
1	Carbendazim	7527	5441	10,24	0,26	7,00	30	2,10	0,010	0,50
2	Ciazofamida	-6512	1943	15,74	0,39	10,59	30	3,18	0,011	P
3	Ciprodinil	-6363	3655	17,31	0,43	1,09	30	0,33	0,010	P
4	Butóxido de Piperonila	42645	21680	18,39	0,46	3,57	30	1,07	0,010	NR
5	Piraclostrobina	-21332	6081	16,85	0,42	0,73	30	0,22	0,010	0,10
6	Pirimifós-Metilico	-6847	7465	17,31	0,43	1,43	30	0,43	0,010	P
7	Tetraconazol	134	2963	15,50	0,39	1,76	30	0,53	0,005	0,10
8	Triazofós	-28735	13600	15,40	0,39	4,22	30	1,27	0,010	0,02

Legenda: NR: Substância que não possui registro no país; P: Substância permitida para outras culturas e não permitida para a soja

Tabela 2. Parâmetros de acordo com os critérios DG SANCO²⁸ (2011) para oito substâncias validadas na matriz extrato solúvel de soja

Nº	Substância	Equação de Regressão		Média TR (min)	± 2,5% do TR (min) Permitido	Média Razão de Íons	Tolerância Permitida (%)	± Razão de Íons Permitido	LQ (mg.kg ⁻¹)	LMR Soja (mg.kg ⁻¹) ²¹
		a Coefic. Linear	b Coefic. Angular							
1	Carbendazim	12486	4841	10,25	0,26	6,98	30	2,09	0,013	0,50
2	Ciazofamida	1055	1400	15,74	0,39	11,15	30	3,34	0,014	P
3	Ciprodinil	7790	2597	17,31	0,43	1,12	30	0,34	0,013	P
4	Butóxido de Piperonila	56195	20821	18,40	0,46	3,65	30	1,09	0,014	NR
5	Piraclostrobina	-380	4719	16,85	0,42	0,75	30	0,22	0,013	0,10
6	Pirimifós-Metilico	5387	5681	17,31	0,43	1,42	30	0,43	0,013	P
7	Tetraconazol	3645	2338	15,50	0,39	1,64	30	0,49	0,006	0,10
8	Triazofós	25913	8673	15,40	0,39	4,21	30	1,26	0,013	0,02

Legenda: NR: Substância que não possui registro no país; P: Substância permitida para outras culturas e não permitida para a soja

Tabela 3. Resultados encontrados nas amostras

Descrição do Rótulo	Identificação Amostras	Substância	Concentração (mg.kg ⁻¹)	LMR Soja (mg.kg ⁻¹) ²¹	Resultado Amostra
Alimento com soja e polpa de manga	X	Carbendazim	0,042	0,50	Satisfatório Concentração < LMR
Alimento com soja rico em vitaminas e cálcio	A	Ciprodinil	0,025	P	Insatisfatório
	A	Tetraconazol	0,010	0,10	Presença de Ciprodinil
Alimento com soja sabor manga	W	Carbendazim	0,022	0,50	Satisfatório Concentração < LMR
	F	Ciazofamida	0,491	P	
Extrato de soja concentrado	F	Ciprodinil	0,026	P	Insatisfatório
	F	Piraclostrobina	0,032	0,10	Presença de Ciazofamida e Ciprodinil
	F	Tetraconazol	0,033	0,10	
	F	Triazofós	0,020	0,02	
Extrato de soja isento de lactose e colesterol	R	Piraclostrobina	0,029	0,10	Insatisfatório
	R	Pirimifós-Metílico	0,031	P	Presença de Pirimifós-Metílico
Extrato de soja	J	Carbendazim	0,102	0,50	Satisfatório Concentração < LMR
Extrato de soja. Pó para preparo de bebida à base de soja	M	Pirimifós-Metílico	0,015	P	Insatisfatório Presença de Pirimifós-Metílico
	K	Carbendazim	0,207	0,50	Insatisfatório
Farinha de soja torrada integral	K	Butóxido de Piperonila	0,125	NR	Presença de Butóxido de Piperonila e Pirimifós-Metílico
	K	Pirimifós-Metílico	1,331	P	
	S	Carbendazim	0,037	0,50	Insatisfatório
Farofa à base de soja	S	Ciprodinil	0,063	P	Presença de Ciprodinil e Pirimifós-Metílico
	S	Pirimifós-Metílico	0,068	P	
	AB	Carbendazim	0,072	0,50	Satisfatório
Farofa de soja	AB	Carbendazim	0,072	0,50	Concentração < LMR
Farofa pronta de soja	V	Carbendazim	0,019	0,50	Satisfatório
Fibra de soja	Y	Carbendazim	0,017	0,50	Concentração < LMR
Fórmula infantil à base de proteína isolada de soja	G	Carbendazim	0,151	0,50	Insatisfatório
	G	Ciprodinil	0,041	P	Presença de Ciprodinil
Fórmula infantil à base de proteína isolada de soja	B	Carbendazim	0,246	0,50	Satisfatório
	H	Butóxido de Piperonila	0,070	NR	Concentração < LMR Insatisfatório
	H	Pirimifós-Metílico	0,694	P	Presença de Butóxido de Piperonila e Pirimifós-Metílico
Leite de soja - extrato de soja	O	Ciprodinil	0,035	P	Insatisfatório
Pó para preparo de bebida à base de extrato de soja	C	Ciprodinil	0,027	P	Presença de Ciprodinil
	L	Carbendazim	0,133	0,50	Insatisfatório
Proteína de soja fina escura	L	Ciprodinil	0,034	P	Presença de Ciprodinil
	N	Carbendazim	0,015	0,50	Insatisfatório
Proteína de soja texturizada média	N	Pirimifós-Metílico	0,011	NR	Presença de Pirimifós-Metílico
	P	Carbendazim	0,021	0,50	Satisfatório
Proteína texturizada de soja fina (PVT ou PTS)	P	Carbendazim	0,021	0,50	Concentração < LMR
Proteína texturizada de soja fina (PVT ou PTS)	Q	Pirimifós-Metílico	0,018	P	Insatisfatório
	D	Carbendazim	0,022	0,50	Presença de Pirimifós-Metílico
Proteína texturizada de soja fina escura	D	Carbendazim	0,022	0,50	Satisfatório
Proteína texturizada de soja fina escura	I	Pirimifós-Metílico	0,075	P	Concentração < LMR Insatisfatório
	T	Carbendazim	0,239	0,50	Presença de Pirimifós-Metílico
Proteína texturizada de soja fina escura	Z	Carbendazim	0,151	0,50	Satisfatório
	Z	Pirimifós-Metílico	0,013	P	Concentração < LMR Insatisfatório
Proteína texturizada de soja granulada	U	Carbendazim	0,035	0,50	Presença de Pirimifós-Metílico
	AA	Carbendazim	0,356	0,50	Satisfatório
Salgadinho de soja natural	AA	Carbendazim	0,356	0,50	Concentração < LMR
Soja partida descascada	E	Pirimifós-Metílico	0,071	P	Insatisfatório
					Presença de Pirimifós-Metílico

Legenda: NR: Substância que não possui registro no país; P: Substância permitida para outras culturas e não permitida para a soja

de piraclostrobina em 2 amostras, de tetraconazol em 2 amostras, de ciazofamida em 1 amostra e de triazofós também em uma amostra.

O resultado foi satisfatório para 12 amostras (43 % do total de 28 amostras) em relação a presença de resíduos de agrotóxicos confirmados. Apenas um resíduo, de carbendazim, foi encontrado nessas amostras e a concentração encontrada estava abaixo do LMR (LMR 0,5 mg.kg⁻¹)²¹. Doze amostras foram insatisfatórias pela presença de apenas um resíduo não permitido para a cultura da soja (5 amostras com ciprodinil e 7 amostras com pirimifós-metílico). E quatro amostras foram insatisfatórias pela presença de 2 resíduos não permitidos (ciazofamida e ciprodinil em 1 amostra, ciprodinil e pirimifós-metílico em 1 amostra e butóxido de piperonila e pirimifós-metílico em 2 amostras).

Das 28 amostras analisadas, foram encontrados pelo menos um resíduo de agrotóxico, dentro no escopo estudado, em 18 amostras (64 % do total), dois resíduos de agrotóxicos em 7 amostras (25 % do total), três resíduos de agrotóxicos em 2 amostras (7 % do total) e cinco resíduos de agrotóxicos em apenas 1 amostra (4 % do total).

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Com esse estudo foi possível evidenciar a presença de diferentes resíduos de agrotóxicos como o ciprodinil (não permitido), o tetraconazol (permitido), o carbendazim (permitido), o pirimifós-metílico (não permitido), a ciazofamida (não permitido), a piraclostrobina (permitido), o triazofós (permitido) e o butóxido de piperonila (não registrado) nas amostras avaliadas de alimento com soja, extrato de soja, farinha de soja, farofa à base de soja, fibra de soja, fórmula infantil à base de proteína isolada de soja, grãos de soja, proteína de soja, proteína texturizada de soja e salgadinho de soja.

O fungicida ciprodinil, da classificação toxicológica III, encontrado em sete amostras, inclusive em uma das fórmulas infantis, não é permitido para o uso na cultura da soja, porém, é permitido para batata (0,05 mg.kg⁻¹),

para cebola (0,05 mg.kg⁻¹), para maçã (1 mg.kg⁻¹) e para o tomate (0,5 mg.kg⁻¹)²¹. Segundo a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da América (*US Environmental Protection Agency – US EPA*), em estudos realizados com exposição ao ciprodinil, não há evidências de efeitos mutagênicos ou carcinogênicos³¹.

O tetraconazol encontrado em duas amostras, porém com concentrações abaixo do LMR de 0,1 mg.kg⁻¹²¹, é classificado pelo US EPA como possível carcinogênico ao homem, com base na ocorrência de tumores do fígado de camundongos machos e fêmeas. O fígado e os rins são os principais órgãos alvo do tetraconazol³².

O carbendazim, agrotóxico mais encontrado nas amostras, inclusive no extratos solúveis de soja e nas duas fórmulas infantis, causa aberrações cromossômicas e desregulação endócrina do sistema reprodutivo masculino de ratos³³. Segundo a Organização Mundial da Saúde – OMS (*World Health Organization – WHO*), a exposição ao carbendazim aumentou a incidência de tumores hepáticos benignos e malignos em ambos os sexos de camundongos durante um estudo de dois anos. Foi observado também um aumento de má formação e anomalias em ratos. Não foi observado efeito mutagênico nos estudos relacionados³⁴. De acordo com o relatório do IBAMA²⁴, o carbendazim é o 3º ingrediente ativo (IA) que possui mais marcas comerciais (produtos formulados) com ação fungicida. O carbendazim está entre um dos cinco ingredientes ativos (IA) mais comercializados no estado do Amapá²⁴.

O organofosforado pirimifós-metílico, da classificação toxicológica III, encontrado em dez amostras também não é permitido para a cultura da soja, mas é permitido para as culturas de alface (5 mg.kg⁻¹), arroz (10 mg.kg⁻¹), cevada (10 mg.kg⁻¹), citros (5 mg.kg⁻¹), couve (2 mg.kg⁻¹), feijão (0,5 mg.kg⁻¹), feijão-vagem (0,5 mg.kg⁻¹), milho (10 mg.kg⁻¹) e trigo (10 mg.kg⁻¹ e farinha 5 mg.kg⁻¹)²¹. A ingestão diária aceitável (IDA) é de 0,03 mg.kg⁻¹ por peso corpóreo (p.c.)²¹. Este também pode ser empregado como domissanitário²¹. A maior concentração de pirimifós-metílico encontrada foi de 1,3 mg.kg⁻¹. Segundo a OMS,

não há evidências de atividade carcinogênica, mutagênica ou neurotóxica nos estudos conduzidos para o pirimifós-metilico³⁵.

O fungicida ciazofamida, da classificação toxicológica III e IDA de 0,17 mg.kg⁻¹ p.c.²¹, foi encontrado em apenas uma amostra, embora não seja permitido para a cultura de soja. Ele é permitido para alface (0,2 mg.kg⁻¹), batata (0,05 mg.kg⁻¹), cebola (0,1 mg.kg⁻¹), melão (0,1 mg.kg⁻¹), tomate (0,05 mg.kg⁻¹) e uva (0,5 mg.kg⁻¹)²¹. E também é permitido para uso não alimentar no cultivo de rosa²¹. Lesões de pele, que podem ter origem de uma alergia sistêmica, foram observadas nos camundongos machos em um estudo de carcinogenicidade, com duração de 18 meses, com a ciazofamida. Porém não há evidência de que a ciazofamida possa ser carcinogênica, tal como indicado em estudos de carcinogenicidade com ratos e camundongos. O US EPA classifica a ciazofamida como não provável de ser carcinogênica para os seres humanos³⁶.

A piraclostrobina é permitida para a soja na concentração de 0,1 mg.kg⁻¹ ²¹ e foi encontrada em duas amostras com resultados abaixo do LMR. Estudos *in vitro* e em um ensaio *in vivo* com a piraclostrobina apresentaram resultados negativos de genotoxicidade em camundongos. Foi estudado ainda o potencial carcinogênico em ratos e camundongos. Com base nos resultados do teste e na ausência de genotoxicidade, a piraclostrobina foi considerada suscetível de apresentar um risco carcinogênico para o homem³⁷. A piraclostrobina está em 8º lugar dentre os dez ingredientes ativos (IA) mais comercializados com ação fungicida e, também, é o 9º ingrediente ativo (IA) que possui mais marcas comerciais (produtos formulados) com ação fungicida²⁴. A piraclostrobina está entre um dos cinco ingredientes ativos (IA) mais comercializados no estado de Roraima²⁴.

O triazofós é permitido na concentração de 0,02 mg.kg⁻¹ ²¹ para a cultura da soja e este foi encontrado em apenas uma amostra, com resultado abaixo do LMR. O triazofós não possui efeito carcinogênico em ratos e camundongos³⁸.

O butóxido de piperonila não é registrado na ANVISA²¹ como agrotóxico, porém na Comunidade Europeia pertence à categoria dos sinérgicos, que são substâncias que potencializam a ação de outros agrotóxicos. Essa substância foi encontrada em duas amostras na concentração de 0,07 e 0,1 mg.kg⁻¹. A U.S. EPA classifica o butóxido de piperonila dentro do grupo C, como possível agente carcinogênico ao homem. Em um estudo crônico/carcinogênico em ratos, foram observados efeitos carcinogênicos positivos. Não foram observados efeitos mutagênicos ou neurotóxicos nos estudos conduzidos³⁹.

Os LMRs são permitidos apenas para a soja em grãos e não existem limites para os diferentes tipos de alimentos a base de soja que são consumidos em quantidades e formas distintas, fato esse que deve ser avaliado como indicado no presente estudo.

Os resíduos de agrotóxicos encontrados permitidos para o uso na cultura da soja estavam todos abaixo dos LMRs. No entanto, também foram encontrados resíduos de agrotóxicos não permitidos, o que se torna preocupante, pois não existem estudos que possibilitem assegurar a ausência de risco com relação ao consumo desses alimentos com esses resíduos para a população.

Outra preocupação está na presença de resíduos de carbendazim e ciprodinil em fórmulas infantis, visto que não existem limites estabelecidos na legislação nacional para essa faixa etária da população e a IDA quando existente é calculada para um indivíduo de 60 kg.

A presença de substâncias não permitidas para o uso na cultura da soja em amostras de alimentação infantil evidencia o impacto do uso indevido de agrotóxicos no país e alerta para os riscos ao quais esses indivíduos estão sendo expostos.

Os diferentes monitoramentos governamentais não contemplam os alimentos à base de soja, apenas a soja em grãos. E apenas o monitoramento do MAPA agrega este produto de origem vegetal no monitoramento que por razões diversas em determinadas situações não cumpre com a meta estabelecida da

quantidade de amostras analisadas. A presença de resíduos de agrotóxicos não permitidos para a cultura da soja representa um desrespeito à legislação vigente. Essa evidência sugere a necessidade da execução de monitoramentos pelos órgãos reguladores, não só aplicados aos grãos de soja, mas também, extensivo aos alimentos à base de soja.

No Brasil, esforços vêm sendo feitos para o controle da presença de resíduos nos alimentos. Essa é uma problemática que envolve o consumo interno e externo desses alimentos. O estabelecimento de limites e a permissão do uso dessas substâncias para promover um sucesso na produção agrícola não pode negligenciar a faixa etária de toda a população consumidora e os riscos associados à toxicidade de cada substância.

REFERÊNCIAS

1. Vieira CR, Cabral LC, Paula ACO. Composição centesimal e conteúdo de aminoácidos, ácidos graxos e minerais de seis cultivares de soja destinada à alimentação humana. *Pesq Agropec Bras*. 1999;34(7):1277-83. [DOI:10.1590/S0100-204X1999000700021].
2. Brandsch C, Shukla A, Hirche F, Stangl GI, Eder K. Effect of proteins from beef, pork, and turkey meat on plasma and liver lipids of rats compared with casein and soy protein. *Nutrition*.2006; 22:1162-70. [DOI: 10.1016/j.nut.2006.06.009].
3. Roeytenberg A, Cohen T, Freund HR, Hanani M. Cholinergic properties of soy. *Nutrition*.2007; 23:681-6. [DOI: 10.1016/j.nut.2007.06.004].
4. Albertazzi P. Clinical use of soy products. *Int Congr Series*.2002; 1229:189-93. [DOI: 10.1016/S0531-5131(01)00488-5].
5. Philippi ST. *Nutrição e Técnica Dietética*. 1 ed. Barueri: Manole; 2003.
6. Barros NEF, Oliveira EMM, Silva OE, Silva JT, Paschoalin VMF. Avaliação qualitativa e quantitativa de soja geneticamente modificada em fórmulas de nutrição enteral. *Rev Nutr*.2010;23(1):37-47. [DOI: 10.1590/S1415-52732010000100006].
7. Monteiro JBR, Costa NMB, Esteves EA, Milagres KH. Avaliação da qualidade proteica de dois formulados em pó, a base de soja enriquecidos com zinco, selênio e magnésio para utilização em nutrição enteral. *Ciênc Tecnol Aliment*.2004;24(1):6-10. [DOI:10.1590/S0101-20612004000100002].
8. Araújo EM, Menezes HC. Composição centesimal, lisina disponível e digestibilidade in vitro de proteínas de fórmulas para nutrição oral ou enteral. *Ciênc Tecnol Aliment*.2005;25(4):768-71. [DOI:10.1590/S0101-20612005000400023].
9. Cortez APB, Medeiros LCS, Speridião PGL, Mattar RHGM, Neto UF, Morais MB. Conhecimento de pediatras e nutricionistas sobre o tratamento da alergia ao leite de vaca no lactente. *Rev Paul Pediatr*. 2007;25(2):106-13. [DOI:10.1590/S0103-05822007000200002].
10. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. Levantamento sistemático da produção agrícola. [acesso 2015 Mai 13]. Disponível em: [http://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola_[mensal]/Fasciculo/lspa_201503.pdf].
11. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Soja - EMBRAPA SOJA. Soja em números. [acesso 2015 Mai 13]. Disponível em: [http://www.embrapa.br/soja/cultivos/soja1/dados-economicos].
12. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. Levantamento sistemático da produção agrícola. [2015]. [acesso 2015 Mai 13]. Disponível em: [http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_201504_7.shtm].
13. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Soja - EMBRAPA SOJA. *Tecnologias de Produção de Soja Região Central do Brasil 2004*. [acesso 2011 Out 01]. Disponível em: [http://www.cnpso.embrapa.br/producaosoja/SojanoBrasil.htm].
14. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Soja - EMBRAPA SOJA. Soja na alimentação. [acesso 2011 Jul 24]. Disponível em: [http://www.cnpso.embrapa.br/soja_alimentacao/index.php].

15. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Agrotóxicos: Agência discute o controle de resíduos no Senado. [acesso 2010 Jan 06]. Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/home/agrotoxicotoxicologia#].
16. Siqueira SL, Kruse MHL. Agrotóxicos e saúde humana: contribuição dos profissionais do campo da saúde. *Rev Esc Enferm USP*. 2008;42(3):584-90. [DOI: 10.1590/S0080-62342008000300024].
17. Brasil. Ministério da Saúde. Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002. Regulamenta a Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 4 jan. 2002. Seção 1, nº5. p. 1-12.
18. Perez F, Moreira JC. Saúde e ambiente em sua relação com o consumo de agrotóxicos em um polo agrícola do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Cad Saúde Pública*. 2007; 23(4): S612-S21. [DOI:10.1590/S0102-311X2007001600021].
19. Karabelas AJ, Plakas KV, Solomou ES, Drossou V, Sarigiannis DA. Impact of European legislation on marketed pesticides - a view from the standpoint of health impact assessment studies. *Environ Int*. 2009;35(7):1096-107. [DOI: 10.1016/j.envint.2009.06.011].
20. Brasil. Lei nº 9.974, de 6 de junho de 2000. Altera a Lei no 7.802, de 11 de julho de 1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 7 jun. 2000. Seção 1, nº109. p. 1-2.
21. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Monografias Autorizadas. [acesso 2013 Jan 03]. Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Agrotoxicos+e+Toxicologia/Assuntos+de+Interesse/Monografias+de+Agrotoxicos/Monografias].
22. Brasil. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 42, de 31 de dezembro de 2008. Instituir o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em Produtos de Origem Vegetal – PNCRC/Vegetal. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 05 jan. 2009. Seção 1, nº2. p. 2-3.
23. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA. Primeiro relatório sobre comercialização de agrotóxicos no país é lançado pelo Ibama. [acesso 2013 Jan 01]. Disponível em: [http://www.ibama.gov.br/publicadas/primeiro-relatorio-sobre-comercializacao-de-agrotoxicos-no-pais-e-lancado-pelo-ibama].
24. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA. Produtos agrotóxicos e afins comercializados em 2009 no Brasil: uma abordagem ambiental, Brasília, 2010. [acesso 2013 Jan 01]. Disponível em: [http://www.ibama.gov.br/phocadownload/Qualidade_Ambiental/produtos_agrotoxicos_comercializados_brasil_2009.pdf].
25. Prestes OD, Adaime MB, Zanella R. QuEChERS: possibilidades e tendências no preparo de amostra para a determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos. *Sci Chromatogr*. 2011; 3(1):51-64. [DOI: 10.4322/sc.2011.004].
26. Anastassiades M, Lehoutay SJ, Stajnbaher D, Schenck FJ. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. *J AOAC Int*. 2003; 86(2):412-31.
27. Prestes OD, Friggi CA, Adaime MB, Zanella R. QUECHERS - Um método moderno de preparo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. *Quim Nova*. 2009; 32(6):1620-34. [DOI:10.1590/S0100-40422009000600046].

28. Dg-Sanco. Method Validation and Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed. Document No. SANCO/12495/2011 [acesso 2012 Mar 05]. Disponível em: [http://www.eurl-pesticides.eu/library/docs/allcrl/AqcGuidance_Sanco_2011_12495.pdf].
29. Kaewsuya P, Brewer WE, Wong J, Morgan SL. Automated QuEChERS Tips for Analysis of Pesticide Residues in Fruits and Vegetables by GC-MS. *J Agric Food Chem*. 2013; 61(10):2299-314. [DOI:10.1021/jf304648h].
30. Stoppelli IMBS, Magalhães CP. Saúde e Segurança Alimentar: A Questão dos Agrotóxicos. *CiêncSaúde Coletiva*. 2005;10(supl):91-100. [DOI:10.1590/S1413-81232005000500012].
31. US Environmental Protection Agency – U.S. EPA. Pesticide Fact Sheet: Cyprodinil. Washington D.C., 1998. [acesso 2013 Mar 17]. Disponível em: [http://www.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/registration/fs_PC-288202_06-Apr-98.pdf].
32. US Environmental Protection Agency – U.S. EPA. Pesticide Fact Sheet: Tetraconazole. Washington D.C., 2005. [acesso 2013 Mar 17]. Disponível em: [http://www.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/registration/fs_PC-120603_01-Apr-05.pdf].
33. Carneiro FF, Augusto LGS, Rigotto RM, Friedrich K, Búrigo AC (Organizadores). Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. Rio de Janeiro: Escola Politécnica Joaquim Venâncio; São Paulo: Expressão Popular; 2015.
34. International Programme on Chemical Safety – IPCS INCHEM. WHO/FAO Data Sheets on Pesticides N°. 89: Carbendazim. 1996. [acesso 2013 Mar 17]. Disponível em: [http://www.inchem.org/documents/pds/pds/pest89_e.htm].
35. International Programme on Chemical Safety – IPCS INCHEM. WHO/FAO Data Sheets on Pesticides N°. 49: Pirimiphos-methyl. [2013]. [acesso 2013 Mar 17]. Disponível em: [http://www.inchem.org/documents/pds/pds/pest49_e.htm].
36. US Environmental Protection Agency – U.S. EPA. Pesticide Fact Sheet: Cyazofamid. Washington D.C., 2004. [acesso 2013 Mar 17]. Disponível em: [http://www.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/registration/fs_PC-085651_01-Sep-04.pdf].
37. Food and Agriculture Organization of The United Nations - FAO. 4.19 Pyraclostrobin (210)(T)*. [2003]. [acesso 2013 Mar 17]. Disponível em: [<http://www.fao.org/docrep/006/Y5221E/y5221e0o.htm>].
38. Toxicology Data Network - TOXNET. Triazofos. [2013]. [acesso 2013 Mar 17]. Disponível em: [<http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/a?dbs+hsdb:@term+@DOCNO+6455>].
39. US Environmental Protection Agency – U.S. EPA. Registration Eligibility Decision for Piperonyl Butoxide (PBO): List B, Case No. 2525. Washington D.C., 2006. [acesso 2013 Mar 17]. Disponível em: [http://www.epa.gov/pesticides/reregistration/REDS/piperonyl_red.pdf].

Análise do teor de sódio em rótulos de mortadelas comercializadas no Brasil

Sodium contents in labelson the mortadellas sold in Brazil

RIALA6/1658

Francielly Kultz SILVESTRE¹, Elisvânia Freitas dos SANTOS², Gabriela Datsch BENNEMANN¹, Daiana NOVELLO^{3*}

*Endereço para correspondência: ³Departamento de Nutrição, Setor de Ciências da Saúde, UNICENTRO. Caixa Postal 35, Guarapuava, PR, CEP: 85010-000. Tel: 42 3629-8182. E-mail: nutridai@gmail.com

¹Departamento de Nutrição, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Estadual do Centro-Oeste (UNICENTRO), Guarapuava, PR

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

Recebido: 17.10.2014 - Aceito para publicação: 01.09.2015

RESUMO

Os objetivos do trabalho foram avaliar o teor de sódio informado no rótulo de mortadelas disponíveis comercialmente no Brasil, comparar com a atual recomendação de consumo e estimar a contribuição da ingestão diária de sódio. Os rótulos nutricionais de 130 amostras de mortadelas (tradicional; com e sem toucinho; tubular; bologna; tipo bologna; bologna light; de ave; defumada; italiana e especial), foram avaliados quanto ao teor de sódio. Não foi observada diferença ($p > 0,05$) no teor de sódio entre os diferentes tipos de mortadelas. Entretanto, houve grande variação nos conteúdos de sódio entre as marcas para o mesmo produto. As amostras de mortadela com toucinho e italiana apresentaram, respectivamente, os maiores e menores valores de contribuição da ingestão diária, considerando-se um consumo de 50 e 100 g/dia. Das mortadelas de ave, 8,7 % foram classificadas na categoria de teor moderado de sódio (121 a 600 mg/100 g), enquanto 100 % das demais variedades apresentaram alto teor (> 601 mg/100 g). A maioria das mortadelas comercializadas no Brasil apresenta alto teor de sódio, bem como grande variabilidade de valores entre as marcas do produto, o que contribui para uma elevada ingestão diária de sódio.

Palavras-chave. rotulagem nutricional, sais, embutidos cárneos.

ABSTRACT

This study aimed at evaluating the sodium contents reported in labels on mortadellas commercially available in Brazil, also to compare with the current recommendation of its consumption, and to estimate the contribution of daily sodium intake. The sodium contents were evaluated in the nutrition labels on 130 samples of mortadella (traditional; with and without bacon; tubular; bologna, bologna type, bologna light; poultry; smoked; Italian and special varieties). No difference ($p > 0.05$) was detected in the sodium contents among the varied types of mortadellas. However, a wide variation in the sodium contents among the trade-marks of the same product was found. The mortadella with bacon and the Italian type samples showed the highest and the lowest values for salt daily intake contribution, respectively, considering a consumption of 50 to 100 g/day. Among the poultry mortadellas, 8.7 % were classified as moderate sodium contents (121 to 600 mg/100 g), while 100 % of the other varieties samples showed high sodium contents (> 601 mg/100 g). The majority of mortadellas sold in Brazil present high sodium contents and a wide variety of sodium quantities among the product trade-marks was detected, which contributes to the high sodium daily intake.

Keywords. nutrition label, salts, sausage meat.

INTRODUÇÃO

Os minerais são fundamentais em vários processos biológicos, exercendo funções na manutenção do metabolismo e desenvolvimento normais no organismo. Um dos mais importantes é o sódio, capaz de realizar a contração muscular, condutância motora, manutenção do pH e da pressão osmótica¹. Apesar disso, o consumo elevado de sódio é cada vez mais reconhecido por contribuir no desenvolvimento de doenças cardiovasculares e renais².

A ingestão de sódio atualmente varia em torno de 3.600 a 4.800 mg/dia³. Contudo, a Organização Mundial de Saúde (OMS)⁴ recomenda que os adultos tenham um consumo de no máximo 5 g de sal/dia, equivalente a 2.000mg/dia de sódio. A maior fonte de sódio na dieta é o sal comum ou cloreto de sódio (NaCl), que está presente naturalmente nos alimentos, podendo ser adicionado também durante o processamento dos produtos. A presença do sódio é importante tanto para a percepção do sabor salgado, como para a sensação do sabor global do alimento. Assim, uma redução no teor de sal pode diminuir, ainda, a aceitabilidade dos produtos pelos consumidores⁵. Visando uma menor ingestão de NaCl, a OMS recomenda que sejam desenvolvidas estratégias para que a população possa escolher os alimentos e compreender os nutrientes presentes nos rótulos dos produtos⁶.

Os rótulos são importantes instrumentos que devem ser avaliados no momento da compra. Muitas vezes, são a única comunicação entre o consumidor e o produto, podendo facilitar as escolhas alimentares e colaborar para a saúde do indivíduo⁷. Segundo a RDC nº 360⁸, os produtos alimentícios devem apresentar nos rótulos nutricionais, obrigatoriamente, o teor energético, carboidratos, proteínas, gorduras (totais, saturadas e trans), fibra alimentar, dentre outros nutrientes. Também, devido à relação entre o consumo elevado de sódio e hipertensão alguns países, inclusive o Brasil, já exigem a informação de sódio de seus alimentos⁹. No Brasil, as principais

estratégias propostas pelo Ministério da Saúde para reduzir o consumo de sódio são a promoção de uma alimentação saudável, por meio de campanhas de mídia, ações informativas aos produtores e consumidores e, acordos com indústrias para reformulação de alimentos processados¹⁰.

Devido às novas exigências atuais para a redução no consumo de sódio, cresce o foco industrial por alimentos com baixo teor desse mineral¹¹, principalmente em carnes e derivados^{12,13}. Entretanto, sabe-se que o sódio contribui fortemente para a conservação de produtos embutidos, como a mortadela. Além disso, aumenta a capacidade de retenção de água, elevando o rendimento, reduz perdas de água durante o armazenamento¹², contribui para os aspectos sensoriais de sabor e textura e aumenta a vida de prateleira dos produtos¹⁴.

Os embutidos são os produtos à base de carne mecanicamente separada, que possuem o maior teor de sódio, chegando a conter até 6 %, devido à desidratação que ocorre durante sua produção¹⁵. Dentre eles, destaca-se a mortadela que é consumida em todo o mundo e, no Brasil, apresenta um papel relevante na dieta, sendo fonte de sódio para a população¹⁶. É bastante popular entre as diversas faixas etárias, tanto para a alimentação doméstica, como em locais que oferecem refeições rápidas. Neste aspecto, a mortadela apresenta grande importância econômica, devido as suas características e preço acessível¹⁷, quando comparada a outros embutidos como salames, presuntos e queijos. No país, sua ingestão *per capita* pode chegar 1,4 g/dia¹⁸, com uma venda anual de aproximadamente 220.000 toneladas¹⁹. Esse fato ressalta a importância de estudos que abranjam a redução de NaCl em mortadelas²⁰. Assim, considerando o consumo frequente de mortadela nas dietas brasileiras e a necessidade urgente da redução do teor de sódio em produtos cárneos, objetivou-se avaliar o teor de sódio informado na rotulagem de mortadelas disponíveis comercialmente no Brasil, comparar com a recomendação atual de consumo e estimar a contribuição da ingestão diária de sódio para a população.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram avaliadas 130 amostras de mortadela, representando 44 marcas comercializadas no Brasil, similarmente ao estudo de Felicio et al²¹, que analisaram variedades de queijos. As amostras foram escolhidas por conveniência²², com a finalidade de se obter uma quantidade representativa das mortadelas consumidas no país. O estudo foi realizado entre os meses de setembro de 2013 e março de 2014. Os produtos foram pesquisados em 11 supermercados de diferentes redes, presentes nos estados do Paraná, Rio Grande do Sul e Mato Grosso do Sul. Também foram pesquisados 44 sites de empresas brasileiras que produziam mortadelas de diversos tipos. Do total de amostras avaliadas, 50 foram obtidas em supermercados e 80 em sites.

Os critérios de inclusão para análise das amostras foram: as mortadelas disponibilizadas nos supermercados deveriam possuir data de fabricação impressa na embalagem entre os anos de 2013 ou 2014; os sites pesquisados deveriam estar atualizados (2013 ou 2014) e; mortadelas do mesmo tipo necessariamente precisariam ser de marcas diferentes. Já os critérios de exclusão foram: data de fabricação dos produtos anteriores a 2013 ou 2014; sites desatualizados, ou sem data de publicação e; tipos de mortadelas iguais pertencentes à mesma marca.

As variedades e quantidades de mortadelas utilizadas no estudo estão descritas na Tabela 1.

Os rótulos nutricionais dos produtos foram registrados mediante fotografia, cópia, disponível no site da empresa ou, ainda, da informação fornecida diretamente pela empresa, solicitada via atendimento ao consumidor. Dentre os nutrientes constantes nos rótulos das mortadelas, foi utilizado apenas o teor de sódio (100 g de produto), o qual foi calculado também para a porção diária informada de 50 g de mortadela (duas fatias médias de 25 g)^{23,24}.

Os dados foram analisados por meio de medidas descritivas (média, desvio padrão e

intervalo - mínimo e máximo) do teor de sódio para cada tipo de mortadela¹⁹, considerando-se o número de indústrias fabricantes, conforme trabalhos semelhantes de Dunford et al²⁵ e Felicio et al²¹.

O valor diário de referência (VD) das amostras foi calculado para as porções de 50 e 100 g de mortadela, com base na recomendação de consumo ideal de sódio de 2.000 mg/dia, para um adulto saudável (70 kg)⁴.

Os produtos foram avaliados em relação à: 1. Análise do teor de sódio (na rotulagem) entre os diferentes tipos de mortadelas comercializadas e, 2. Classificação do teor de sódio, como: a) baixo (≤ 120 mg/100 g); b) moderado (121 a 600 mg/100g) e; c) alto (> 601 mg/100 g)²⁶.

Inicialmente, aplicou-se o teste de normalização de dados (Kolmogorov-Smirnov) para avaliação dos dados. Em seguida, foi realizada a análise de variância (ANOVA), *one-way*, para verificação da variabilidade entre os valores, sendo utilizado o teste de Tukey para comparação de médias²⁷. Os resultados foram analisados com auxílio do *software Statgraphics Plus*, versão 5.1, avaliados com nível de 5 % de significância.

Tabela 1. Tipos e quantidade de mortadelas utilizadas na pesquisa

Tipos de mortadelas	Marcas	Amostras
MT	20	20
MCT	12	12
MST	17	17
MTU	8	8
MB	8	9
MTB	11	11
MBL	4	4
MA	23	23
MD	13	13
MI	3	3
ME	5	10
TOTAL	124	130

MT: Mortadela tradicional; MCT: Mortadela com toucinho; MST: Mortadela sem toucinho; MTU: Mortadela tubular; MB: Mortadela bologna; MTB: Mortadela tipo bologna; MBL: Mortadela bologna light; MA: Mortadela de ave; MD: Mortadela defumada; MI: Mortadela italiana; ME: Mortadela especial (com especiarias)

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não houve diferença significativa entre os conteúdos de sódio dos produtos avaliados, conforme se verifica na Tabela 2. Entretanto, as mortadelas tubular, defumada e italiana foram as que apresentaram os maiores teores de sódio, enquanto as mortadelas com toucinho, bologna *light* e de ave tiveram quantidades menores de sódio. Destaca-se também a elevada variabilidade de valores entre as marcas analisadas para o mesmo produto. Resultados similares foram constatados em uma pesquisa realizada pela Anvisa²⁸, entre 2010 e 2011, em que foram monitoradas as quantidades de sódio em alguns produtos presentes no comércio varejista brasileiro. Este fato que pode ser explicado pelos diferentes tipos de ingredientes, processamento e armazenamento utilizados pelas empresas²⁹.

Avaliando-se a contribuição dos tipos de mortadelas para a ingestão diária de sódio, é possível verificar que a mortadela italiana contribuiu com a maior porcentagem do VD, seguida pelas mortadelas com especiarias, tubular e defumada, todas acima de 30 %

(por porção). A mortadela com toucinho foi o produto que apresentou o menor VD por porção.

Em relação à classificação do teor de sódio, 8,7 % das mortadelas de ave foram classificadas na categoria de moderado teor de sódio (121 a 600 mg/100 g), enquanto que 100 % das demais variedades apresentaram alto teor de sódio (> 601 mg/100 g)²⁶ (dados não mostrados). Resultados que corroboram com Webster et al³⁰, que analisaram o conteúdo de sódio em salames (700 mg/100 g de produto). De forma similar, na pesquisa realizada pela Anvisa²⁸ 100 % das mortadelas avaliadas apresentaram teores de sódio entre 943 mg a 1.520 mg/100 g.

Foi possível verificar que as mortadelas comercializadas no Brasil, avaliadas por meio da rotulagem, possuem entre moderados e elevados teores de sódio. Esse fato é preocupante, uma vez que, em geral, este produto apresenta preço mais acessível, o que aumenta seu consumo e contribui para que a recomendação diária de sódio seja ultrapassada³¹. Resultados semelhantes foram relatados por Zanardi et al²⁹, que observaram teores elevados de sódio em mortadelas italianas, comercializadas na Itália.

Tabela 2. Teor de sódio (mg) presente em rótulos nutricionais de mortadelas (média e intervalo – mínimo e máximo) e valor diário de referência (VD) por 100 g e porção média de consumo diário de 50 g

Mortadela	Produtos (n)	Média por 100 g (intervalo)	Média por porção 50 g (intervalo)	VD (%) 100 g	VD (%) 50 g
MT	20	1.111,68 (640 - 1.624) ^a	555,84 (320 - 812) ^a	55,56	27,78
MCT	12	1.062,29 (620 - 1.512) ^a	531,14 (310 - 756) ^a	53,06	26,53
MST	17	1.142,88 (655 - 1.604) ^a	571,44 (327 - 802) ^a	57,09	28,54
MTU	8	1.249,13 (950 - 1.444) ^a	623,43 (475 - 722) ^a	62,27	31,13
MB	9	1.116,28 (880 - 1.322) ^a	558,13 (440 - 661) ^a	55,75	27,87
MTB	11	1.172,5 (804 - 1.550) ^a	586,25 (402 - 775) ^a	58,61	29,30
MBL	4	1.063,63 (852 - 1.300) ^a	531,81 (426 - 650) ^a	53,18	26,59
MA	23	1.083,4 (500 - 1.984) ^a	541,7 (250 - 992) ^a	54,13	27,06
MD	13	1.215,52 (824 - 1.525) ^a	607,75 (412 - 762) ^a	60,75	30,37
MI	3	1.570,86 (1.112 - 2.400) ^a	785,41 (556 - 1.200) ^a	78,53	39,26
ME	10	1.122,35 (833 - 1.450) ^a	561,17 (416 - 725) ^a	60,70	35,77

Letras diferentes na coluna indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$); VD: considerando a recomendação de 2.000 mg de sódio/dia para um adulto saudável⁴; MT: Mortadela tradicional; MCT: Mortadela com toucinho; MST: Mortadela sem toucinho; MTU: Mortadela tubular; MB: Mortadela bologna; MTB: Mortadela tipo bologna; MBL: Mortadela bologna light; MA: Mortadela de ave; MD: Mortadela defumada; MI: Mortadela italiana; ME: Mortadela especial (com especiarias)

Atualmente, a quantidade de sal em mortadelas diminuiu em torno de 10 % para atender as necessidades nutricionais, comparada ao ano de 1990³². No Reino Unido, a redução do sódio em produtos processados vem sendo realizada desde 2003, sendo que já se obteve uma diminuição de 40 a 50 % em alguns alimentos. Porém, é necessária uma abrangência de produtos ainda maior, haja vista que a população continua apresentando um consumo elevado do mineral²⁶.

O menor teor de sódio em produtos alimentícios, principalmente em embutidos, já vem sendo considerado pelas indústrias. Entretanto, devido à sua fundamental contribuição para os alimentos, a redução desse mineral ainda se apresenta como um grande desafio tecnológico. Fato que se deve, principalmente, à segurança microbiológica que proporciona ao produto, melhora das propriedades sensoriais e na funcionalidade e aumento da capacidade de retenção de água, o que eleva o rendimento e reduz as perdas de água durante o armazenamento^{12,33}.

Devido ao custo reduzido e maior acessibilidade das mortadelas, seu consumo pela população de baixa renda representa maior acesso às proteínas de alto valor biológico. Deste modo, sua utilização vem se destacando tanto em preparações simples como em receitas mais elaboradas³¹, o que aumenta a ingestão destes produtos¹⁷. Neste aspecto, um consumo elevado de sódio torna-se preocupante para a saúde pública uma vez que pode aumentar o risco de algumas doenças como, por exemplo, a hipertensão arterial sistêmica, os cálculos renais, as doenças cardiovasculares³⁴ e a obesidade³⁵. Deve-se considerar, também, que a carne e seus derivados contribuem com cerca de 16 a 25 % da ingestão de sódio recomendada por dia, maior que todas as outras categorias de produtos industrializados⁴, lembrando que seu consumo *per capita* é de aproximadamente 63,2 g/dia¹⁸.

Pesquisas que relatam a redução de sódio em produtos embutidos, como as mortadelas, ainda são insuficientes, apesar do seu relevante consumo no Brasil e apelos governamentais

Em geral, os trabalhos atuais avaliam a substituição de cloreto de sódio por cloreto de potássio, magnésio e cálcio em diferentes níveis; utilização de ervas e especiarias; ou a adição de outras substâncias como lisina, guanilato dissódico, inosinato dissódico e extrato de levedura^{11,12,20,36}.

Resultados positivos em produtos com teor reduzido de sódio foram observados com a utilização de inosinato dissódico e guanilato dissódico em mortadelas adicionadas de 1 % de NaCl e 1 % de KCl, apresentando melhora na aceitação³⁶. Efeitos semelhantes foram relatados por Campagnol et al¹¹ em salsichas fermentadas com teor reduzido de NaCl e adição de lisina, guanilato dissódico e inosinato dissódico. Entretanto, a utilização de substâncias como o cálcio em mortadelas tradicionais afetou negativamente a textura, aumentando a dureza. Igualmente, a substituição por KCl pode resultar na rejeição sensorial do produto, dependendo do nível de substituição, já que é capaz de produzir um gosto amargo e metálico²⁰. Em alguns casos este mineral pode, também, prejudicar a textura e hidratação do produto³⁷.

Uma maneira de restringir o consumo alimentar de sódio é observar os rótulos nutricionais presentes na embalagem. Por meio deles é possível comparar os ingredientes presentes em diferentes marcas de produtos e, assim, o indivíduo pode adquirir aquele mais adequado para suas necessidades³⁸. Contudo, para uma apropriada compreensão e interpretação dos rótulos, as descrições devem ser claras, precisas e objetivas³⁹.

Muitas vezes, os consumidores enfrentam dificuldades em diferenciar os conteúdos de sódio e NaCl dos alimentos. Porém, o sódio está presente em 40 % do NaCl, sendo essa sua principal fonte³⁴. Nesse contexto, no Brasil as principais estratégias para uma possível redução no consumo de sódio são realizadas por meio de algumas políticas públicas relacionadas à reformulação de produtos industrializados, aumento no consumo de alimentos mais saudáveis e verificação detalhada do rótulo dos alimentos¹⁰. No entanto, observa-se ainda uma grande adição de

sódio aos alimentos processados por parte das empresas, o que foi confirmado pela presente pesquisa. Este fato demonstra haver a necessidade iminente de maior monitoramento governamental para esta questão.

CONCLUSÃO

A maioria das mortadelas comercializadas no Brasil apresentou alto teor de sódio, contribuindo para uma elevada ingestão diária de sódio (acima de 25 % por 50 g ou acima de 50 % por 100 g de produto) para todos os produtos avaliados. Dessa forma, são necessárias novas pesquisas e investimentos das indústrias alimentícias, com intuito de reduzir o conteúdo de NaCl em mortadelas.

Foi constatada uma grande variabilidade de valores de sódio nos rótulos das mortadelas, entre marcas diferentes. Assim, recomendam-se medidas governamentais urgentes para melhorar a clareza e a compreensão dessas informações entre os consumidores e, além disso, maior monitoramento e avaliação periódica dos produtos comercializados, para que apresentem uma redução gradativa de sódio.

AGRADECIMENTOS

À Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná, pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

1. Chekri R, Noel L, Millour S, Vastel C, Kadar A, Sirot V, et al. Calcium, magnesium, sodium and potassium levels in foodstuffs from the second French Total Diet Study. *J Food Compos Anal*.2012;25(2):97-107. [DOI:10.1016/j.jfca.2011.10.005].
2. Krikken JA, Dallinga-Thie GM, Navis G, Dullaart RPF. Short term dietary sodium restriction decreases HDL cholesterol, apolipoprotein A-I and high molecular weight adiponectin in healthy young men: relationships with renal hemodynamics and RAAS activation. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*.2012;22(1):35-41. [DOI: 10.1016/j.numecd.2010.03.010].

3. Souza AM, Bezerra IN, Pereira RA, Peterson KE, Sichieri R. Dietary sources of sodium intake in Brazil in 2008-2009. *J Acad Nutr Diet*. 2013;113(10):1359-65. [DOI: 10.1016/j.jand.2013.04.023].

4. World Health Organization - WHO. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. Report of a Joint WHO/FAO Expert Consultation. Technical report series n. 916. Geneva: WHO; 2003 [acesso 2015 Jul 20]. Disponível em: [http://www.who.int/dietphysicalactivity/publications/trs916/en/gsfao_introduction.pdf].

5. Floury J, Camier B, Rousseau F, Lopez C, Tissier JP, Famelart MH. Reducing salt level in food: Part 1. Factors affecting the manufacture of model cheese systems and their structure-texture relationships. *LWT - Food Sci Technol*.2009;42(10):1611-20. [DOI:10.1016/j.lwt.2009.05.026].

6. Grimes CA, Riddell LJ, Nowson CA. Consumer knowledge and attitudes to salt intake and labelled salt information. *Appetite*.2009;53(2):189-94. [DOI: 10.1016/j.appet.2009.06.007].

7. Pinheiro FA, Cardoso WS, Chaves KF, Oliveira ASB, Rios SA. Perfil de consumidores em relação à qualidade de alimentos e hábitos de compra. *UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde*.2011; 13(2):95-102.

8. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003. Aprova o Regulamento Técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados, tornando obrigatória a rotulagem nutricional. [acesso 2015 Jul 17]. Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/1c2998004bc50d62a671ffbc0f9d5b29/RDC_N_360_DE_23_DE_DEZEMBRO_DE_2003.pdf?MOD=AJPERES].

9. Webster JL, Dunford EK, Hawkes C, Neal BC. Salt reduction initiatives around the world. *J Hypertens*.2011;29(6):1043-50.[DOI: 10.1097/HJH.0b013e328345ed83].

10. Nilson EAF, Jaime PC, Resende DO. Iniciativas desenvolvidas no Brasil para a redução do teor de sódio em alimentos processados. *Rev Panam Salud Publica*.2012;32(4):287-92. [DOI: 10.1590/S1020-49892012001000007].

11. Campagnol PCB, Santos BA, Terra NN, Pollonio MAR. Lysine, disodium guanylate and disodium inosinate as flavor enhancers in low-sodium fermented sausages. *Meat Sci.*2012;91(3):334-8. [DOI:10.1016/j.meatsci.2012.02.012].
12. Carraro CI, Machado R, Espindola V, Campagnol PCB, Pollonio MAR. The effect of sodium reduction and the use of herbs and spices on the quality and safety of bologna sausage. *Ciênc Tecnol Aliment.*2012;32(2):289-95. [DOI: 10.1590/S0101-20612012005000051].
13. Santos BA, Campagnol PCB, Morgano MA, Pollonio MAR. Monosodium glutamate, disodium inosinate, disodium guanylate, lysine and taurine improve the sensory quality of fermented cooked sausages with 50% and 75% replacement of NaCl with KCl. *Meat Sci.*2014;96(1):509-13. [DOI: 10.1016/j.meatsci.2013.08.024].
14. Desmond E. Reducing salt: a challenge for the meat industry. *Meat Sci.*2006;74(1):188-96. [DOI:10.1016/j.meatsci.2006.04.014].
15. Campagnol PC, dos Santos BA, Wagner R, Terra NN, Pollonio MAR. The effect of yeast extract addition on quality of fermented sausages at low NaCl content. *Meat Sci.*2011;87(3):290-8. [DOI: 10.1016/j.meatsci.2010.11.005].
16. Madruga MS, Guerra ICD, Félex SSS, Meireles BRLA, Benevides SD, Bonfim MAD. Produção de mortadelas para agregação de valor à carne caprina. *Comunicado Técnico*, 121.2010:1-7 [acesso 2015 Jun 15]. Disponível em: [http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/880113].
17. Yunes JFF. Avaliação dos efeitos da adição de óleos vegetais como substitutos de gordura animal em mortadela [dissertação de mestrado] Santa Maria (RS): Universidade Federal de Santa Maria; 2010.
18. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. Pesquisa de orçamentos familiares 2008-2009: análise do consumo alimentar pessoal no Brasil. Rio de Janeiro (RJ): IBGE; 2011. 150 p.
19. Costa L. Mortadelas e 'mortandelas'. *Stravaganza*. 2012 [acesso 2014 Out 01]. Disponível em: [http://stravaganzastravaganza.blogspot.com.br/2012/02/mortadela.html].
20. Horita CN, Morgano MA, Celeghini RM, Pollonio MAR. Physico-chemical and sensory properties of reduced-fat mortadella prepared with blends of calcium, magnesium and potassium chloride as partial substitutes for sodium chloride. *Meat Sci.*2011;89(4):426-33. [DOI: 10.1016/j.meatsci.2011.05.010].
21. Felicio TL, Esmerino EA, Cruz AG, Nogueira LC, Raices RSL, Deliza R, et al. Cheese. What is its contribution to the sodium intake of Brazilians? *Appetite.*2013;66:84-8. [DOI:10.1016/j.appet.2013.03.002].
22. Carrilo E, Varela P, Fiszman S. Influence of nutritional knowledge on the use and interpretation of Spanish nutritional food labels. *J Food Sci.*2012;71(1):H1-8. [DOI: 10.1111/j.1750-3841.2011.02479.x].
23. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 359, de 23 de dezembro de 2003. Aprova o Regulamento Técnico de Porções de Alimentos e Bebidas Embalados para Fins de Rotulagem Nutricional [acesso 2015 Out 21]. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/alimentos/legis/especifica/rotuali.htm].
24. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 4, de 31 de março de 2000. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade de Carne Mecanicamente Separada, de Mortadela, de Linguiça e de Salsicha [acesso 2014 Set 28]. Disponível em: [http://www.engetecno.com.br/port/legislacao/carnes_mortadela.htm].
25. Dunford E, Webster J, Barzi F, Neal B. Nutrient content of products served by leading Australian fast food chains. *Appetite.*2010;55(3):484-9. [DOI: 10.1016/j.appet.2010.08.015].

26. Food Standard Agency – FSA. What is a healthy balanced diet? [acesso 2014 Set 15]. Disponível em: [http://www.food.gov.uk/northern-ireland/nutritionni/healthy-catering/caterers-tips/what-is-a-healthy-balanced-diet].
27. Spiegel MR. Estatística. 4ª ed. São Paulo: Makron Books; 2009.
28. Brasil. Ministério da Saúde. Informe Técnico n.º 50/2012. Teor de sódio dos alimentos processados. [acesso 2015 Jul 13]. Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/856c37804d19e24d9d7aff4031a95fac/INFORME+T%C3%89CNICO+2012-+OUTUBRO.pdf?MOD=AJPERES].
29. Zanardi E, Ghidini S, Conter M, Ianieri A. Mineral composition of Italian salami and effect of NaCl partial replacement on compositional, physico-chemical and sensory parameters. *Meat Sci*. 2010;86(3):742–7. [DOI: 10.1016/j.meatsci.2010.06.015].
30. Webster JL, Dunford EK, Neal BC. A systematic survey of the sodium contents of processed foods. *Am J Clin Nutr*. 2010;91(2):413–20. [DOI: 10.3945/ajcn.2009.28688].
31. Massingue AA. Uso de carne mecanicamente separada de aves na elaboração de mortadelas à base de carne de cordeiros e de ovelhas [dissertação de mestrado]. Lavras (MG): Universidade Federal de Lavras; 2012.
32. Barbieri G, Bergamaschi M, Bergamaschi GE, Franceschini M. Survey of the chemical, physical, and sensory characteristics of currently produced mortadella bologna. *Meat Sci*. 2013;94(3):336–40. [DOI:10.1016/j.meatsci.2013.02.007].
33. Gaudette NJ, Pietrasik Z. The impact of sodium reduction strategies on the sensory and processing characteristics of meat products. *Meat Sci*. 2014;96(1):123. [DOI: 10.1016/j.meatsci.2013.05.057].
34. He FJ, Macgregor GA. Reducing population salt intake worldwide: from evidence to implementation. *Prog Cardiovasc Dis*. 2010;52(5):363-82. [DOI: 10.1016/j.pcad.2009.12.006].
35. He FJ, Marrero NM, Macgregor GA. Salt intake is related to soft drink consumption in children and adolescents: a link to obesity? *Hypertension*. 2008;51(3):629-34. [DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.100990].
36. Messias VC, Campos TS, Santos BA, Horita CN, Ignácio AKF, Campagnol PCB, et al. O efeito da adição de lisina, extrato de levedura, inosinato dissódico e guanilato dissódico na qualidade sensorial de mortadelas com 50 % de redução de sódio. VI Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Carnes; 2011; Campinas (SP): Anais do VI Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Carnes. p.1-4.
37. Pietrasik Z, Gaudette NJ. Effect of sodium reduction on the quality of naturally-cured ham. *Meat Sci*. 2014;96(1):122–3. [DOI:10.1016/j.meatsci.2013.05.055].
38. Food and Drug Administration – FDA. Las etiquetas de los alimentos ayudan a los consumidores a tomar decisiones más saludables. 2013 [acesso 2014 Set 05]. Disponível em: [http://www.fda.gov/ForConsumers/ConsumerUpdates/ucm152424.htm].
39. World Health Organization - WHO. Reducing salt intake in populations: report of a WHO forum and technical meeting, France. 2007 [acesso 2014 set 20]. Disponível em: [http://www.who.int/dietphysicalactivity/Salt_Report_VC_april07.pdf].

Microbiological and physicochemical characterization of the raw milk and the colonial type cheese from the Northwestern Frontier region of Rio Grande do Sul, Brazil

Caracterização microbiológica e físico-química de leite cru e queijo colonial da região Fronteira Noroeste do Rio Grande do Sul, Brasil

RIALA6/1659

Graciele Daiana FUNCK^{1*}, Gislaíne HERMANN², Raul VICENZI³, Jéssica Tamiozzo SCHMIDT³, Neila Silvia Pereira dos Santos RICHARDS², Wladimir Padilha da SILVA¹, Ângela Maria FIORENTINI¹

*Corresponding author: ¹Department of Agroindustrial Science and Technology, Federal University of Pelotas, P.O. Box: 354, Zip code: 96010-900, Pelotas, RS, Brazil. Tel.: +55 53 3275-7284 department number 202. E-mail: gracifunck@yahoo.com.br

²Department of Food Science and Technology, Center of Rural Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

³Department of Life Sciences, Northwest Regional University of RS, Santa Rosa, RS, Brazil

Recebido: 15.04.2015 - Aceito para publicação: 14.07.2015

ABSTRACT

This study aimed at evaluating the microbiological and physicochemical characteristics of raw milk and colonial type cheese from Northwestern Frontier region of Rio Grande do Sul, Brazil. For this purpose, the samples were collected in January and July. Microbiological analyses (aerobic mesophilic bacteria, total/thermotolerant coliform, coagulase-positive *Staphylococcus*, *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes*, lactic acid bacteria) and physicochemical assays (pH, acidity, total solids, protein, fat, a_w , moisture, NaCl) were performed. The milk and cheese samples showed low microbiological quality because high counting of aerobic mesophilic bacteria, total/thermotolerant coliform and coagulase-positive *Staphylococcus* were detected. High counting of lactic acid bacteria was observed. However, neither *Salmonella* spp. nor *Listeria monocytogenes* was found. The standard deviations above one (1.0) in the fat, protein, moisture and salt contents indicated that no standard procedure was followed for producing the local cheese. The sample collection period caused differences in the microbiota, total solids of milk and cheese moisture contents, a_w and salt. The maturation period did not significantly influenced on the microbial counts, but it provided an increase in protein contents and a decrease in a_w value in cheese samples collected in July.

Keywords. sanitary conditions, microbiota, quality.

RESUMO

Este estudo avaliou as características microbiológicas e físico-químicas de leite cru e queijo colonial da região Fronteira Noroeste do Rio Grande do Sul, Brasil. Para isto, foram feitas coletas de amostras em janeiro e julho. Análises microbiológicas (bactérias aeróbias mesófilas, coliformes totais e termotolerantes, *Staphylococcus* coagulase positiva, *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*, bactérias ácido lácticas) e físico-químicas (pH, acidez, sólidos totais, proteína, lipídeos, A_w , umidade, NaCl) foram realizadas. As amostras de leite e de queijo indicaram baixa qualidade microbiológica, pois houve detecção de altos níveis de bactérias mesófilas, coliformes totais e termotolerantes e *Staphylococcus* coagulase positiva. Altas contagens de bactérias ácido lácticas foram observadas. Entretanto, não foi detectada a presença de *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*. O desvio padrão acima de um (1,0) nos conteúdos de lipídeos, proteínas, umidade e sal indicou que não houve seguimento do procedimento padrão estabelecido na produção local de queijos. O período de coleta de amostras resultou em diferenças nas análises de microbiota, sólidos totais do leite e dos queijos, o teor de umidade, A_w e sal. O período de maturação não causou significativa influência sobre as contagens microbianas, mas promoveu aumento no conteúdo de proteína e diminuição na A_w dos queijos coletados em julho.

Palavras-chave. condições sanitárias, microbiota, qualidade.

INTRODUCTION

The State of Rio Grande do Sul is currently the second largest producer of milk from Brazil. The annual production of more than 3.6 billion liters represents 12 % of the national production. The Northwest Frontier region consists of 20 municipalities, 11.5 thousand milk producers and 40 thousand people directly involved in the dairy market. More than 1,062,744 liters of milk are produced and marketed per day, which corresponds to 15.94 % of the State's dairy production¹.

The milk is processed both, in large dairy industries as in small agribusinesses and transformed into different products. Among the products of milk agro-industrialization it is the cheese production, because it is a product with increased conservation time and that adds value to the raw material.

In Brazil, it is permissible to sell cheese from pasteurized milk or raw with maturation period of more than 60 days (artisanal cheeses). An exception occurs with the cheese manufactured in dairies from Geographical Indication registered region, in which the maturation period may be less than 60 days^{2,3}. Although illegal, there is consumption of cheeses from milk without official sanitary inspection. Some dairy farmers sell part of their production to the industry and with the over plus they produce artisanal products on the property, which are destined for family consumption or marketing. Other producers turn all the milk manufactured into artisanal dairy products, allocating them to trade in property, free-trade or in small shops⁴, among the artisanal products, the cheeses stand out.

Artisanal products without sanitary inspection can become a hazard to consumers, as well as spoilage microorganisms can serve as a vehicle for pathogenic microorganisms such as *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp.⁵. Several published researches in Brazil have shown the microbiological low quality of milk and cheeses marketed, characterized by frequent contamination of total coliform, *E. coli*, *S. aureus*,

Salmonella spp. and *Listeria* spp.⁶⁻⁹.

In the microbiota of milk and artisanal cheeses, the lactic acid bacteria (LAB) are also present. They are inherent of raw material and can be responsible for sensorial characteristics of the artisanal cheeses¹⁰. LAB are Gram-positive, catalase-negative, non-sporingform and facultative anaerobic bacteria. According to the definition, LAB are bacteria able to ferment carbohydrate to lactic acid, mainly. These microorganisms even produced others antibacterial compounds including organic acids, ethanol, hydrogen peroxide, carbon dioxide, diacetyl, and bacteriocins¹¹.

Due the production of these compounds, several LAB showed antimicrobial activity against spoilage and pathogenic bacteria such as *Listeria* spp., *Staphylococcus* spp., *Salmonella* spp., *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp., and bacteria from coliform group^{10,12-18}.

The microbial groups of each milk product also vary according to geographical region where it is produced and they could be attributed to variations ratio of the utilized milk, predominating weather and processed methods used⁵. As there is no standardization in the manufacturing process as the coagulation time, type of rennet used, pressing, salting and moisture content of the final product and the great diversity of natural microbiota, it is possible to find in the market a variety of artisanal cheeses which, besides being illegal do not follow any identity and quality standard¹⁹.

The knowledge of fabrication techniques has been transferred verbally through generations. By being fabricated, in most cases, with raw milk and without the addition of lactic ferments, a diverse microbial group undesired from the milk itself and also the low sanitary conditions in which is produced. In the Northwest Frontier region of Rio Grande do Sul this cheese is called colonial. The production of the colonial cheese is homemade (artisanal) and the marketing is informal.

The use of regional products, for its quality (unique flavours) and notoriety has become a habit among the population. With the increase in demand began to appear the

fakes and the need for protection of the product, with the creation of laws.

In the current scenario commercially competitive, Geographical Indication (GI) can become a differentiator for the marketing, promoting the opening of new markets²⁰. There are several cheeses with geographical indication in the world, such as Roquefort cheese, among others²¹. In Brazil, cheeses type Serrano, Coalho, Serro, Alto da Paranaíba, Canastra e Araxa with GI are stand out^{22,23}.

It is important the microbiological and physicochemical characterization of milk and colonial cheeses produced in the North West Frontier region as well as meet the historical tradition and the manufacturing practices. This knowledge can enable improve the milking practices, production and storage of the milk, adding value and special qualities.

Because of this, it was aimed to proceed with the microbiological and physicochemical evaluation of raw milk and colonial cheeses produced in different times of the year in the North West Frontier Region of RS/Brazil in order to add value to the products of this region with the Geographical Indication.

MATERIAL AND METHODS

Samples

Ten units of farming family system were selected from seven towns in the North West Frontier Region of RS/Brazil. They were pointed out by EMATER/RS, since they produce cheese from raw milk and do not added dairy ferment.

Each unit was collected: one (01) sample of fresh milk and two (02) cheeses from the same batch, weighing approximately 500 g, with 01 day of manufacture. A sample of cheese was analyzed immediately, characterizing the Time 01 (T1). The other sample of cheese was aged for seven days under refrigeration to 7 °C, featuring Time 07 (T7). The choice of this time of maturation was determined from interviews with producers that reported this is the period in which the cheese was ripened before consumption/marketing. In each unit of production, there were two collections, one in

January 2011, featuring the summer season, with temperature between 25 and 40 °C, and another in July 2011, featuring the winter, with temperatures between 2 and 15 °C. In total, 20 samples of milk and 40 samples of cheeses were collected.

Microbiological characterization

Microbiological analysis for enumeration of total and thermotolerant coliforms, coagulase-positive *Staphylococcus* counts (CPS), aerobic mesophilic bacteria (AMB), lactic acid bacteria (LAB) and *Salmonella* spp., were performed on samples of milk and cheese, as recommended by the APHA²⁴. All media used was from Oxoid (Unipharm Ltda, Basingstoke from England).

LAB were isolated after subculturing on MRS agar, and posteriorly checked for Gram reaction, catalase activity and examined microscopically. Only Gram-positive and catalase-negative isolates were further studied of bacteriocinogenic potential.

For the *Listeria* sp. analysis the DuPont™ Lateral Flow System *Listeria* test was used. When there were positive results to *Listeria* sp. on the kit, biochemical tests such as catalase test, motility at 25 °C and 37 °C, and performance of carbohydrate metabolism tests (API® 50 CH – Biomérieux) were performed to the confirmation of species.

Physicochemical characterization

All physicochemical analyses of pH, total acidity, moisture content, total solids, total fat, protein content, salt content (NaCl) and water activity were determined according to AOAC²⁵. All analyses were carried out in triplicate.

The pH was measured directly with a pHmeter DM (Digimed – Brazil). The total acidity and NaCl were determined through titration methods. Moisture and total solids were determined by measuring the mass of food before and after the water was removed by evaporation. The water activity was measured instrumentally using a Water Activity System TESTO model 650.

RESULTS

Microbiological characterization

Table 1 shows the evolution of total and thermotolerant coliforms, CPS, AMB and LAB counts during the months of January and July. The analyses were performed on samples of milk and colonial cheeses.

The results of this study showed the AMB counts, on average, above 6 Log CFU.mL⁻¹ in both samples of milk and cheeses. In Table 1, it can be seen that both samples of milk and cheese showed, on average, concentration greater than 3 Log MPN.mL⁻¹ or g⁻¹ total coliforms. Thermotolerant coliform, as determined in the milk samples, showed 1.4 and 0.36 Log MPN.mL⁻¹ in January and in July, respectively. In samples of cheese, values, on average, above 2 Log MPN.g⁻¹ of thermotolerant coliforms were observed. The milk, cheeses T1 and cheeses T7 collected in January showed 1.6, 2.19 and 1.72 Log CFU.g⁻¹ of CPS, respectively. The samples of milk and cheeses T1 collected in July did not showed CPS counts.

The LAB counts, on average, they were above 5 Log CFU.mL⁻¹. In January as well as in July,

a gradual increase in the LAB counts of milk comparing with cheeses samples was observed. After a count of LAB, 112 characteristics colonies from MRS plates were selected for morphological characterization and catalase test. Then, 62 isolates were confirmed such as Gram-positive and catalase-negative microorganisms. It was observed that 20 isolates showed cellular morphology of bacilli and 42 of cocci.

None of the samples showed the presence of *Salmonella* spp. and *L. monocytogenes*, neither in January or in July.

Physicochemical characterization

Analyzes of physicochemical characterization of raw milk samples were performed (Table 2). On average, the samples collected in January and July showed the following results: pH 6.70 and 6.68, total acidity 0.14 g/100 g lactic acid and 0.18 g/100 g lactic acid, total solids 11.31 g/100 g and 11.16 g/100 g, protein 3.26 g/100 g and 3.55 g/100 g and total fat 3.95 g/100 g and 3.58 g/100 g, respectively. Only results of samples from total solids were influenced by collection period.

Table 1. Microbial population in milk (Log CFU.mL⁻¹) and in artisanal cheese (Log CFU.g⁻¹) from the North West Frontier region of RS/Brazil during the months of January and July¹

Microorganism	Collect period	Milk	Cheese T1*	Cheese T7**
Aerobic mesophilic bacteria	January	6.16 ± 0.59 ^{cB}	7.3 ± 0.43 ^{aB}	7.13 ± 0.81 ^{bB}
	July	6.51 ± 1.05 ^{cA}	7.53 ± 0.65 ^{bA}	7.95 ± 0.67 ^{aA}
Total coliform***	January	2.65 ± 0.67 ^{bB}	2.93 ± 0.22 ^{aB}	2.94 ± 0.19 ^{aB}
	July	2.96 ± 0.11 ^{bA}	> 3,0 ^{aA}	> 3,0 ^{aA}
Thermotolerant coliform*	January	1.4 ± 1.11 ^{cA}	2.44 ± 0.75 ^{aA}	2.21 ± 0.86 ^{bA}
	July	0.33 ± 0.51 ^{cB}	2.43 ± 0.86 ^{aA}	2.11 ± 0.91 ^{bB}
Coagulase-positive <i>Staphylococcus</i>	January	1.6 ± 2.08 ^{cA}	2.19 ± 2.94 ^{bA}	1.72 ± 2.84 ^{aA}
	July	ND ^{bB}	ND ^{bB}	1,18 ± 2,04 ^{aB}
Lactic acid bacteria	January	5.93 ± 0.76 ^{cB}	8.14 ± 0.6 ^{bA}	8.33 ± 0.45 ^{aA}
	July	5.98 ± 1.52 ^{cA}	7.44 ± 0.74 ^{bB}	7.92 ± 0.82 ^{aB}

¹Data are averages values ± standard deviations of the samples the two collections; a-c Means followed by the same letter in the row for each variable, do not differ at *p* < 0.05 significance by Tukey test; A-B Means followed by the same letter in the column for each variable, do not differ at *p* < 0.05 significance by Tukey test; *T1: Cheese with one days of aging; ** T7: Cheese with seven days of aging; ***Most probable number per milliliters (Log MPN.mL⁻¹) and per gram (Log MPN.g⁻¹); ND: Not detected

Table 2 showed the results of analyzes of physicochemical characterization of artisanal cheeses samples to protein, total fat, a_w , moisture and NaCl. On average, the samples of cheese T1 collected in January and July showed the following results: pH 6.05 and 6.20 and acidity titratable 0.30 g/100 g lactic acid and 0.41 g/100 g lactic acid, respectively. On average, the samples of cheese T7 collected in January and July, showed the following results: pH 6.02 and 6.00 and acidity titratable 0.37 g/100 g lactic acid and 0.42 g/100 g lactic acid, respectively.

DISCUSSION

The population of aerobic mesophilic bacteria (AMB) usually estimates the microbiological quality of dairy products. When present in quantities greater than 5 Log CFU.mL⁻¹ it indicates deficiencies in hygienic production while concentrations lower than 4 Log CFU.mL⁻¹ denotes good hygienic practices⁵. According to IN n° 62 of the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply – MAPA²⁶, which regulates

the standards for raw milk intended for the manufacture of pasteurized milk for direct human consumption or for processing into dairy products, this should present AMB count (called standard count on plates in that ordinance) of no more than 6 Log CFU.mL⁻¹.

The results of this study showed the milk inadequate hygienic conditions because the values of AMB, on average, above 6 Log CFU.mL⁻¹ demonstrating that the milk used for cheese production was above the maximum stipulated by Brazilian legislation. In samples collected in July, only one of milk sample were within the standard AMB and in January, three were within the parameters established by legislation. The largest number of non-standard samples in July (winter) probably occurred because the producers have greater concern for the conservation of raw material/products in summer due to high temperatures, keeping them under-cooling. In winter, with lower temperatures, producers often retain the products at room temperature (between 2 and 15 °C) which promotes the multiplication of microorganisms.

Table 2. Physicochemical characterization of samples of raw milk and artisanal cheeses from the North West Frontier region of RS/Brazil during the months of January and July¹

Parameter	Collection period	Milk	Cheese T1*	Cheese T7**
pH	January	6,7 ± 0,06 ^{aA}	6,05 ± 0,41 ^{bA}	6,02 ± 0,36 ^{cA}
	July	6,68 ± 0,11 ^{aA}	6,2 ± 0,48 ^{bA}	6,00 ± 0,41 ^{bA}
Titratable acidity (%)	January	0,14 ± 0,01 ^{bA}	0,30 ± 0,11 ^{aA}	0,37 ± 0,07 ^{aA}
	July	0,18 ± 0,02 ^{bA}	0,41 ± 0,18 ^{aA}	0,42 ± 0,14 ^{aA}
Total solids (%)	January	11,31 ± 0,41 ^A	-	-
	July	11,16 ± 2,58 ^B	-	-
Protein (g/100g)	January	3,26 ± 0,35 ^{bA}	23.09 ± 4.03 ^{aA}	24.81 ± 4.03 ^{aA}
	July	3,55 ± 0,77 ^{cA}	19.49 ± 2.83 ^{bB}	22.98 ± 3.58 ^{aA}
Total fat (g/100g)	January	3,95 ± 1,17 ^{cA}	20.57 ± 3.68 ^{bA}	22.85 ± 3.06 ^{aA}
	July	3,58 ± 0,64 ^{cA}	21.50 ± 6.90 ^{bA}	24.21 ± 5.34 ^{aA}
a_w	January	-	0.945 ± 0.02 ^{aA}	0.939 ± 0.02 ^{aA}
	July	-	0.910 ± 0.03 ^{aA}	0.871 ± 0.03 ^{bB}
Moisture (g/100g)	January	-	47.53 ± 5.48 ^{aB}	41.73 ± 4.04 ^{bB}
	July	-	50.45 ± 3.66 ^{aA}	49.00 ± 3.14 ^{aA}
NaCl (g/100g)	January	-	4.58 ± 2.62 ^{aB}	4.36 ± 2.87 ^{bB}
	July	-	5.08 ± 2.49 ^{bA}	6.08 ± 3.58 ^{aA}

¹Data are averages values ± standard deviations of the samples the two collections; a-c Means followed by the same letter in the row for each variable, do not differ at $p < 0.05$ significance by Tukey test; A-B Means followed by the same letter in the column for each variable, do not differ at $p < 0.05$ significance by Tukey test; * T1: Cheese with one days of aging; ** T7: Cheese with seven days of aging

The coliform group was used as another indicator of sanitary conditions for dairy products. Populations greater than 2 Log MPN.mL⁻¹ indicate poor hygiene practices and environmental contamination⁵. In Table 1, it can be seen that both samples of milk and cheese showed an average concentrations greater than 2 Log or MPN.mL⁻¹ or g⁻¹ thermotolerant coliforms indicating, once again, the loss sanitary conditions of the raw material and final product.

The MAPA, through the ordinance n° 146¹, establishes a maximum value of 4 Log MPN.g⁻¹ of thermotolerant coliform for high-moisture cheeses, such as those evaluated in this study. In the collection of January, six of cheese samples T1 and nine of T7 cheese samples were off the standard set by Brazilian legislation. In the collection of July, six of cheese samples T1 and two of T7 cheese samples were at odds with the established pattern.

Low counts of CPS in food are allowed, considering that only when their scores exceeded 5 Log CFU.g⁻¹ or mL⁻¹, staphylococcal enterotoxins are produced, which are responsible for food poisoning caused by these microorganisms²⁸. From the samples analyzed, three of cheeses T1 and two of cheese T7 collected in January and one of cheese T7 evaluated in July, with counts of CPS was above 5 Log CFU g⁻¹. These results indicated that these samples contained amount of cells able to produce enterotoxins at sufficient levels to cause staphylococcal intoxication. The ordinance n° 146 of MAPA¹ states that the maximum number of CPS presents in cheeses with high-moisture should be 3.7 Log CFU.g⁻¹. In the collection of January, four of cheese samples T1 and T7 three of the samples were not in accordance to the standards established by the Brazilian legislation, while the collection of July, only two of the samples of cheese T7 were not in accordance to the established standards. These results were relevant because, while the counts are lower than those necessary for the production of enterotoxins, temperature abuse during storage can provide an increase in the

population of these microorganisms.

LAB are part of the natural microbial of the cow's udder and are present naturally in the environment milking and processing. Therefore, various bacteria that belong to the group of LAB can contaminate the raw materials and processing products²⁹. Although being considered important spoilage in dairy products, the presence of LAB at high levels may interfere on the development of foodborne pathogens because they may have antimicrobial activity. Various LAB species are able to produce several substances with antimicrobial activity, such as organic acids, hydrogen peroxide, diacetyl, CO₂ and bacteriocins¹¹. This may be one of the reasons why there was a lower counts of microorganisms hygiene indicators in the different samples when wild LAB with bacteriocinogenic potential are present^{14,16,30}. The high LAB counts observed in this study may have contributed to the absence of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. as well as to decrease the CPS counts in samples of cheeses collected in January.

An increase in the counts of the different microbial groups during the maturation period occurred in the samples of this study, except to thermotolerant coliform (January and July) and AMB (January). It is a normal phenomenon and results partially from microbial multiplication curdling and partially from the physical retention of these microorganisms in the curd when whey is run off¹⁶. The decrease in the counts of thermotolerant coliform can be explained due to the drop of water activity. This group needs 0.95 of water activity to grow at temperatures near the optimum growth temperature²⁹.

Despite the high counts of AMB and coliform group, none of the samples showed the presence of *Salmonella* spp. and *L. monocytogenes*. These results were of great importance, because they are pathogenic microorganisms of importance in foods. Similar results were obtained previously by Nero et al.⁵ and Ortolani et al.¹⁶ who observed a low pathogen incidence when microbiological quality of raw milk and cheeses were poor. These data indicated direct interference with

the wild microbiota of animal origin foods, inhibiting the development and isolation of pathogens, as proposed by Jay²⁹.

Studies showed that milk and cheese produced/marketed in Brazil and worldwide, with microbiological quality deficit, were characterized by frequent contamination by pathogenic microorganisms and/or microorganism indicators at exceeding levels than those allowed by legislation³¹⁻³⁶.

Several factors influence the microbiota of dairy products, among them the season stands out. In this sense, Souza et al.³⁷ when studying the Serrano cheese observed that there was an increase of about one logarithmic cycle of milk for cheese coagulated mass when evaluating different microbial groups. The highest counts were reached after a week of maturation both in winter and in summer, decreasing during ripening. High scores were found AMB (6.07 Log CFU.mL⁻¹ in summer and 5.7 Log CFU.mL⁻¹ in winter) and a large number of total and thermotolerant coliforms in raw milk, indicating once again the deficient hygienic quality of raw material used in cheese processing. These microbial groups did not show significant variations in winter or summer, but the maturation time had a significant influence on their scores.

For physicochemical parameters of milk, the IN n° 62 of MAPA²⁶ establish that the minimum value protein and fat that raw milk should present is 2.9 and 3 g/100 g, respectively. Therefore, on average, the milk samples were within the standards established by legislation for the two parameters. The IN n° 62 of MAPA²⁶ determinate as 8.4 g/100g the standard for non fat solids in milk. There was significant difference in the values obtained between the two periods of sample collection. Analyzing the results, it was observed that in July, 70 % of the samples were not in accordance to the standards and in January, only 10 % were within the standards established.

As for acidity, the legislation stipulates that this should be between 0.14 and 0.18 g/100g lactic acid. In the collection performed in July, four of the samples were not in accordance to the standards set for this parameter, however,

the collection performed in January, all samples were within standards set by that legislation. In January, temperatures ranged between 25 and 40 ° C. Because of this, farmers have maintained their production stored in refrigerated environments. Possibly the measure adopted, avoided the proliferation of microorganisms which produce acid, justifying the acidity within the standards established by legislation in this period. Analyzing the results obtained, it was observed that in July, seven of the samples were not in accordance to the standards set in January and only one met the established limits.

Barbosa et al.³⁸, analyzed raw milk sold in the city of Queimadas/PA, which had 14 °D of acidity, being within the acceptable standards for this parameter. In relation to fat content, the authors found, on average, 2.43 g/100 g of fat content that was below minimum allowed. About total solids, the samples were in disaccord with legislation because they showed, on average, 10.37 g/100 g.

The physicochemical analyses of the cheeses can be seen in Table 2. The collection period influenced the moisture and a_w of cheeses. The highest moisture values and a_w found in July were probably because the low temperatures and relative humidity was higher at this time, making the evaporation of water and removal of whey harder. It was also observed that the collection period did not significantly affect the pH of the cheese, but it significantly affected the values of acidity. It was a consequence of the lactic acid production by LAB³⁷.

The salt, conferring the taste characteristic or enhancing flavor complements syneresis and regulates the cheese acidity, favoring the release of free water in the mass by the difference in osmotic pressure and dissolution of some proteins and their products, all of which were substances titrated like acids. During the maturation, buffer substances were released, for example, casein, which is as titratable acid. The separation of casein whey was a factor that favors the variation of pH and acidity³⁹. It may be noted, too, that the collection period significantly influenced the NaCl content of the cheeses. The standard deviation above one (1.0)

showed that differences found between cheeses due to the fact that the amount of salt added was not measured.

Values of standard deviations above one (1.0) for fat, protein, salt and moisture allow interpreting that there was no standardization in the production of artisanal cheeses from the North West Frontier region, at both the technological steps (pressing, cutting, salting, etc.) as the composition and quality of the feedstock. In this sense, the difference observed in the composition of milk used for cheese production may have contributed to the variation observed in cheeses.

Delamare et al⁴ analyzed licensed and unlicensed commercial Serrano cheeses, a traditional product from the highlands of South Brazil and their physicochemical characteristics obtaining, were corroborated with this study except to the content of total fat and NaCl.

Other study has shown that the season in which dairy products were produced also has an influence on their physicochemical characteristics. Souza et al³⁷ evaluated the influence of the seasons on the physicochemical composition of Serrano cheese and observed that there was a significant decrease in pH during the first week of maturation, both in winter (5.1) as in summer (5.3). However, in relation to water activity (a_w), there was a decrease pronounced in summer, probably due to large water evaporation and hydrolysis of proteins, caused by higher temperatures this time of year. The moisture of the cheeses varied significantly between the two periods, being lower in summer due to high temperature and the low relative humidity that caused an intense dehydration.

There was a relationship between development of microorganism and physicochemical parameters of the products. Foods with high pH, high water activity or low NaCl content are appropriated to growth at pathogens and spoilage microorganisms. This relationship can be observed in studies performed Souza et al³⁷, Kongo et al³⁴ and Dalla Rosa et al⁴⁰. However, in this study, this was not observed because in July when there

was lower pH, lower a_w , higher acidity and higher NaCl, the counts of coliform and aerobic mesophilic bacteria were higher than in January.

CONCLUSION

High counts of microorganism as *Staphylococcus* and coliforms indicated poor quality of the milk and artisanal cheeses, although *Salmonella* spp. or *L. monocytogenes* were not detected. The great variation in physicochemical characteristics of the cheeses indicates that there is not standardization of the raw material or the technological steps. The collection period resulted in differences in the microbiota, total solids of milk and cheese moisture content, a_w and salt. The maturation period did not significantly influenced the microbial count, but it provided an increase in protein and decrease in a_w cheeses collected in July.

ACKNOWLEDGMENTS

Department of Science, Innovation and Technology Development of the State of RS. Reference term n° 0001/2009. Institutional Program of Scientific Initiation Scholarships Regional University of North West RS. Post-graduate Program in Food Science and Technology, Faculty of Agronomy Eliseu Maciel, Federal University of Pelotas.

REFERENCES

1. Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Governo do RS - EMATER/RS. Informações Agropecuárias. 2015. Available from: [<http://www.emater.tche.br/site/servicos/informacoes-agropecuarias.php#.VaRLSPiViko>].
2. Brasil. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Portaria no 146 de 07 de março de 1996. Dispõe sobre o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Produtos Lácteos. Diário Oficial [da] União da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 1996. Seção 1, n° 48, p. 3977.

3. Brasil. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa no 30 de 07 de agosto de 2013. Dispõe sobre produção artesanal de queijos brasileiros. Diário Oficial [da] União da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 2013. Seção 1, nº 152, p. 19.
4. Delamare APL, Andrade CCP, Mandelli F, Almeida RC, Echeverrigaray S. Microbiological, Physico-Chemical and Sensorial Characteristics of Serrano, an Artisanal Brazilian Cheese. *Food Nutr Sci*. 2012;3:1068-75. [DOI: 10.4236/fns.2012.38142]
5. Nero LA, Mattos MR, Barros MAF, Ortolani MBT, Beloti V, Franco BDGM. *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in raw milk produced in Brazil: Occurrence and interference of indigenous microbiota in their isolation and development. *Zoonoses Public Health*.2008;55(6):299-305. [DOI: 10.1111/j.1863-2378.2008.01130.x]
6. Catão RMR, Ceballos BSO. *Listeria* spp., Coliformes totais e fecais e *E. coli* no leite cru e pasteurizado de um aindústria de laticínios, no estado da Paraíba (Brasil). *Ciênc Tecnol Aliment*. 2001;21(3):281-7. [DOI: 10.1590/S0101-20612001000300006].
7. Santana RF, Santos DM, Martinez ACC, Lima AS. Qualidade microbiológica de queijo-coalho comercializado em Aracaju, SE. *Arq Bras Med Vet e Zootec*.2008;60(6):1517-22.
8. Loguercio AP, Aleixo JAG. Microbiologia de queijo tipo Minas Frescal produzido artesanalmente. *Ciênc Rural*.2001;31(6):1063-7. [DOI: 10.1590/S0103-84782001000600024].
9. Salotti BM, Amaral LA, Cortez AL. Qualidade Microbiológica Do Queijo Minas Frescal Comercializado. *Arq Inst Biol*.2006;73(2):171-5.
10. Nespolo CR, Brandelli A. Production of bacteriocin-like substances by lactic acid bacteria isolated from regional ovine cheese. *Brazilian J Microbiol*.2010;41(4):1009-18. [DOI: 10.1590/S1517-838220100004000020].
11. Deegan LH, Cotter PD, Hill C, Ross P. Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *Int Dairy J*.2006;16(9):1058-71. [DOI: 10.1016/j.idairyj.2005.10.026].
12. Ahmadova A, Todorov SD, Choiset Y, Rabesona H, Mirhadi Zadi T, Kuliyevev A, et al. Evaluation of antimicrobial activity, probiotic properties and safety of wild strain *Enterococcus faecium* AQ71 isolated from Azerbaijani Motal cheese. *Food Control*.2013;30(2):631-41. [DOI: 10.1016/j.foodcont.2012.08.009].
13. Biscola V, Todorov SD, Capuano VSC, A briouel H, Gálvez A, Franco BDGM. Isolation and characterization of a nisin-like bacteriocin produced by a *Lactococcus lactis* strain isolated from charqui, a Brazilian fermented, salted and dried meat product. *Meat Sci*.2013;93(3):607-13. [DOI: 10.1016/j.meatsci.2012.11.021].
14. Bello B, Cocolin L, Zeppa G, Field D, Cotter PD, Hill C. Technological characterization of bacteriocin producing *Lactococcus lactis* strains employed to control *Listeria monocytogenes* in Cottage cheese. *Int J Food Microbiol*. 2012;153(1-2):58-65. [DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.10.016].
15. Liu SN, Han Y, Zhou ZJ. Lactic acid bacteria in traditional fermented Chinese foods. *Food Res Int*.2011;44(3):643-51. [DOI: 10.1016/j.foodres.2010.12.034].
16. Ortolani MBT, Yamazi AK, Moraes PM, Viçosa GN, Nero LA. Microbiological quality and safety of raw milk and soft cheese and detection of autochthonous lactic acid bacteria with antagonistic activity against *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., and *Staphylococcus aureus*. *Foodborne Pathog Dis*. 2010;7(2):175-80. [DOI: 10.1089/fpd.2009.0390].
17. Moraes PM, Perin LM, Todorov SD, Silva A, Franco BDGM, Nero LA. Bacteriocinogenic and virulence potential of *Enterococcus* isolates obtained from raw milk and cheese. *J Appl Microbiol*. 2012;113(2):318-28. [DOI: 10.1111/j.1365-2672.2012.05341.x].
18. Moraes PM, Perin LM, Tassinari Ortolani MB, Yamazi AK, Viçosa GN, Nero LA. Protocols for the isolation and detection of lactic acid bacteria with bacteriocinogenic potential. *LWT - Food Sci Technol*. 2010;43(9):1320-4. [DOI: 10.1016/j.lwt.2010.05.005].
19. Fox PF, Cogan TM. Factors that affect the quality of cheese. *Cheese Chem Phys Microbiol*.2004;1:583-608. [DOI: 10.1016/S1874-558X(04)80084-8].

20. Nunes KS, Mello RC. Um estudo de caso sobre a Indicação Geográfica como estratégia para a comercialização do queijo Minas artesanal do Serro. *Rev Eletr Admin Ciênc Contábeis*.2013;2(1):1-20.
21. Silva FCA, Saboia LAB. A valorização de produtos através da Indicação Geográfica. 2013. [access 2015/07/03]. Available from: [http://uniformoticias.unifor.br/index.php?option=com_content&view=article&id=594&Itemid=31].
22. Dias JC. Uma longa e deliciosa viagem: o primeiro livro da história do queijo no Brasil. São Paulo: Barleus, 2010. 161 p.
23. Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional. Ministério da Cultura. Serviço Público Federal. Certidão do Registro do modo artesanal de fazer queijo de Minas, nas Regiões do Serro e nas Serras da Canastra e do Salitre. Data do Registro: 13 jun. 2008. Brasília: Departamento do Patrimônio Imaterial do Instituto do Patrimônio Histórico e Artístico Nacional, 2008. 2 p.
24. American Public Health Association - APHA. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4 th, Washington: APHA Press; 2001.
25. Association of Official Analytical Chemists - AOAC. Official methods of analysis. 17 th, Washington, DC: AOAC; 2000.
26. Brasil. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa no 62, de 29 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os Regulamentos Técnicos de Produção, Identidade, Qualidade, Coleta e Transporte de Leite. Diário Oficial [da] União da República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 29 dez 2011. Seção 1, nº 251, p.6.
27. Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Dispõe sobre o Regulamento Técnico Sobre Padrões Microbiológicos Para Alimentos. Diário Oficial [da] União da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 12 jan 2001. Seção 1, nº 7, p. 45.
28. Santana EHW De, Beloti V, Aragon-Alegro LC, Mendonça MBOC. Estafilococos em Alimentos. *Arq Inst Biol*.2010;77:545-54.
29. Jay J. Microbiologia de Alimentos. 6 ed. Porto Alegre: Artmed; 2005.
30. Hermanns G, Funck GD, Schmidt JT, Pereira JQ, Brandelli A, Richards NSPS. Evaluation of probiotic characteristics of lactic acid bacteria isolated from artisan cheese. *J Food Saf*.2014;34(4):1-8. [DOI: 10.1111/jfs.12138].
31. Costa Sobrinho PDS, Marçal FCA, Pinheiro JS, Almeida HG, Pires CV, Santos AS. Bacteriological quality of raw milk used for production of a Brazilian farmstead raw milk cheese. *Foodborne Pathog Dis*. 2012;9(2):138-44. [DOI: 10.1089/fpd.2011.1010].
32. Silva WP, Laer AE V., Lima AS, Techera SC, Mata MM, Jantzen MM. Status higiênico-sanitário de queijos do tipo Minas produzidos de forma artesanal e comercializados em Pelotas, RS. *Rev Inst Lat Cândido Tostes*.2006;61(349):31-6.
33. Cremonesi P, Perez G, Pisoni G, Moroni P, Morandi S, Luzzana M, et al. Detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolate in raw milk cheese. *Lett Appl Microbiol*.2007;45(6):586-91. [DOI: 10.1111/j.1472-765X.2007.02231.x].
34. Kongo JM, Malcata FX, Ho AJ, Wiedmann M. Detection and characterization of *Listeria monocytogenes* in Sao Jorge (Portugal) cheese production. *J Dairy Sci*.2006;89(11):4456-61. [DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(06)72494-8].
35. Menéndez S, Godínez R, Centeno JA, Rodríguez-Otero JA. Microbiological, chemical and biochemical characteristic of 'Tetilla' raw cows-milk cheese. *Food Microbiol*. 2001;18(2):151-8. [DOI: 10.1006/fmic.2000.0385].
36. Salih ZA, Sulieman AME, Elkhalfifa EA, Ali AO. Chemical and microbiological characteristic of white cheese (Jibna-beida) produced in Sudan. *Food Public Health*.2012;2(6):259-264. [DOI: 10.5923/j.fph.20120206.11].
37. Souza CFV, Dalla Rosa T, Zachia Ayub MA. Changes in the microbiological and physicochemical characteristics of Serrano cheese during manufacture and ripening. *Brazilian J Microbiol*.2003;34:260-6. [DOI: 10.1590/S1517-83822003000300016].

38. Barbosa AAS, Pires VCF, Barbosa AS, Canuto TM, Araújo P, Nunes LS. Características físico-químicas e microbiológicas do leite cru e pasteurizado consumido no município de Queimadas, PB. I Congresso Norte Nordeste de Química; abril de 2007; Natal: ANNQ. Available from: [<http://www.annq.org/congresso2007/trabalhosapresentados/T127.pdf>]

39. Nuch E, Guedes FF, Vargas L, Koch FF. Caracterização dos queijos artesanais produzidos em Viamão, no Estado do Rio Grande do Sul, quanto à evolução físico-química e microbiológica. *Rev Vet Foco*. 2004;2(1):15-24.

40. Rosa TD, Wassermann GE, De Souza CFV, Caron D, Carlini CR, Ayub MAZ. Microbiological and physicochemical characteristics and aminopeptidase activities during ripening of Serrano cheese. *Int J Dairy Technol*. 2008;61(1):70-9. [DOI: 10.1111/j.1471-0307.2008.00361.x].

Sobrevivência de patógenos de origem alimentar aderidos em aço inoxidável após aplicação de óleo essencial de *Cymbopogon flexuosus*

Survival of foodborne pathogens adhered to the stainless steel after applying the *Cymbopogon flexuosus* essential oil

RIALA6/1660

Gleyca Ferreira de BARROS, Camila Ribeiro ROCHA*, Roberta Torres CARELI, Francielle Patrícia Evangelista MENDES, Anna Christina de ALMEIDA, Eduardo Robson DUARTE, Diogo França ARRUDA

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

Recebido: 09.07.2015 - Aceito para publicação: 22.09.2015

RESUMO

Foi avaliada a atividade antimicrobiana de diferentes concentrações do óleo essencial (OE) de *Cymbopogon flexuosus* sobre as estirpes padrão de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella Choleraesuis* aderidas em superfície de aço inoxidável AISI 304 #4. Inicialmente, as concentrações inibitórias mínimas (CIM) e as concentrações bactericidas mínimas (CBM) do OE foram determinadas pela técnica de macrodiluição em caldo. Posteriormente, a adesão e a formação de biofilme em superfícies de aço inoxidável foram avaliadas por 15 h a 37 °C sob agitação, e a ação sanitizante do OE contra as células aderidas nos cupons após 20 e 40 min de contato. O valor da CIM encontrada para todas as espécies foi de 7,5 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$, e esta concentração foi utilizada para o preparo da solução sanitizante. Após ambos os períodos de sanitização constatou-se a remoção total das células aderidas para as espécies de *E. coli* e *S. Choleraesuis*. Não foi possível eliminar as células aderidas de *S. aureus*, contudo, houve uma redução quando comparada ao número de células aderidas antes de serem submetidas aos tratamentos de sanitização. O OE de *C. flexuosus* pode ser uma alternativa no controle microbiano em superfícies durante o processamento de alimentos.

Palavras-chave. segurança alimentar, capim-limão, adesão bacteriana, ação antimicrobiana.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the antimicrobial activity of different concentrations of essential oil (EO) of *Cymbopogon flexuosus* on the standard strains of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Salmonella Choleraesuis* adhered to the stainless steel surface AISI 304 #4. Initially, the minimum inhibitory concentrations (MIC) and the minimum bactericidal concentrations (MBC) were determined by means of EO macrodilution broth assay. Subsequently, the adhesion and the biofilm formation on stainless steel surface were evaluated for 15 h at 37 °C under agitation, and also the OE sanitizing action against adherent cells on the coupons after 20 and 40 min of contact. The MIC value found for all species was 7.5 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$, which is the concentration used for preparing the sanitizing solution. A complete removal of adhered cells of *E. coli* and *S. Choleraesuis* occurred after being exposed during both periods of time. The adhered cells of *S. aureus* were not removed; however, a reduction in the number of adhered cells was detected when compared to that quantity showed before being subjected to sanitizing treatments. The EO of *C. flexuosus* might be an alternative for microbial control in surfaces during food processing.

Keywords. food safety, lemongrass, bacterial adhesion, antimicrobial action.

INTRODUÇÃO

Na indústria processadora de alimentos, um dos problemas que pode ocorrer quando alguns cuidados higiênico-sanitários não são realizados corretamente, está relacionado à contaminação bacteriana, que pode ocasionar a deterioração dos alimentos contaminados, a redução da vida de prateleira destes alimentos e, além disso, causar problemas na saúde do consumidor¹.

Segundo Milezzi², biofilmes bacterianos possuem resistência maior a processos de higienização quando comparada às células dispersas e livres presentes em superfície. Por isso, a higienização deve ser realizada periodicamente para evitar que células planctônicas se multipliquem e formem biofilmes.

O processo de higienização de equipamentos nas indústrias inclui a limpeza e a sanitização, por meio da aplicação de diversos produtos, com objetivo de eliminar micro-organismos, resíduos orgânicos e minerais aderidos à superfície³. O agente sanitizante utilizado deve ser bem selecionado, levando em conta sua ação antimicrobiana, alteração das características sensoriais dos alimentos, segurança no manuseio, estabilidade da solução, corrosões nos equipamentos e desenvolvimento de compostos indesejáveis⁴.

Vários estudos já foram realizados com óleos essenciais extraídos de plantas medicinais, devido às suas propriedades antimicrobianas, com a finalidade de elaborar sanitizantes naturais para controlar o crescimento microbiano, em substituição a agentes sintéticos, detergentes e sanitizantes que provocam impactos negativos ao ambiente. Aproximadamente 3.000 óleos essenciais são conhecidos, sendo que cerca de 300 são importantes para as indústrias farmacêuticas, agrônomicas, de alimentos, de cosméticos e perfumaria⁵. Dentre estes, destaca-se o óleo essencial (OE) de *Cymbopogon flexuosus*, conhecido comercialmente como

lemongrass e popularmente como capim-limão da Índia Oriental⁶.

A ação antibacteriana dos óleos essenciais ocorre devido a seus compostos e pela característica lipofílica de suas moléculas, que lhes confere a capacidade de interagir e atravessar a parede celular das bactérias; o óleo essencial adere à membrana citoplasmática e altera moléculas de polissacarídeos, ácidos graxos e fosfolipídios presentes na membrana, promovendo aumento da permeabilidade da membrana⁷, cuja expansão e fluidez, associada à exposição ao óleo essencial, pode ocasionar a perda de vários compostos celulares, como íons, DNA e proteínas, e levar à morte celular⁸.

O objetivo deste estudo foi avaliar a ação antibacteriana do OE de *Cymbopogon flexuosus* (capim-limão) sobre biofilmes formados por *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella Choleraesuis*, aderidos sobre superfícies de aço inoxidável.

MATERIAL E MÉTODOS

As estirpes bacterianas avaliadas fazem parte da bacterioteca do Laboratório de Microbiologia Aplicada do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 8739 e *Salmonella Choleraesuis* ATCC 10708. Essas culturas foram mantidas em tubos com tampa apegada com capacidade de 1 mL, contendo BHI e glicerol a 30 % mantidos a -20 °C. Para o preparo das suspensões, a cultura foi ativada por duas vezes consecutivas em 10 mL de caldo BHI e incubada a 37 °C por 24 h, obtendo-se uma concentração final de 10⁸ UFC.mL⁻¹.

O OE de *Cymbopogon flexuosus* foi extraído na empresa Ferquima Indústria e Comércio Ltda e, de acordo com o fornecedor, os componentes majoritários desse óleo foram neral (34,3 %) e geranial (44,6 %).

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

A determinação da CIM e da CBM do OE de *C. flexuosus* foi realizada pelo método de macrodiluição em caldo, de acordo com a norma dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactéria de crescimento aeróbico⁹.

Foram preparadas 2,5 mL de soluções contendo caldo BHI, *Tween* 80 e OE com concentrações de 7,5; 15; 30; 60; 120; 240; 480; 960 $\mu\text{L.mL}^{-1}$. Em seguida, a cada tubo foram adicionados 12,5 μL da suspensão de cada micro-organismo, separadamente. Os tubos foram homogeneizados e incubados a 35 °C por 24 h, sendo que após o período de incubação, uma alçada dos meios de cultura que não apresentaram turvação foi transferida para a superfície de placas contendo ágar caseína de soja (TSA), as quais foram incubadas a 35 °C por 24 h, para observar eventual crescimento microbiano e determinar a CBM.

Adesão bacteriana e formação de biofilmes em aço inoxidável

Cupons de aço inoxidável AISI 304 #4 com dimensões de 2,0 x 2,0 x 0,1 cm, foram lavados em água potável e detergente neutro; em seguida, foram enxaguados com água destilada, sanitizados com álcool etílico 70 % (v/v), secos a 60 °C por 2 h e esterilizados em autoclave a 121 °C por 15 min¹⁰.

Cinco cupons foram transferidos para erlenmeyer contendo 99 mL de caldo nutriente inoculado com 1 mL de suspensão bacteriana de modo a obter uma concentração celular de 10^5 UFC.mL⁻¹, para cada sistema experimental. Esse sistema foi mantido por 15 h a 37 °C sob agitação a 50 rpm, em mesa agitadora orbital¹¹. O procedimento foi repetido para cada micro-organismo teste.

Após o período de tratamento para adesão, realizou-se a quantificação de células planctônicas, portanto, não aderidas aos cupons de aço inoxidável. Para tanto, alíquotas de 1000 μL de cada amostra foram submetidas a diluições decimais seriadas e,

100 μL de cada diluição foi plaqueado por espalhamento em superfície de TSA e incubado a 37 °C por 24 h, segundo *Compendium of Methods for the Examination of Foods*¹².

Efeito antibacteriano do OE sobre as células aderidas

Após 15 h de adesão bacteriana, com auxílio de uma pinça esterilizada, os cupons foram retirados do contato com a suspensão bacteriana e imersos separadamente em solução salina a 0,85 % (m/v) por 1 min, para a remoção das células não aderidas à superfície de aço inoxidável. Em seguida, os cupons foram submetidos aos tratamentos com OE de capim limão, sendo transferidos a tubos contendo solução salina a 0,85 % (m/v) adicionada de 0,8 % de *Tween* 80 e volume adequado de OE para obter 10 mL de solução com concentração final equivalente a CIM determinada previamente, sendo mantidos em contato com a solução por 20 e 40 min de contato, a 25 °C sob condições estáticas, para avaliar a ação sanitizante do OE. Após o tratamento, as células bacterianas sobreviventes foram quantificadas.

O procedimento foi realizado com solução controle, composta pelos mesmos diluentes descritos, porém sem a adição do OE.

Quantificação de células aderidas

A quantificação das células sésseis nos cupons foi realizada após o período de 15 h para a adesão, assim como após a exposição por 20 e 40 min ao OE e à solução controle.

Cada cupom foi imerso, separadamente, em solução salina 0,85 % (m/v) para retirar células planctônicas e/ou resíduos da solução sanitizante¹³. Em seguida, cada cupom foi transferido para 10 mL de solução salina 0,85 % (m/v) e sonicado por 2 min em banho de ultrassom Altsonic Clean 3IA (Alt*) com 40 kHz, para remover as células sobreviventes aderidas nas superfícies dos cupons. A partir de 1000 μL dessa solução, foram realizadas diluições decimais seriadas sucessivas, as quais foram plaqueadas em TSA e incubadas a 37 °C por

24 h. Após o período de incubação, foi realizada a contagem da população bacteriana presente e os resultados foram expressos em UFC.cm⁻², segundo Careli et al¹⁴.

Análise estatística

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado com três repetições por tratamento.

Para verificar o efeito antibacteriano do OE sobre as células sésseis, os valores de UFC.cm⁻² foram convertidos em escala logarítmica para atender a pressuposição de normalidade.

Esse experimento foi realizado em esquemas de parcelas subdivididas, onde as soluções sanitizantes corresponderam às parcelas e os tempos de contato representaram às subparcelas. Todas as análises foram realizadas a 5 % de probabilidade com o auxílio do pacote estatístico *Statistical Analysis System* (SAS)¹⁵.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

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

Verificou-se que 7,5 µL.mL⁻¹ foi a menor concentração de OE de capim-limão capaz tanto de inibir o crescimento bacteriano, como provocar a morte, para as três cepas utilizadas.

Adukwu et al¹⁶ avaliaram a CIM e CBM do OE de *C. flexuosus*, pela técnica de microtitulação em placas de 96 poços, sobre cinco cepas de *S. aureus* de origem hospitalar e encontraram CIM de 0,06 % (v/v) e CBM de 0,125 % (v/v) para todas as cepas avaliadas.

Brugnera, Oliveira e Piccoli¹⁷ demonstraram atividade antibacteriana do OE de *C. citratus* (capim-limão) frente à *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, tendo encontrado CIM de 3,90 µL.mL⁻¹ para todas as cepas analisadas.

As variações dos valores da CIM e CBM encontrados nos diversos estudos podem ser justificadas pela diferença da técnica aplicada, do micro-organismo estudado, da espécie da planta e pelas características do óleo utilizado¹⁸.

Adesão bacteriana e formação de biofilme em superfícies de aço inoxidável

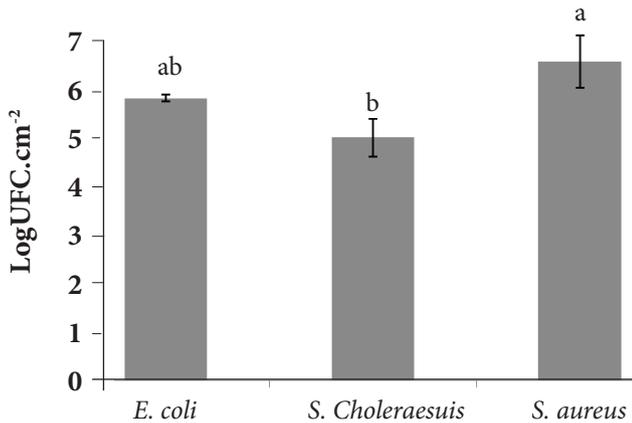
As concentrações das células planctônicas em Caldo Nutriente tiveram um aumento de até três ciclos logarítmicos após 15 h a 37 °C, tendo sido obtida população média de 8 logUFC.mL⁻¹.

Segundo Andrade, Bridgman e Zottola¹⁹, os micro-organismos em suspensão quando entram em contato com uma superfície podem se aderir e até formar biofilmes e, de acordo com Oulahal et al²⁰, micro-organismos em estado planctônico podem receber algum estímulo que os levam a aderir a superfícies. Embora esse processo necessite de maior elucidação, alguns fatores passíveis de influenciá-lo foram descritos, como pH, concentração e biodisponibilidade de nutrientes, presença de compostos orgânicos e inorgânicos e temperatura.

Neste estudo, diferentes graus de adesão aos cupons de aço inoxidável foram observados. Verificou-se que *S. aureus* apresentou maior capacidade de adesão, atingindo contagem média de 6,11 log UFC.cm⁻² ($p < 0,05$), seguido de *E. coli* e *S. Choleraesuis* (Figura 1). Apesar das diferenças constatadas na adesão, verificou-se elevada concentração de células aderidas, sendo preocupante para a indústria de alimentos, tanto pelo fato destes micro-organismos serem classificados como patogênicos e oferecerem risco à saúde, como pelo fato do número elevado de células sésseis poder dificultar o procedimento de sanitização das superfícies e permitir a transferência de contaminação microbiana para outras áreas e equipamentos¹⁹.

Segundo Andrade, Bridgman e Zottola¹⁹, para ser considerado biofilme, é necessária a adesão no mínimo de 10⁷ UFC.cm⁻² de superfície. Considerando isso, neste estudo verificou-se a adesão bacteriana em aço inoxidável, porém não houve a formação de biofilme por *S. aureus*, *E. coli* e *S. Choleraesuis*.

Brabes²¹ constatou contagens de *Staphylococcus* spp. entre 5,75 a 6,01 logUFC.cm⁻² em aço inoxidável após 24 h de incubação a 30 °C, enquanto Boari et al²² observaram que, após 10 dias, o número de células de



Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Duncan ($p > 0,05$)

Figura 1. Quantidade média de células bacterianas aderidas em cupons de aço inoxidável, após de 15 h de incubação a 37 °C sob agitação

S. aureus aderidas a superfície de aço inoxidável e cultivadas em leite desnatado atingiram $1,7 \times 10^8$ UFC.cm⁻²; $2,5 \times 10^7$ UFC.cm⁻² e $3,7 \times 10^4$ UFC.cm⁻² a 18 °C, 7 °C e 4 °C, respectivamente, demonstrando que a temperatura é um fator determinante no desenvolvimento microbiano, e como tal, pode afetar a adesão bacteriana e a formação de qualquer biofilme.

Ação do OE de *C. flexuosus* na remoção de células bacterianas aderidas em aço inoxidável

A concentração do OE de capim-limão utilizada foi $7,5 \mu\text{L.mL}^{-1}$, determinada pelo teste da CIM, sendo que sua ação sanitizante frente às espécies bacterianas pôde ser observada a partir da contagem de células viáveis após a exposição dos cupons de aço inoxidável, cujos resultados são apresentados na Tabela 1.

Constatou-se que o OE de *C. flexuosus* reduziu totalmente o número de células sésseis de *E. coli* e *S. Choleraesuis* dos cupons de aço inoxidável, não tendo sido verificada diferença significativa ($p > 0,05$) entre os tempos de 20 e 40 min de contato. Nesse caso, o mais viável é utilizar o menor tempo de contato para a sanitização da superfície (Tabela 1).

Entretanto, para *S. aureus*, a solução sanitizante provocou somente a redução no número de células aderidas ($P < 0,05$), contudo sem sua eliminação. Esse fato é um agravante, pois biofilmes podem se tornar fortemente aderidos as superfícies e, posteriormente partes deles podem se desprender e contaminar outras superfícies ou produtos alimentícios²³. Observou-se maior eficiência na redução da concentração celular de *S. aureus* aderida após 40 min de contato com o sanitizante ($p < 0,05$); porém a contagem de células sobreviventes permaneceu

Tabela 1. População bacteriana aderida na superfície de aço inoxidável, em log UFC.cm⁻², após exposição à solução de $7,5 \mu\text{L.mL}^{-1}$ OE de *Cymbopogon flexuosus* e à solução controle

Micro-organismos	Tempo de contato				CV (%)
	20 minutos		40 minutos		
	Controle	<i>C. flexuosus</i>	Controle	<i>C. flexuosus</i>	
<i>E. coli</i>	3,43aA	0,00bB	3,45aA	0,00bB	14,39
<i>S. Choleraesuis</i>	3,27aA	0,00bB	3,17aA	0,00bB	8,26
<i>S. aureus</i>	5,91aA	5,79bA	6,08aB	5,05bB	7,99

Médias seguidas na mesma linha por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5 % de probabilidade; letras maiúsculas referem-se aos tempos de contato e letras minúsculas referem-se aos tratamentos (sanitização com OE e solução controle); CV: Coeficiente de variação

alta, considerando tratar-se de uma espécie bacteriana patogênica.

Nas condições deste estudo, a solução sanitizante contendo OE de *C. flexuosus* a $7,5 \mu\text{L.mL}^{-1}$ foi considerada eficiente na remoção de células de *E. coli* e *S. Choleraesuis* aderidas aos cupons, entretanto, como houve a recuperação células viáveis de *S. aureus* aderidas ao aço inoxidável após os tratamentos, pode-se constatar uma maior resistência dessa espécie ao OE. Segundo Chavant et al²⁴, micro-organismos em biofilmes são considerados mais resistentes aos agentes antimicrobianos do que células em estado planctônico, podendo persistir e sobreviver após processo de sanitização, representando fonte original de contaminação de alimentos, com conseqüentes perdas econômicas e vinculação de doenças alimentares.

De acordo com McDonnell e Russel²⁵, a resistência de micro-organismos a agentes sanitizantes pode ser uma característica própria do micro-organismo ou adquirida por mutação mediada por plasmídios ou transposons. Sander et al²⁶ indicam que as bactérias, quando entram em contato com desinfetantes por um período prolongado, podem desenvolver resistência e bactérias do mesmo gênero e espécie podem apresentar diferentes graus de sensibilidade a um desinfetante.

Valeriano et al¹³ verificaram que o óleo essencial de capim-limão (*C. citratus*) foi eficiente na remoção de células aderidas e biofilmes formados por *Salmonella* Enterica, após 240 h a 37 °C em superfície de aço inoxidável. Esses autores demonstraram que a solução com óleo essencial de capim-limão na concentração $7,8 \mu\text{L.mL}^{-1}$, após 10 min de exposição, foi capaz de reduzir a contagem de células aderidas de $4,20 \log \text{UFC.cm}^{-2}$ para $3,56 \log \text{UFC.cm}^{-2}$ e, após 20 e 40 min de tratamento, conseguiu remover totalmente as células aderidas nos cupons de aço inoxidável.

Oliveira et al¹¹ observaram a ação do OE de capim-limão sobre biofilmes formados por *Listeria monocytogenes* por um período de 3 e 240 h em aço inoxidável. Notaram que,

após 15 e 60 min de contato da solução do óleo essencial com a superfície dos cupons não ocorreu remoção total dos biofilmes formados, mas ocorreu uma redução significativa na contagem de células.

Millezi et al² utilizaram solução de hidróxido de sódio juntamente com óleo essencial de capim-limão com concentração de $31 \mu\text{L.mL}^{-1}$ para remoção de biofilmes formados por *Aeromonas hydrophila* em aço inoxidável; esta solução detergente sanitizante reduziu a população bacteriana, sendo que obtiveram menores valores de $\log \text{UFC.cm}^{-2}$ em comparação ao biofilme maduro sem tratamento.

CONCLUSÃO

As soluções preparadas com OE de capim-limão foram capazes de inibir o crescimento das espécies bacterianas analisadas e as soluções sanitizantes contendo o OE, na concentração de $7,5 \mu\text{L.mL}^{-1}$, mostraram ser eficientes na redução de células bacterianas aderidas em aço inoxidável AISI 304#4.

A aplicação de soluções contendo óleo essencial de *C. flexuosus* em procedimentos de higienização pode ser uma alternativa para o controle de bactérias patogênicas aderidas às superfícies de aço inoxidável de equipamentos e utensílios envolvidos no processamento de alimentos. Contudo, são necessários testes toxicológicos para avaliar o efeito nocivo desse produto na concentração sugerida neste trabalho.

AGRADECIMENTOS

CNPq, FAPEMIG, CAPES e PRPq/UFGM.

REFERÊNCIAS

1. Oliveira DCV. Produção de biofilmes por *Salmonella* sp. isolada de frango [dissertação de mestrado]. Botucatu (SP): Universidade Estadual Paulista; 2011.
2. Millezzi AF. Ação de óleos sobre biofilmes formados por *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* [tese de doutorado]. Lavras (MG): Universidade Federal de Lavras; 2012.

3. Rossi ACR, Porto E. A importância da elaboração de procedimentos de higienização considerando a presença de biofilmes. *SBC*.2009;março/abril:40-1.
4. Nascimento HM, Delgado DA, Barbaric IF. Avaliação da aplicação de agentes sanitizantes como controladores do crescimento microbiano na indústria alimentícia. *Rev Ceciliansa*.2010;2(1):11-3.
5. Lebert I, Leroy S, Talon R. Effect of industrial and natural biocides on spoilage, pathogenic and technological strains grown in biofilm. *Food Microbiol*. 2007;24(3):281-7. [DOI: 10.1016/j.fm.2006.04.011].
6. May A, Bovi AO, Maia NB, Moraes ARA, Pinheiro MQ, Mario M. Influência do intervalo entre cortes sobre a produção de biomassa de duas espécies de capim limão. *Hortic Bras*.2008;826(3):379-82. [DOI: 10.1590/S0102-05362008000300017].
7. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils: a review. *Food Chem Toxicol*.2008;46(2):446-75. [DOI: 10.1016/j.fct.2007.09.106].
8. Oliveira MMM. Óleos essenciais no controle de biofilmes bacterianos: *Listeria monocytogenes* e *Echerichia coli* enteropatogênica [tese de doutorado]. Lavras (MG): Universidade Federal de Lavras; 2011.
9. National Committee for Clinical Laboratory Standards – NCCLS. Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico: Norma Aprovada. 6ª ed. Norma NCCLS M7-A6; 2003.
10. Rossoni EMM, Gaylarde CC. Comparison of sodium hypochlorite and peracetic acid as sanitising agents for stainless steel food processing surfaces using epifluorescence microscopy. *Int J Food Microbiol*. 2000;61(1):81-5. [DOI: 10.1016/S0168-1605(00)00369-X].
11. Oliveira MMM, Brugnera DF, Cardoso MG, Alves E, Piccoli RH. Disinfectant action of *Cymbopogon* sp. essential oils in different phases of biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface. *Food Control*.2010;21(4):549-53. [DOI: 10.1016/j.foodcont.2009.08.003].
12. American Public Health Association – APHA. Standard methods for the examination of water and wastewater. 21ª ed. Washington: American Water Works, Water Environment Federation; 2005.
13. Valeriano C, Oliveira TL, Carvalho SM, Cardoso MG, Alves E, Piccoli RH. The sanitizing action of essential oil-based solutions against *Salmonella enterica* serotype Enteritidis S64 biofilm formation on AISI 304 stainless steel. *Food Control*.2012;25(2):673-7. [DOI: 10.1016/j.foodcont.2011.12.015].
14. Careli RT, Andrade NJ, Soares NF, Júnior JIR, Rosado MS, Bernardes PC. The adherence of *Pseudomonas fluorescens* to marble, granite, synthetic polymers, and stainless steel. *Cienc Tecnol Aliment*.2009;29(1):171-6. [DOI: 10.1590/S0101-20612009000100026].
15. Statistical Analysis System – SAS. SAS/ETS user's guide. Version 9.0 ed. Cary: SAS Institute; 2010.
16. Adukwu EC, Allen SCH., Phillips CA. The anti-biofilm activity of lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*) and grapefruit (*Citrus paradisi*) essential oils against five strains of *Staphylococcus aureus*. *J Appl Microbiol*.2012;113(5):1217-27. [DOI: 10.1111/j.1365-2672.2012.05418.x].
17. Brugnera DF, Oliveira MMM, Piccoli RH. Essential oils of *Cymbopogon* sp. in the control of foodborne pathogenic bacteria. *Alim Nutr*. 2011;22(3):339-43.
18. Fennell CW, Lindsey K L, Mc Gaw LJ, Sparg SG, Stafford GI, Elgorashi EE, et al. Assessing African medicinal plants for efficacy and safety: pharmacological screening and toxicology. *J Ethnopharmacol*.2004;94(2-3):205-17. [DOI: 10.1016/j.jep.2004.05.012].
19. Andrade NJ, Bridgman TA, Zottola EA. Bacteriocidal activity of sanitizers against *Enterococcus faecium* attached to stainless steel as determined by plate count and impedance methods. *J Food Prot*. 1998;61(7):833-8.

20. Oulahal N, Brice W, Martial A, Degraeve P. Quantitative analysis of survival of *Staphylococcus aureus* or *Listeria innocua* on two types of surfaces: polypropilene and stainless steel in contact with three different dairy products. Food Control. 2008;19(2):178-85. [DOI: 10.1016/j.foodcont.2007.03.006].
21. Brabes KCS. Identificação de capacidade de adesão de *Staphylococcus* spp. isolados de manipuladores, superfícies e ar de ambientes de uma indústria de laticínios [tese de doutorado]. Viçosa (MG): Universidade Federal de Viçosa; 2005.
22. Boari CA, Alves MP, Tebaldi VM, Savian TV, Piccoli RH. Formação de biofilme em aço inoxidável por *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* usando leite e diferentes condições de cultivo. Cienc Tecnol Aliment.2009;29(4):886-95.
23. Joseph B, Otta SK, Karunasagar I, Karunasagar I. Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. Int J Food Microbiol.2001;64(3):367-72. [DOI: 10.1016/S0168-1605(00)00466-9].
24. Chavant P, Martinie BG, Talon R, Hébraud M, Bernardi T. A new device for rapid evaluation of biofilm formation potential by bacteria. J Microbiol Methods. 2007;68(3):605-12. [DOI: 10.1016/j.mimet.2006.11.010].
25. McDonnell G, Russel, D. Antiseptics and disinfectants: activity, action and resistance. Clin Microbiol Rev.1999;12(1):147-79.
26. Sander JE, Hofacre CL, Cheng IH, Wyatt RD. Investigation of resistance of bacteria from commercial poultry sources to commercial disinfectants. Avian Dis.2002;46(4):997-1000.

Identificação da microbiota fúngica anemófila em uma indústria de polpas de frutas e susceptibilidade antifúngica a terpenos

Identification of the airborne fungal microbiota in a fruit pulp industry and antifungal susceptibility to terpenes

RIALA6/1661

Viviane Priscila Barros de MEDEIROS¹, Gezaildo Santos SILVA¹, Edeltrudes de Oliveira LIMA², Fillipe de Oliveira PEREIRA^{1*}

*Endereço para correspondência: ¹Unidade Acadêmica de Saúde, Centro de Educação e Saúde, Universidade Federal de Campina Grande, Olho D'Água da Bica, s/n, Cuité, Paraíba, Brasil, CEP: 58175-000. Tel: 83 3372-1900 / 9816-8410. E-mail: fillipepereira@ufcg.edu.br

²Laboratório de Micologia, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brasil

Recebido: 24.06.2015 - Aceito para publicação: 27.08.2015

RESUMO

Os fungos anemófilos são importantes agentes contaminantes e deteriorantes de alimentos, especialmente frutas e seus produtos. Neste estudo foram identificados os principais gêneros fúngicos presentes na microbiota anemófila de uma indústria de polpas de frutas, localizada no interior da Paraíba, e foi investigada a ação antifúngica de terpenos como possível alternativa de controle do crescimento fúngico. Os fungos foram coletados pela exposição de placas de Petri contendo meio Agar Sabouraud dextrose com cloranfenicol (50 µg/mL). Após a incubação a 28 °C durante sete dias, foram realizadas a contagem das unidades formadoras de colônias e sua descrição. Os fungos foram identificados pela análise morfológica das colônias isoladas. O principal gênero isolado em toda indústria foi o dematiáceo *Cladosporium* spp. Os ensaios de sensibilidade foram efetuados aplicando-se a técnica de difusão em meio sólido com discos contendo os terpenos: carvacrol, citronelal, citral, linalol, timol, terpinoleno, p-cimeno e β-cariofileno. A efetividade de alguns destes terpenos frente a cepas do *Cladosporium* spp foi demonstrada, com destaque para o citral e carvacrol. A indústria de polpas de frutas apresenta ar de ambiente vulnerável, especialmente contaminação por *Cladosporium* spp. Pretende-se impulsionar novos estudos com produtos naturais na perspectiva de diminuir a contaminação fúngica em alimentos.

Palavras-chave. fungos anemófilos, *Cladosporium*, indústria, polpa de frutas, terpenos.

ABSTRACT

Airborne fungi are important food contaminants and spoiling agents, especially in fruits and their derivatives. This study aimed at identifying the main fungi in the airborne microbiota in a fruit pulp industry, located in Paraíba State, and to investigate the antifungal action of terpenes as an alternative for controlling fungal growth. The Petri plates containing Sabouraud dextrose agar with chloramphenicol (50 µg/mL) were exposed for collecting the fungi. The plates were incubated at 28 °C for seven days; then the colony forming units counting, and description were performed. The identification of fungi was performed by the morphological analysis of isolated colonies. The main group of fungi isolated throughout the industry was *Cladosporium* spp. Antifungal tests were performed by diffusion technique in solid medium with discs containing terpenes: carvacrol, citronellal, citral, linalool, thymol, terpinolene, p-cymene and β-caryophyllene. The effectiveness of some of these terpenes against *Cladosporium* spp. strains was shown, especially citral and carvacrol. Based on these results, the fruit pulp industry shows vulnerable ambient air, notably with high contamination by *Cladosporium* spp. Thus, it is aimed at promoting further studies with natural drugs in order to reduce the fungal contamination in food.

Keywords. airborne fungi, *Cladosporium*, industry, fruit pulp, terpenes.

INTRODUÇÃO

Devido ao seu conteúdo nutricional e qualidades organolépticas, os alimentos são excelentes substratos para a multiplicação de micro-organismos como bactérias, leveduras e fungos filamentosos, sendo facilmente contaminados durante sua manipulação e processamento¹. Na indústria de alimentos, os fungos anemófilos são micro-organismos que se apresentam como importantes agentes contaminantes de alimentos, causando sua deterioração, redução no valor nutricional e alterando suas qualidades organolépticas².

Especialmente nas frutas e em seus produtos como polpas de frutas, os fungos são responsáveis por causar mudanças indesejáveis, tanto na composição química quanto na estrutura e aparência, que podem levar ao seu descarte, e ocasionar perda econômica³. Em alguns casos, a contaminação de alimentos por fungos pode se tornar um problema de saúde pública, pois alguns gêneros são produtores de toxinas e micotoxinas oriundas de seu metabolismo secundário⁴.

Segundo Zandonadi et al⁵, a contaminação dos alimentos se inicia na produção da matéria-prima e se estende às etapas de transporte, recepção, armazenamento. Durante a manipulação das frutas, pode ocorrer contaminação devido condições precárias de higiene dos manipuladores, equipamentos, utensílios, ambiente e condições inadequadas de armazenamento dos produtos prontos para consumo. Em virtude de sua composição, as polpas de frutas constituem-se em bons substratos para o desenvolvimento de fungos, que podem causar deterioração e sérios danos à saúde do consumidor. Para garantir a oferta de um produto isento de contaminações, é necessário que se realize um rigoroso controle do processo produtivo e do produto final⁶.

Portanto, a caracterização dos fungos anemófilos é um fator importante para avaliar se os locais de produção industrial possuem microbiota fúngica equilibrada para evitar possíveis contaminações. A higiene industrial e o monitoramento microbiológico do ar

ambiente asseguram boas condições sanitárias para evitar a ocorrência de contaminações nos produtos produzidos⁷.

Considerando a linha de produção de uma indústria, fonte potencial de contaminação, torna-se importante estudar estratégias seguras que possam minimizar ou eliminar o risco de contaminação. É dentro desse contexto que muitos estudos de atividade biológica *in vitro*, incluindo atividade antifúngica, têm sido realizados com produtos naturais, a exemplo de terpenos. Os terpenos são compostos largamente distribuídos na natureza, constituindo uma ampla variedade de compostos vegetais e dotados de potencial atividade antifúngica contra fungos patogênicos e contaminantes⁸.

O objetivo deste estudo foi analisar a microbiota fúngica do ar ambiente de uma indústria produtora de polpas de frutas situada no estado da Paraíba/Brasil, verificar os principais setores de maior veiculação fúngica e a sensibilidade de alguns isolados fúngicos frente à ação de terpenos. Desta forma, este trabalho colabora para futuros estudos com fungos anemófilos e sua relação com alimentos, impulsionando a implementação de estratégias higiênico-sanitárias como forma de contribuir para um controle efetivo das condições higiênico da escala produtiva.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta das amostras

Foram realizadas coletas de amostras do ar ambiente em setores representativos da linha de produção de uma indústria de polpas de frutas, localizada no estado da Paraíba/Brasil, entre agosto e novembro de 2013, em dias alternados e sempre no turno da manhã, pois por ser um período sem ocorrência de chuvas na região onde se localiza a indústria, haveria possibilidade de ocorrer maior circulação aérea entre os setores e provável disseminação das estruturas fúngicas.

A indústria analisada foi subdividida em seis setores distintos, cujas funções no processo de produção de polpas de frutas compreenderam: (I) área do processamento

de polpa de frutas, por ser o local destinado a todos os processos de acabamento ou refino e embalagem como obtenção do produto final; (II) área de recebimento da matéria prima, onde são realizados os procedimentos de pré-preparo das frutas, como seleção, pré-lavagem, higienização, descasque, corte e despulpamento das frutas; (III) câmara de congelamento, local de armazenamento das frutas semiprocessadas e das polpas; (IV) câmara de refrigeração, para armazenamento das polpas embaladas e prontas para a comercialização; (V) área livre, local de armazenamento de caixas plásticas para o transporte de frutas, plataforma de descarga de alguns produtos, bem como de entrada e saída de fornecedores, visitantes e funcionários da empresa; e (VI) área de empacotamento das polpas de frutas, onde é realizado o empacotamento das polpas em embalagens destinadas comercialização.

A coleta de fungos anemófilos foi feita pela técnica de exposição de placas de Petri (90 x 15 mm), descartáveis e estéreis, contendo o meio ágar Sabouraud dextrose (ASD) com cloranfenicol (50 µg/mL). Para a coleta da amostra do ar ambiente, foram expostas 05 placas em cada setor da indústria, em pontos equidistantes do ambiente, com distância mínima de 1,50 m do solo. Cada uma das placas foi exposta por 15 minutos para coleta de possíveis contaminantes presentes no ar ambiente por gravitação^{9,10}.

Identificação dos fungos anemófilos

Após o tempo de exposição, as placas foram fechadas, identificadas e conduzidas ao Laboratório de Bioquímica e de Microbiologia do Centro de Educação e Saúde da Universidade Federal de Campina Grande, Brasil. As placas foram incubadas a temperatura de 28 °C, por 5 a 7 dias, para posterior contagem das unidades formadoras de colônias (UFC), isolamento e descrição. A identificação de fungos anemófilos isolados foi realizada com base no estudo da macromorfologia e micromorfologia das colônias, sendo que a macromorfologia baseou-se na observação da pigmentação, textura, consistência e forma do verso e reverso das colônias desenvolvidas e da velocidade de

crescimento das mesmas, enquanto que a micromorfologia foi realizada pela técnica de microcultivo, onde foram visualizadas as estruturas como presença de blastoconídios, pseudohifas, clamidoconídios, forma e coloração das hifas vegetativas e reprodutivas, a disposição dos órgãos de frutificação com os conídios ou esporos, o que proporciona uma correta identificação das colônias selecionadas nas placas de coleta^{10,11}.

A técnica de microcultivo para fungos filamentosos foi realizada sobre lâmina em uma câmara úmida. Com o auxílio de alça descartável estéril, pequenos blocos do ASD foram transferidos para a superfície de uma lâmina de microscopia estéril, em uma câmara úmida. Em seguida, dois fragmentos do micélio das cepas isoladas foram dispostos sobre a superfície dos blocos de ASD e cobertos com uma lamínula. As lâminas foram incubadas a 28 °C por cinco dias. Após o período de incubação, as lâminas foram coradas com lactofenol algodão e cobertas com uma lamínula. As estruturas micromorfológicas foram examinadas em microscópio óptico comum, com aumento de 400x.

Para as leveduras, a técnica de microcultivo foi adaptada: uma pequena porção de ágar fubá, estéril e fundido, foi colocada sobre uma lâmina. Após solidificação, foram feitas três estrias partindo de colônias jovens de cada cepa de levedura, sobre o meio de cultura. Uma lamínula flambada foi colocada sobre o ágar inoculado. As lâminas foram incubadas por 48 horas em câmara úmida, semelhante a que foi descrita acima^{9,10}.

Avaliação da atividade antifúngica

Para os ensaios de atividade antifúngica, foram selecionadas quatro cepas de *Cladosporium* spp, o gênero predominante no ar ambiente da indústria de polpas de frutas. As cepas, isoladas do setor V foram devidamente etiquetadas com os seguintes códigos de identificação: 5A7, 5B5, 5E3 e 5D1, sendo o número 5 para identificar o setor V, a letra para identificar a placa (de A a E) e segundo número para identificar a colônia isolada.

Para induzir a formação de conídios, as cepas de *Cladosporium* spp foram cultivadas em agar batata a 28 °C por 7 dias. As recentes colônias fúngicas foram cobertas com solução salina estéril (NaCl 0,9 %), e as suspensões feitas por suaves agitações com auxílio de uma pipeta de transferência. A mistura resultante de conídios e fragmentos de hifas foi transferida para tubos de ensaio esterilizados. Após agitação, os conídios foram contados utilizando-se hemocitômetro e ajustados com solução salina para fornecer um inóculo de aproximadamente 10⁶ conídios/mL^{11,12}.

O teste de sensibilidade para avaliar a atividade antifúngica dos terpenos foi realizado pela técnica de difusão em meio sólido com discos de papel de filtro¹³. Em placas de Petri (90 x 15 mm), descartáveis e estéreis, foi dispensado 1 mL da suspensão fúngica. Em seguida, 20 mL do meio ASD, fundido a 50 °C, foram acrescidos e o sistema foi homogeneizado. Após solidificação do meio, discos de papel de filtro (CECON[®]) embebidos com 10 µL dos terpenos carvacrol, citronelal, citral, linalol, timol, terpinoleno, p-cimeno e β-cariofileno (Sigma-Aldrich[®]) *in natura* foram depositados na superfície do meio de cultura. As placas foram incubadas a 28 °C por até 7 dias, sendo que após a incubação, procedeu-se à leitura das zonas de inibição.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A indústria analisada foi subdividida em seis setores distintos, onde eram realizadas diferentes atividades no processo de produção de polpas de frutas, sendo que, considerando a indústria como um todo, foram obtidos 196 isolados fúngicos, com identificação de 13 gêneros distintos (Tabela 1).

Os gêneros de maior incidência de isolamento foram, em ordem decrescente, *Cladosporium* spp (142 UFC), seguido por *Rhizopus* spp (14 UFC), *Mycelia sterilia* (11 UFC), *Penicillium* spp (9 UFC) e as leveduras do gênero *Candida* (9 UFC). O gênero *Aspergillus* aparece em menor frequência (8 UFC), sendo encontrado apenas nos dois últimos setores analisados. Leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae*

foram encontradas somente na câmara de refrigeração (2 UFC). *Hendersonula* spp, *Hortaea werneckii*, *Acremonium* spp, *Rhodotorula rubra*, *Curvularia* spp e *Chaetomium* spp foram encontrados em menor incidência (1 UFC, cada um).

A Tabela 1 também apresenta a frequência de detecção de fungos anemófilos em função da área amostrada, sendo possível verificar maior incidência de população fúngica no ar ambiente dos setores II e V da empresa, área onde é recebida a matéria prima e área livre da indústria, respectivamente. Segundo Stelato et al¹⁴, os fungos podem contaminar os alimentos por diversos meios, como a água, o solo, o ar e manipuladores, podendo causar a deterioração microbiana dos alimentos. Considerando a forma de veiculação das estruturas fúngicas pelo ar e as características de cada setor, pode-se inferir que estes resultados provavelmente se devem ao fato destas áreas estarem expostas à grande circulação de ar, devido o trânsito de pessoas e mercadorias, o qual é um importante disseminador de esporos e conídios fúngicos.

Com relação aos demais setores da indústria, deve-se destacar o setor III - câmara de congelamento, na qual não foi verificado crescimento fúngico. De forma contrária, a câmara de refrigeração apresentou resultados positivos em relação ao desenvolvimento de fungos.

Fungos anemófilos podem surgir a partir de diversas fontes, incluindo matérias primas, sistemas de ar condicionado e durante a produção de alimentos específicos. Para o seu desenvolvimento, necessitam de quantidade de água livre, pH e temperatura adequados, além da disponibilidade de nutrientes. Entretanto, sabe-se que algumas condições, como baixas temperaturas, podem inibir o desenvolvimento de alguns isolados fúngicos detectados neste estudo; alguns podem manter-se em estado de latência, até que encontrem condições favoráveis ao seu desenvolvimento, quando podem crescer e afetar negativamente a segurança e a qualidade dos produtos. Fungos psicrofílicos, em especial, apresentam esta capacidade de resistência e são bastante isolados em ambientes que refrigeram alimentos como carnes, frutas

Tabela 1. Frequência de isolamento de fungos anemófilos em uma indústria de polpas de frutas

Isolado	N isolados					
	Na indústria	Setor				
		I	II	IV	V	VI
<i>Cladosporium</i> spp	142 (72,5%)	20	24	15	68	15
<i>Mycelia sterilia</i>	11 (5,6%)	4	5	-	-	2
<i>Rhizopus</i> spp	9 (4,6%)	4	4	-	1	-
<i>Penicillium</i> spp			-	-	8	1
<i>Candida glabrata</i>	6 (3,1%)	1	-	4	-	1
<i>Aspergillus flavus</i>	5 (2,6%)	-	-	-	-	5
<i>Aspergillus niger</i>	3 (1,5%)	-	-	1	2	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2 (1,0%)	-	-	2	-	-
<i>Curvularia</i> spp	1 (0,5%)	-	1	-	-	-
<i>Hortaea werneckii</i>	1 (0,5%)	-	-	1	-	-
<i>Acremonium</i> spp	1 (0,5%)	-	-	-	1	-
<i>Hendersonula</i> spp	1 (0,5%)	-	-	1	-	-
<i>Chaetomium</i> spp	1 (0,5%)	-	1	-	-	-
<i>Candida albicans</i>	1 (0,5%)	-	-	1	-	-
<i>Candida krusei</i>	1 (0,5%)	-	-	1	-	-
<i>Candida guilliermondii</i>	1 (0,5%)	-	-	1	-	-
<i>Rhodotorula rubra</i>	1 (0,5%)	-	-	-	1	-
Total	196	29	36	34	74	23

e produtos hortícolas^{15,16}. Altunatmaz et al¹⁵ identificaram, em refrigeradores de alimentos na cidade de Edirne (Turquia), os gêneros fúngicos *Alternaria* spp, *Aspergillus* spp, *Botrytis* spp, *Cladosporium* spp, *Fusarium* spp, *Mucor* spp, *Penicillium* spp, *Rhizopus* spp, *Candida* spp e *Saccharomyces* spp, alguns destes semelhantes aos fungos isolados no presente estudo.

Os fungos podem causar danos para à saúde humana devido a sua capacidade de produzir metabólicos tóxicos denominados micotoxinas, as quais podem causar afecções de saúde como náuseas, dermatites, danos hepáticos e renais, até óbito de acordo com composto ou quantidade ingerida⁶. É importante salientar que essas toxinas não são eliminadas totalmente durante os processos industriais, podendo provocar imunocomprometimento e muitas doenças em geral crônicas, ressaltando-se afecções renais e hepáticos

aos consumidores de possíveis alimentos contaminados¹⁷. Dentre os fungos isolados, algumas espécies do gênero *Aspergillus*, *Rhizopus* e *Penicillium* são importantes produtores de micotoxinas. Segundo Vecchia e Castilho-Fortes¹⁸, entre os tóxicos contaminantes de alimentos, podemos destacar as aflatoxinas produzidas por espécies do gênero *Aspergillus*, as quais são tóxicas e carcinogênicas para homens e animais, tornando-se assim, um fator preocupante para a indústria alimentícia. A micotoxina patulina pode ser produzida por várias espécies dos gêneros *Penicillium* e *Aspergillus*, sendo frequentemente encontrada em frutas, verduras e cereais.

O gênero *Cladosporium*, detectado em praticamente todos os setores analisados, abrange muitas espécies de fungos contaminantes e oportunistas dematiáceos, sendo encontrados ubiquamente como saprófitas no solo e no ar de

ambientes, incluindo áreas de processamento de alimentos¹⁹. De acordo com Zoppaset al²⁰, *Cladosporium* spp é um dos fungos de maior concentração no ar, particularmente em regiões quentes, como no Curimataú da Paraíba onde está localizada a indústria produtora de polpa de frutas avaliada. Estes autores afirmam, ainda, que há uma correlação positiva entre a temperatura e negativa com umidade²⁰. Embora não seja relatado que espécies de *Cladosporium* produzem micotoxinas de grande preocupação, é válido ressaltar que são fungos produtores de compostos orgânicos voláteis associados com odores que alteram as características organolépticas dos alimentos²¹.

Conhecer o nível de contaminação, os tipos e a persistência de fungos anemófilos em locais de estoque de alimentos como polpa de frutas, além dos ambientes envolvidos no processamento, são importantes itens de efetivos programas de monitoramento higiênico-sanitário da indústria²². Souza et al²³ afirmam que a microbiota que contamina os produtos de frutas é normalmente proveniente das condições da matéria-prima e da lavagem às quais estas são submetidas, além das condições higiênico-sanitárias dos manipuladores, equipamentos e ambiente industrial em geral.

Diante do fato do ar ambiente da linha de produção de uma indústria ser uma fonte potencial de contaminação, torna-se importante estudar estratégias seguras que possam minimizar ou eliminar este risco de contaminação. Nesta perspectiva de controle higiênico-sanitário e, considerando que o gênero *Cladosporium* spp foi o mais prevalente, foi verificada a atividade antifúngica de alguns terpenos, como o carvacrol, citronelal, citral, linalol, timol, terpinoleno, p-cimeno e β -cariofileno, frente a algumas cepas de *Cladosporium* spp isoladas. A atividade antifúngica dos produtos naturais foi considerada positiva quando a média aritmética dos diâmetros dos halos de inibição foram superiores ou iguais a 10 mm, em pelo menos 50 % das cepas testadas²⁴. Os resultados referentes à sensibilidade das cepas fúngicas frente à ação de terpenos são mostrados na Tabela 2.

Tabela 2. Diâmetros médios das zonas de inibição de crescimento fúngico (mm) produzidas pelos terpenos frente às cepas de *Cladosporium* spp

Terpenos	<i>Cladosporium</i> spp			
	5A7	5B5	5E3	5D1
Carvacrol	35	30	30	40
Citral	40	42	46	45
Citronelal	0	17	0	15
Linalol	0	0	0	0
Timol	0	0	0	0
Terpinoleno	0	0	0	0
p- cimeno	0	0	0	0
β -cariofileno	0	0	0	0

Os terpenos que apresentaram maior atividade antifúngica foram citral e carvacrol. Os demais terpenos não exerceram atividade frente às cepas de *Cladosporium* spp testadas.

Estudos comprovam a potente atividade antifúngica do citral frente a leveduras do gênero *Candida*²⁵ e outros fungos como *Colletotrichum musae*, *Colletotrichum gloeosporioides* e *Fusarium subglutinans* sp.²⁶, *Penicillium italicum* e *Rhizopus stolonifer*²⁷. Estudo realizado por Lima et al²⁸ comprova a atividade antifúngica do carvacrol sobre levedura *Candida albicans*, possivelmente pela interação com ergosterol da membrana fúngica. Abbaszadeh et al²⁹ comprovaram a atividade antifúngica de carvacrol frente a fungos de importância na área de alimentos, como os gêneros *Aspergillus* e *Cladosporium*.

A partir dos resultados apresentados neste estudo, nota-se a grande vulnerabilidade do ar ambiente, tendo em vista o elevado número de colônias encontradas, em especial do gênero *Cladosporium*. Isto pode representar risco diário de contaminação da matéria-prima e até mesmo das polpas fabricadas, podendo ainda causar danos à saúde dos consumidores. Partindo desta problemática, o presente trabalho pode impulsionar indústrias de alimentos a adotar padrões higiênicos que visem minimizar possíveis contaminações fúngicas.

Diante da diversidade de gêneros

fúngicos encontrados na indústria e dos resultados encontrados nos testes de sensibilidade antifúngica frente aos terpenos, são necessários outros estudos na perspectiva de tornar possível o desenvolvimento de formulações que auxiliem na diminuição da contaminação fúngica de frutas e de outras matérias-primas a partir destes produtos naturais.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) – Brasil, a Universidade Federal de Campina Grande e à indústria de polpas de frutas pelo auxílio na execução do trabalho.

REFERÊNCIAS

1. Riedel G. Controle sanitário dos alimentos. 3ª ed. São Paulo: Atheneu; 2005.
2. Mageste JO, Pereira TCD, Silva GA, Barros RAM. Estudo da microbiota fúngica anemófila de uma indústria farmacêutica de juiz de fora – MG. *Rev Facider*.2012;1(1):1-7.
3. Silva LF. Fungos: um estudo sobre sua ocorrência nos alimentos [trabalho de conclusão de curso]. Belo Horizonte (MG): Universidade Federal de Minas Gerais; 2008.
4. Souza PMS, Andrade SL, Lima AF. Pesquisa, isolamento e identificação de fungos anemófilos em restaurantes self-service do centro de Maceió /AL. *Cad Grad Cienc Biol Saúde*.2013;1(3):147-54.
5. Zandonadiet RP, Botelho RBA, Sávio KEO, Akutsu RC, Araújo WMC. Atitudes de risco do consumidor em restaurantes de auto-serviço. *Rev Nutr*.2007;20(1):19-26. [DOI: dx.doi.org/10.1590/S1415-52732007000100002].
6. Dal RI, Sebastiany E. Avaliação do Processo Produtivo e da Qualidade de Polpas de Frutas Comercializadas em Boa Vista/RR [dissertação de mestrado]. Boa Vista (RR): Universidade Federal de Roraima;2006.
7. Corrêa B. Micotoxinas humanas e micetismos. *In: Zaitz, C Campbell, Marques AS, Ruiz LRB, Souza VM. Compêndio de micologia médica*. Rio de Janeiro: Medsi; 1998.
8. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils - a review. *Food Chem Toxicol*.2008;46(2):446-75. [DOI: 10.1016/j.fct.2007.09.106].
9. Kern ME, Blevins KS. *Micologia Médica: texto e atlas*. 2ed. São Paulo: Premier; 1999.
10. Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, Heins-Vaccari EM, Melo NT. *Tratado de micologia médica*. 9 ed. São Paulo: Sarvier; 2002.
11. Rasooli I, Abyaneh MR. Inhibitory effect of thyme oils on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *Food Control*.2004;15(6):479-83. [DOI: 10.1016/j.foodcont.2003.07.002].
12. Mota KSL, Pereira FO, Oliveira WA, Lima IO, Lima EO. Antifungal activity of *Thymus vulgaris* L. essential oil and its constituent phytochemicals against *Rhizopus oryzae*: interaction with ergosterol. *Molecules*.2012;17(12):14418-33. [DOI: 10.3390/molecules171214418].
13. Hadecek F, Greger H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. *Phytochem Anal*. 2000;11(3):137-47. [DOI: 10.1002/(SICI)1099-1565(200005/06)11:3<137::AID-PCA514>3.0.CO;2-I].
14. Stelato MM, Concon MM, Shimada D, Srebernich SM. Contaminação fúngica em barras de cereais comercializadas. *Rev Inst Adolfo Lutz*.2010;69(3):285-90.
15. Altunatmaz SS, Issa G, Aydin A. Detection of airborne psychrotrophic bacteria and fungi in food storage refrigerators. *Braz J Microbiol*.2012;43(4):1436-43. [DOI: dx.doi.org/10.1590/S1517-83822012000400027].
16. Sorensen LM, Jacobsen T, Nielsen PV, Frisvad JC, Koch AG. Mycobiota in the processing areas of two different meat products. *Int J Food Microbiol*. 2008;124(1):58-64. [DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.02.019].
17. Gava AJ, Silva CAB, Frias JRG. *Tecnologia de alimentos: Princípios e Aplicações*. São Paulo: Nobel; 2009.
18. Vecchia AD, Fortes CR. Contaminação fúngica em granola comercial. *Cienc Tecnol Aliment*. 2007;27(2):324-7. [DOI: dx.doi.org/10.1590/S0101-20612007000200020].

19. Engelhart S, Glasmacher A, Simon A, Exner M. Air sampling of *Aspergillus fumigatus* and other thermotolerant fungi: comparative performance of the Sartorius MD8 airport and the Merck MAS-100 portable bioaerosol sampler. *Inter J Hyg Environ Health*. 2007;210(6):733-9. [DOI: 10.1016/j.ijheh.2006.10.001].
20. Zoppas BCA, Valencia-Barrera RM, Fernández-González D. Distribuição de esporos de *Cladosporium* spp. no ar atmosférico de Caxias do Sul, RS, Brasil, durante dois anos de estudo. *Rev Bras Alerg Immunopatol*. 2011;34(2):55-8.
21. Rivas S, Thomas CM. Molecular interactions between tomato and the leaf mold pathogen *Cladosporium fulvum*. *Ann Rev Phytopathol*. 2005;43:395-436. [DOI: 10.1146/annurev.phyto.43.040204.140224].
22. Portnoy JM, Barnes CS, Kennedy K. Sampling for indoor fungi. *J Allergy Clin Immunol*. 2004; 113(2):189-98. [DOI: 10.1016/j.jaci.2003.11.021].
23. Souza GC, Carneiro JGG J, Gonsalves HRO. Qualidade microbiológica de polpas de frutas congeladas produzidas no município de Russas - CE. *ACSA*. 2011;7(3):1-5.
24. Lima EO, Gompertz OF, Giesbrecht AM, Paulo MQ. In vitro antifungal activity of essential oils obtained from officinal plants against dermatophytes. *Mycoses*. 1993;36(9-10):333-6. [DOI: 10.1111/j.1439-0507.1993.tb00777.x].
25. Lima IO, de Medeiros Nóbrega F, de Oliveira WA, de Oliveira Lima E, Albuquerque Menezes E, Cunha FA, et al. Anti-*Candida albicans* effectiveness of citral and investigation of mode of action. *Pharm Biol*. 2012;50(12):1536-41. [DOI: 10.3109/13880209.2012.694893].
26. Garcia R, Alves ESS, Santos MP, Viegas Aquije GME, Fernandes AAR, dos Santos RB, et al. Antimicrobial activity and potential use of monoterpenes as tropical fruits preservatives. *Braz J Microbiol*. 2008;39(1):163-8. [DOI: 10.1590/S1517-838220080001000032].
27. Saddiq AA, Khayyat SA. Chemical and antimicrobial studies of monoterpene: Citral. *Pesticide Biochem Physiol*. 2010;98(1):89-93. [DOI: 10.1016/j.pestbp.2010.05.004].
28. Lima IO, Pereira FO, Oliveira WA, Lima EO, Menezes EA, Cunha FA, et al. Antifungal activity and mode of action of carvacrol against *Candida albicans* strains. *J Essent Oil Res*. 2013;25(2):138-42.
29. Abbaszadeh S, Sharifzadeh A, Shokri H, Khosravi AR, Abbaszadeh A. Antifungal efficacy of thymol, carvacrol, eugenol and menthol as alternative agents to control the growth of food-relevant fungi. *J Mycol Med*. 2014;24(2):51-6. [DOI: 10.1016/j.mycmed.2014.01.063].

Microrganismos de interesse sanitário em sushis

Microrganisms of sanitary interest in sushi

RIALA6/1662

Thiago José Ferreira Flor de SOUZA^{1*}, Joelinton do Nascimento SILVA¹, Carlos Roberto Marinho da SILVA FILHO¹, Jeronimo Galdino dos SANTOS²

*Endereço para correspondência: ¹Departamento de Gestão e Tecnologia Agroindustrial, Universidade Federal da Paraíba, Campus de Bananeiras, Rua Benjamim Sobrinho, 378, Centro, Pilões, Paraíba, PB, Brasil. CEP 58393-000. Tel: 83 9608-6482. E-mail: thiago-flor@hotmail.com

²Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Departamento de Gestão e Tecnologia Agroindustrial, Universidade Federal da Paraíba, Campus de Bananeiras, PB, Brasil

Recebido: 04.05.2015 - Aceito para publicação: 27.08.2015

RESUMO

Com o crescente consumo de comidas típicas da culinária japonesa, a preocupação com a saúde pública tem sido constante. Neste estudo a qualidade sanitária de sushis servidos na cidade de João Pessoa/PB foi investigada seguindo-se as recomendações microbiológicas para pesquisas de coliformes totais e termotolerantes, estafilococos coagulase positiva, *Salmonella*, *Bacillus cereus*, mesófilos e fungos filamentosos e não filamentosos. As amostras foram coletadas de cinco restaurantes (A, B, C, D e E) que servem comida japonesa na cidade de João Pessoa/PB, e analisadas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade Federal da Paraíba. Das amostras estudadas, 80 % apresentaram contagem de coliformes termotolerantes acima dos limites estabelecidos pela legislação brasileira, 6,6 % tinham contagem de estafilococos coagulase positiva acima do limite, e em 13,3 % foram detectadas espécies potencialmente patogênicas de *Salmonella*. Em nenhuma amostra houve isolamento de *B. cereus*. Apesar da inexistência de padrão estabelecido para sushi na legislação vigente, quanto à contagem de bactérias aeróbias mesófilas e fungos filamentosos e não filamentosos, a pesquisa foi realizada com o intuito de avaliar as condições higiênico-sanitárias do produto. Considerando-se os resultados obtidos, os alimentos analisados apresentam risco potencial para a saúde dos consumidores.

Palavras-chave. pescado cru, segurança alimentar, microbiologia de alimentos.

ABSTRACT

Considering the growing consumption of typical foods of Japanese cuisine, it has been of constant concern for public health. In this study, the sanitary quality of sushi served in the city of João Pessoa/PB was investigated following the recommendations for the microbiological analyses of total and fecal coliforms, coagulase-positive staphylococci, *Salmonella*, *Bacillus cereus*, mesophilic and filamentous and non-filamentous fungi. The samples were collected from five restaurants (A, B, C, D and E) serving Japanese food in the city of João Pessoa/PB; and they were analyzed in the Food Microbiology Laboratory of Federal University of Paraíba. Among the analyzed samples, 80 % showed fecal coliform counts above the limits established by Brazilian legislation, 6.6 % had coagulase positive staphylococci counts above the limit, and in 13.3 % potentially pathogenic species of *Salmonella* sp were isolated. *B. cereus* was not isolated from any analyzed sample. In spite of the unavailability of a pattern for sushi in the current legislation for mesophilic aerobic bacteria and filamentous and non-filamentous fungi counting, the present study was carried out in order to assess the sanitary conditions of this food. Considering the achieved results, the analyzed food showed a potential risk to the consumers health.

Keywords. raw fish, food protection, food microbiology.

INTRODUÇÃO

No Brasil, o hábito de ingerir peixe cru sob a forma de sushi transformou-se num verdadeiro modismo alimentar nos grandes centros urbanos. O consumo crescente desse tipo de alimento vem se tornando uma preocupação para a saúde pública, não só pelo fato de ser um produto altamente perecível, mas também, devido aos aspectos higiênicossanitários de sua preparação e conservação. Com o crescimento desses serviços, observa-se que os alimentos ficaram mais expostos a uma série de perigos e/ou oportunidades de contaminações microbianas associadas a práticas incorretas de manipulação e processamento.

Na preparação de iguarias como o sushi, preparadas manualmente, além da contaminação do pescado, o contato direto do alimento com as mãos pode levar ao aumento da incidência de patógenos como *Staphylococcus aureus* e coliformes termotolerantes. Segundo Silva¹, preparações muito manipuladas são consideradas de alto risco, especialmente quando elaboradas por pessoas que não possuem treinamento adequado. Além disso, preparações a base de pescado cru oferecem risco ainda maior à saúde pelo fato de não serem submetidos a tratamentos bactericidas como a cocção.

Os manipuladores de alimentos, ou seja, todas as pessoas que podem entrar em contato com um produto comestível em qualquer etapa da cadeia alimentar têm papel importante para a qualidade das preparações. A saúde e higiene destes profissionais são fundamentais para garantir um alimento seguro².

A qualidade higiênico-sanitária como fator de segurança alimentar tem sido amplamente estudada e discutida, uma vez que as doenças veiculadas por alimentos são um dos principais fatores que contribuem para os índices de morbidade nos países em desenvolvimento.

Sendo assim, no presente estudo, a qualidade sanitária de amostras de sushis comercializados na cidade de João Pessoa/PB foi investigada quanto aos parâmetros microbiológicos para pesquisas de coliformes totais e termotolerantes, estafilococos coagulase

positiva, *Salmonella*, *Bacillus cereus*, mesófilos e fungos filamentosos e não filamentosos.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizadas três coletas de amostras de sushis que estavam sendo comercializados sob refrigeração em cinco restaurantes especializados em comida japonesa (identificados como A, B, C, D e E), localizados na cidade de João Pessoa/PB, entre os meses de julho a setembro de 2014, totalizando 15 amostras.

Os sushis preparados (prontos para consumo) foram acondicionados em recipientes para viagem do próprio estabelecimento, sendo em seguida, identificados, lacrados e então, armazenados em caixas isotérmicas para manter a temperatura em torno de 10 °C. As caixas foram transportadas ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos, campus III da Universidade Federal da Paraíba, num prazo máximo de duas horas.

Foram realizadas as seguintes avaliações microbiológicas: coliformes totais, coliformes termotolerantes, estafilococos coagulase positiva, *Bacillus cereus*, mesófilos, fungos filamentosos e não filamentosos e pesquisa de *Salmonella*, conforme descrito por *American Public Health Association*³.

Para a análise de coliformes totais e termotolerantes, alíquota de 25 g da amostra foi adicionada a 225 mL de água peptonada tamponada (10^{-1}) e a partir desta diluição, foram realizadas outras duas diluições (10^{-2} e 10^{-3}) em água peptonada tamponada. A avaliação foi realizada pelo método do Número Mais Provável; alíquotas de 1 mL de cada diluição foram inoculadas em três séries de três tubos contendo Caldo Lauril Sulfato Triptose (LST) com tubos de Durham invertido (totalizando nove tubos), os quais foram incubados a 35 °C por 24-48 h. Quando positivo, tubo com turvação do meio e produção de gás, uma alçada deste meio de cultura foi transferida para tubos contendo Caldo Verde Brillante – incubados a 35 °C, por 24-48 h para a confirmação de coliformes totais – e para tubos contendo caldo EC – incubados em

banho-maria a 44,5 °C por 24-48 h para confirmação de coliformes termotolerantes.

Para a pesquisa de estafilococos coagulase positiva, alíquotas de 0,1 mL de cada uma das diluições (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}) foram semeadas na superfície de ágar Vogel Johnson, suplementado com solução de telurito de potássio, sendo as placas incubadas a 35 °C por 48 h, para posterior contagem das colônias típicas de estafilococos.

A contagem de bactérias mesófilas foi realizada por semeadura em profundidade de alíquotas de 1 mL de cada diluição seriada (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}) em ágar para Contagem Padrão (Plate Count Agar). As placas foram incubadas a 35 °C por 48 h para posterior contagem das colônias, sendo o resultado expresso em UFC/g.

A contagem de fungos também foi realizada por semeadura em profundidade de alíquotas de 1 mL de cada diluição seriada em ágar Batata Dextrose (PDA), suplementado com solução de ácido tartárico a 10 %. As placas foram incubadas a 25 °C por 3 a 5 dias para contagem das colônias típicas de fungos e o resultado expresso em UFC/g.

A avaliação de *Bacillus cereus* foi realizada por semeadura de alíquotas de 0,1 mL de cada uma das diluições seriadas (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}) em meio cromogênico ágar Hicrome *Bacillus*, seguido de incubação a 30 °C por 24 h, para posterior contagem das colônias típicas de *Bacillus cereus*.

A pesquisa de *Salmonella* envolveu as etapas: 1) de pré-enriquecimento, na qual 25 g da amostra foram transferidos a frasco contendo 225 mL de caldo Lactosado, seguido de incubação a 35 °C, por 18-20 h; 2) de enriquecimento seletivo, após o pré-enriquecimento, no qual alíquotas de 1 mL foram transferidas para dois meios de enriquecimento, caldo Selenito Cistina (SC) e caldo Tetracionado (TT), e incubados por 24 h a 43 °C; 3) seguida da etapa de plaqueamento seletivo diferencial, onde fez-se o plaqueamento em meio de cultura ágar *Salmonella* Diferencial (SD) e Ágar XLD, incubados por 18-24 h a 35 °C; e 4) de confirmação preliminar das colônias típicas de *Salmonella* por meio de provas bioquímicas em meio ágar Lisina Ferro (LIA) e ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Embora a legislação brasileira vigente⁴ não estabeleça limites toleráveis para coliformes totais em pratos “a base de carnes, pescados e similares crus (quibe cru, carpaccio, sushi, sashimi, etc.)”, foram observados, neste estudo, valores acima de 10^2 NMP/g em praticamente todas as amostras analisadas, exceto na amostra da segunda coleta no restaurante E (Tabela 1). Devido ao fato destes microorganismos estarem intimamente relacionados à baixa qualidade higiênicossanitária dos alimentos, estes resultados apontaram para a necessidade de realizar um controle mais rígido quanto à higiene durante a elaboração, armazenamento e comercialização destes produtos nos estabelecimentos comerciais visitados.

Em relação aos coliformes termotolerantes, 80 % das amostras analisadas apresentaram contagem acima do limite permitido pela legislação brasileira⁴ (10^2 NMP/g). Vale ressaltar que a presença de coliformes termotolerantes em alimentos processados é considerada uma indicação útil de contaminação pós-sanitização ou pós-processo, evidenciando práticas de higiene inadequadas e fora dos padrões requeridos para o processamento de alimentos. Uma porcentagem menor foi verificada por Sato⁵, ao analisar amostras de sushis coletadas em estabelecimentos que comercializam comida japonesa nas cidades de Jaboticabal, Ribeirão Preto e Monte Alto/SP, sendo que 33,3 % das suas amostras apresentavam valores acima do permitido em relação à população de coliformes termotolerantes.

O limite máximo estabelecido na legislação⁴ para a presença de estafilococos coagulase positiva em amostras de pratos “a base de carnes, pescados e similares crus (quibe cru, carpaccio, sushi, sashimi, etc.)” é de 5×10^3 UFC/g, sendo que apenas uma amostra analisada (6,6 %) apresentou estafilococos coagulase positiva acima do valor de referência. Em estudo feito por Vieira et al⁶, 28,1 % das 32 amostras de sushis estavam em desacordo com a legislação para este parâmetro. Considerando que este gênero de bactérias faz parte da microbiota normal

Tabela 1. Análises microbiológicas realizadas em amostras de sushis provenientes de cinco restaurantes especializados em culinária japonesa localizados na cidade de João Pessoa

Restaurantes/ Coletas ^a	Parâmetro							
	CT (NMP/g)	CTT (NMP/g)	ECP (UFC/g)	<i>B. cereus</i> (UFC/g)	<i>Salmonella</i> spp.	Mesófilos (UFC/g)	FFNF (UFC/g)	
A	1	9,3x10 ²	2,4x10²	4x10 ²	0	AUS	3,2x10 ⁵	2,6x10 ³
	2	2,4x10 ³	4,6x10²	4x10 ²	0	AUS	1,2x10 ⁵	1,1x10 ⁴
	3	1,1x10 ⁴	1,2x10³	1x10 ³	0	AUS	2,5x10 ⁴	3,3x10 ³
B	1	2,4x10 ³	1,5x10²	1x10 ³	0	AUS	1,2x10 ⁵	1,0x10 ³
	2	2,3x10 ²	2x10	9x10 ²	0	AUS	2,9x10 ⁵	1,0x10 ⁴
	3	1,1x10 ³	1,1x10³	4,5x10 ³	0	AUS	1,8x10 ⁴	4,3x10 ³
C	1	9,3x10 ²	9,3x10²	0	0	AUS	2,5x10 ⁵	1,8x10 ³
	2	9,3x10 ²	2,4x10²	4x10 ²	0	AUS	3,6x10 ⁵	1,0x10 ⁵
	3	4,6x10 ²	4,6x10²	5x10 ²	0	AUS	6,8x10 ⁴	8,5x10 ⁴
D	1	4,3x10 ²	4,3x10²	5x10 ²	0	AUS	8,6x10 ⁴	2,2x10 ³
	2	4,6x10 ³	4,6x10²	9x10³	0	AUS	6,9x10 ⁴	1,9x10 ³
	3	1,1x10 ⁴	1,1x10⁴	9x10 ²	0	AUS	5,2x10 ⁴	1,5x10 ³
E	1	2,3x10 ²	4,3x10	2x10 ²	0	PRES	3,1x10 ³	2,1x10 ³
	2	4,3x10	1,5x10	2,4x10 ³	0	PRES	2,7x10 ³	5,6x10 ³
	3	4,6x10 ³	4,6x10³	0	0	AUS	9,4x10 ⁴	6,6x10 ⁴
Limite estabelecido ^(a)	ND	10 ² NMP/g	5x10 ³ UFC/g	ND	AUS	ND	ND	
% de amostras em desacordo com a legislação ^(a)	-	80 %	6,6 %	-	13,3 %	-	-	

Legenda: ^(a)RDC nº 12/2001, para pratos prontos “a base de carnes, pescados e similares crus (quibe cru, carpaccio, sushi, sashimi, etc.)”; valores em negrito indicam resultados em desacordo com a legislação vigente (a); CT = Coliformes totais; CTT = Coliformes termotolerantes; ECP = Estafilococos Coagulase Positiva; FFNF = Fungos Filamentosos e Não Filamentosos; NMP/g = Número Mais Provável por grama; UFC/g = Unidades Formadoras de Colônias por grama; ND = parâmetro não definido pela legislação vigente (a) para este tipo de alimento

da pele humana, pode ter acontecido a contaminação devido à falta de higiene dos manipuladores, principalmente quando não se utilizam equipamentos de proteção e formas de assepsias adequadas.

Em nenhuma das amostras analisadas foi verificada a presença de *Bacillus cereus*, assim como ocorreu em estudo realizado por Alcântara⁷, em amostras de sushis comercializados na cidade de Fortaleza/CE, porém diferente do que foi verificado por Martins⁸, em amostras de sushis servidos em bufês na cidade de São Paulo.

Por outro lado, em duas amostras analisadas (13,3 %) foram confirmadas a presença de *Salmonella*, podendo indicar a falta de um controle rígido de higiene dos manipuladores e o descumprimento das Boas Práticas de Manipulação (BPM) na preparação desses alimentos. Estes resultados estão coerentes com aqueles apresentados por Vieira et al⁶ que, ao analisarem o risco microbiológico do consumo de sushi em estabelecimentos da cidade de Fortaleza/CE, detectaram presença de *Salmonella*; porém, estão diferentes do relatado por Alcântara⁷, que não isolou o patógeno em nenhuma das amostras de pratos prontos para consumo à base de pescados crus e cereais.

A legislação vigente⁴ não estabelece limites máximos permitidos para contagem de bactérias mesófilas e para contagem de fungos neste tipo de produto. Neste estudo, foram detectadas contagens de bactérias aeróbias mesófilas entre $2,7 \times 10^3$ a $3,6 \times 10^5$ UFC/g. Segundo Jay⁹ e Forsythe¹⁰, contagens acima de 10^6 UFC/g por amostra, podem ser responsáveis pelo desencadeamento de doenças de origem alimentar, porém nenhuma das amostras analisadas apresentou contagens superiores a 10^6 UFC/g. Os aeróbios mesófilos são considerados como índice de sanidade e, sua ausência indica que as condições de conservação foram adequadas⁹. Uma população elevada desses microrganismos pode indicar contaminação excessiva da matéria-prima ou durante a preparação, bem como condições inadequadas de limpeza e sanitização. Erros no processo de conservação e transporte também contribuem para

aumentar as populações desses microrganismos.

Com relação à contagem de fungos, as amostras apresentaram variação entre $1,0 \times 10^3$ e $1,0 \times 10^5$ UFC/g, porém a legislação vigente⁴ não estabelece limites para esses microrganismos neste tipo de produto. Em virtude da dificuldade para encontrar trabalhos científicos sobre contagem de bolores em sushis, foi utilizado como parâmetro de comparação estudo feito por Oliveira et al¹¹, que avaliaram a qualidade microbiológica de peixes *in natura* comercializados em feiras livres do município de Vitória da Conquista/BA e verificaram níveis de contaminação por bolores e leveduras variando entre $1,1 \times 10^2$ e $5,0 \times 10^3$ UFC/g. Segundo Rodrigues¹², altas contagens de bolores e leveduras indicam sanitização pobre no processamento do alimento ou uma seleção mal feita da matéria-prima introduzindo produtos contaminados. Eles são indicadores de uma má técnica de processamento e falha na higiene da planta processadora.

CONCLUSÃO

Os dados desta pesquisa podem servir de parâmetro para avaliar a qualidade sanitária de sushis comercializados na cidade de João Pessoa/PB, considerando que este alimento pode representar risco potencial à saúde dos consumidores. Os resultados obtidos indicaram a importância do monitoramento dos restaurantes especializados em servir comida japonesa, em João Pessoa, por parte das autoridades sanitárias e da necessidade de conscientizar os proprietários dos estabelecimentos e manipuladores de alimentos, assim como da importância de esclarecer o público sobre os riscos aos quais estão sendo submetidos ao consumir esse tipo de alimento servido sem tratamento térmico.

REFERÊNCIAS

1. Silva ML. Pesquisa de *Aeromonas* spp., *Vibrio* spp. e da qualidade sanitária de peixes comercializados na cidade de São Paulo [dissertação de mestrado]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo; 2007.

2. Freitas IMS, Shinohara NKS, Silva GD, Demetrio AA, Agnani JAT, Siqueira LP. Boas práticas de manipulação na culinária japonesa. Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão; 2009; Recife (PE). Disponível em: [<http://eventosufrpe.com.br/jepex2009/cd/resumos/R0625-1.pdf>].
3. American Public Health Association – APHA. Committee on Microbiological for Foods. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4ª ed. Washington; 2001.
4. 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] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 10 jan. 2001. Seção 1, nº7-E. p.45-53.
5. Sato RA. Características microbiológicas de sushis adquiridos em estabelecimentos que comercializam comida japonesa [dissertação de mestrado]. Jaboticabal (SP): Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho; 2013.
6. Vieira RHSE, Silva CM, Carvalho FCT, Sousa DBR, Menezes FGR, Reis EMF, et al. *Salmonella* e *Staphylococcus* coagulase positiva em sushi e sashimi preparados em dois restaurantes da cidade de Fortaleza, Ceará. *Bol Tecn Cient CEPENE*. 2007;15(1): 9-14.
7. Alcântara BM. Qualidade higiênico-sanitária de sushi e sashimi servidos em restaurantes da cidade de Fortaleza: modismo alimentar e risco à saúde [dissertação de mestrado]. Fortaleza (CE): Universidade Estadual do Ceará; 2009.
8. Martins FO. Avaliação da qualidade higiênico-sanitária de preparações (sushi e sashimi) a base de pescado cru servidos em bufês na cidade de São Paulo [dissertação de mestrado]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo; 2006.
9. Jay JM. Microbiologia de Alimentos. 6º ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.
10. Forsythe SJ. Microbiologia da Segurança Alimentar. Porto Alegre: Artmed, 2002.
11. Oliveira AS, Pinto Júnior WR, Zanuto ME, Brito DS, Porto SS, Dias HS. Qualidade microbiológica de peixes in natura comercializados em feira livre do município de Vitória da Conquista no estado da Bahia. V Congresso Latino Americano e XI Congresso Brasileiro de Higienistas de Alimentos; março de 2011; Salvador (BA): v. 25.
12. Rodrigues PM. Microbiologia dos Processos Alimentares. São Paulo: Varela, 2005.

Sobrevivência de *Campylobacter jejuni* em amostras de leite pasteurizado e UHT artificialmente contaminados e mantidas sob refrigeração

Viability of *Campylobacter jejuni* in the refrigerated samples of artificially contaminated pasteurized and UHT milks

RIALA6/1663

Guilherme Paz MONTEIRO^{1*}, Roberta Torres de MELO^{1,2}, Priscila Christen NALEVAIKO^{1,2}, Eliane Pereira MENDONÇA^{1,2}, Belchiolina Beatriz FONSECA¹, Daise Aparecida ROSSI^{1,2}

*Endereço para correspondência: ¹Laboratório de Biotecnologia Animal Aplicada, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia. Rua Ceará s/n, Bloco 2D, sala 43, Bairro Umarama, Uberlândia, MG, Brasil. CEP: 38402-018, Tel: +55 34 3213-2319. E-mail: guil.paz@hotmail.com

²Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brasil

Recebido: 31.03.2015 - Aceito para publicação: 29.06.2015

RESUMO

Campylobacter é o agente etiológico mais prevalente em gastroenterites de causa alimentar no mundo. Apesar de o leite cru ser fonte de infecção, pouco se conhece sobre as consequências da recontaminação do leite. A viabilidade de *Campylobacter jejuni* foi avaliada em leites pasteurizados e UHT mantidos sob refrigeração. Ambos os leites foram divididos em cinco porções de 100 mL, inoculados com 10^1 UFC.mL⁻¹ de *C. jejuni* e mantidos de 4 °C a 7 °C por 48 horas. Repetiu-se o procedimento, utilizando-se inoculações de 10^2 , 10^3 e 10^4 UFC.mL⁻¹. As alíquotas foram analisadas imediatamente após inoculação e depois de 24 e 48 h quanto à viabilidade de *C. jejuni*. O micro-organismo manteve-se viável em todas as amostras, porém no leite pasteurizado houve redução de 1 ciclo log nas contagens após 24 h e baixas contagens após 48 h. Provavelmente, a redução ocorreu pela presença de microbiota neste leite, que competiu ou inibiu o crescimento de *C. jejuni*. O leite UHT ofereceu boas condições de sobrevivência em todos os períodos. O consumo de leite contaminado, mesmo em armazenamento refrigerado, pode ser fonte de infecção. O micro-organismo manteve-se mais viável no leite UHT quando comparado ao pasteurizado, provavelmente pela ausência de outros micro-organismos competidores.

Palavras-chave. *Campylobacter jejuni*, leite, contaminação experimental, viabilidade, baixa temperatura.

ABSTRACT

Campylobacter is the most prevalent etiologic agent of foodborne gastroenteritis worldwide. Although raw milk is an important source of infection, little is known about the consequences of milk recontamination. This study aimed at verifying the viability of *Campylobacter jejuni* in pasteurized and UHT milks stored under refrigeration. Both samples were divided into five portions of 100 mL, inoculated with 10^1 CFU.mL⁻¹ of *C. jejuni* and stored at 4 °C - 7 °C for 48 h. The procedure was repeated using inoculations of 10^2 , 10^3 and 10^4 CFU.mL⁻¹. Aliquots were analyzed immediately after inoculation and after 24 and 48 h to evaluate *C. jejuni* viability. The microorganism their viability in all of samples. In pasteurized milk a reduction of 1 log cycle occurred after 24 h and low counts after 48 h. Probably, the reduction happened due to the occurrence of microbiota in this milk, which caused competition or inhibition of microorganism growth. UHT milk offered good conditions for bacteria survival in all of the periods. The consumption of contaminated milk, even stored under refrigeration might be a source of infection. Microorganism were more viable in UHT milk than in pasteurized one, probably owing to the absence of competing microorganisms.

Keywords. *Campylobacter jejuni*, milk, experimental contamination, viability, low temperature.

INTRODUÇÃO

Campylobacter é atualmente o agente etiológico bacteriano mais envolvido nos casos de gastroenterite humana na Europa e nos Estados Unidos, sendo a espécie *C. jejuni* a mais prevalente. *Campylobacter jejuni* é a espécie mais associada aos casos de infecção humana, sendo o micro-organismo mais isolado de pacientes com intoxicação alimentar, excedendo cerca de três a quatro vezes outros patógenos entéricos como a *Salmonella* ou a *Escherichia coli*¹.

Segundo a Organização Mundial de Saúde², a campilobacteriose é uma zoonose, geralmente assintomática nos animais, mas que em humanos pode provocar gastroenterite com muco e sangue, febre, náuseas, além de dores de cabeça e musculares. Em alguns casos, podem gerar complicações consideradas raras, porém severas, como a Síndrome de Guillain-Barré (SGB) e outras neuropatias.

As aves seguidas dos suínos, realmente são os principais reservatórios das espécies de *Campylobacter*, no entanto sabe-se que não são as únicas fontes de infecção para os humanos, uma vez que os bovinos também são reservatórios importantes deste micro-organismo. Estes podem gerar uma via de contaminação para o leite, que quando ingeridos, podem ser potencialmente infectantes aos humanos³.

Há relatos de surtos associados à transmissão de *C. jejuni* pelo leite, tanto no Brasil quanto no exterior. No Brasil houve um surto associado ao consumo de leite não pasteurizado que infectou estudantes que visitaram uma fazenda produtora de leite no estado de Minas Gerais, resultando em 57,6 % de infectados entre os que consumiram o alimento⁴. Outro caso recente envolvendo infecção por *C. jejuni* pelo consumo de leite ocorreu no estado do Alaska, nos Estados Unidos, em 2013, no qual foram notificados 24 casos de campilobacteriose⁵.

O leite pasteurizado e o *Ultra High Temperature* (UHT), se beneficiados corretamente, devem estar livres de patógenos. No entanto, pode ocorrer recontaminação,

por meio de manipulação e armazenamento inadequados ou a partir do contato com outros alimentos ou fômites que podem ser vias de contaminação cruzada⁶.

Este experimento objetivou determinar a viabilidade de *C. jejuni* experimentalmente inoculada em leites pasteurizado e leite UHT após armazenamento sob refrigeração.

MATERIAL E MÉTODOS

Desenho do estudo

O estudo foi conduzido no Laboratório de Biotecnologia Animal Aplicada da Universidade Federal de Uberlândia (LABIO-UFU).

Quatro frascos contendo 100 mL de leite pasteurizado, retirados assepticamente de embalagens de leite de 1L, adquiridas no comércio local e provenientes de lotes diferentes, foram experimentalmente contaminados com *C. jejuni*. Utilizou-se para a inoculação, uma cepa de *Campylobacter jejuni* ATCC (33291), que foi isolada de fezes humanas e é utilizada como cepa controle em pesquisas científicas. Devido a falta de estudos prévios de contaminação experimental ou natural na literatura (que cita somente o leite *in natura*), nos baseamos inicialmente na dose infectante de 500 células, aproximadamente 10^2 UFC/mL. Posteriormente, por tratar-se de um estudo inédito, e não conhecendo a sobrevivência desta espécie em refrigeração ou número de células que podem ser comumente possíveis de acontecer na contaminação pós-processamento, incluímos novas concentrações, padronizando quatro inoculos, que resultaram nas seguintes concentrações: 10^1 , 10^2 , 10^3 e 10^4 UFC/mL de leite, em seguida as amostras foram homogeneizadas e mantidas em refrigerador doméstico com temperatura variando entre 4-7 °C mensurada por termômetro digital (Prolab®) por até 48 h.

Alíquotas de 1 mL para a amostra não diluída e 0,1mL de suas respectivas diluições seriadas, foram amostradas imediatamente após inoculação (0 hora) e depois de 24 e 48 h para quantificação de *C. jejuni*. Paralelamente, foi utilizado um controle negativo

(sem inoculação).

Foram analisadas um total de 12 parcelas (1 variedade de leite x 4 inóculos x 3 tempos de análise) as análises foram feitas em triplicata, da qual foram calculadas as médias para obtenção do resultado para quantificação de *C. jejuni*. A estatística aplicada aos resultados foi descritiva, com o uso de médias e porcentagens. O mesmo experimento foi repetido utilizando leite UHT.

Preparo do inóculo de *Campylobacter jejuni*

Foi utilizada a cepa de *Campylobacter jejuni* ATCC 33291 em segundo repique. A cepa liofilizada foi reativada em 10 mL de caldo Bolton (Oxoid®) incubado em condições de microaerofilia a 37 °C por 4 a 6 h e 41,5 °C por 44 ± 4 h. A cultura foi quantificada em PCR real time (Bax System®) e submetida a diluições decimais seriadas em 9 mL de água peptonada 0,1 % estéril até atingir a concentração desejada⁷.

Análises

As amostras de leite pasteurizado e UHT utilizadas no estudo foram avaliadas previamente quanto a possíveis interferentes para manutenção da viabilidade do micro-organismo inoculado, sendo eles: presença de resíduos de antibióticos beta lactâmicos e tetraciclinas, quantificação de coliformes totais, termotolerantes, bactérias heterotróficas mesófilas, além do teste prévio de presença/ausência para *Campylobacter* spp.

A presença de resíduos de antibióticos betalactâmicos e de tetraciclinas nos leites foi verificada com auxílio dos kits para ensaios imunoenzimáticos SNAP NBL (Idexx Lab.®), com o intuito de garantir que o micro-organismo testado não sofresse morte ou inibição por ação de antibióticos. Esse kit é capaz de detectar os seguintes antibióticos (limite de detecção): Penicilina G (3 µg/Kg), Cefapirina (11,7 µg/Kg), Ceftiofur (12 µg/Kg), Ampicilina (5,8 µg/Kg), Amoxicilina (7,3 µg/Kg) e o Snap TETRA (Idexx Lab.®): Clortetraciclina (100 µg/Kg), Oxitetraciclina (50 µg/Kg), Tetraciclina (50 µg/Kg). Estes são kits de resultado imediato, de visualização fácil e rápida, importante no caso desse experimento, para

saber das condições da amostra pré-inóculo. Os procedimentos foram realizados conforme o protocolo recomendado pelo fabricante.

O protocolo para análises de coliformes totais e termotolerantes foi realizado conforme descrito por Silva et al⁸, utilizando a técnica do NMP (Número Mais Provável) em tubos contendo 5 mL dos caldos Verde Brilhante Bile 2 % (Difco™) e caldo EC Medium (Difco™), respectivamente.

Para quantificação de bactérias heterotróficas mesófilas, foi utilizada a técnica de inoculação de 1 mL da amostra pura e de suas diluições seriadas, em profundidade em Plate Count Agar (PCA) (Difco™)⁸.

Para garantir que os leites pasteurizado e UHT utilizados no estudo apresentavam ausência de *Campylobacter* spp., as amostras foram analisadas conforme protocolo descrito na ISO⁹ para presença/ausência em 25 mL.

A contagem de *Campylobacter* spp. foi realizada nas amostras dos dois tipos de leite inoculados experimentalmente, após 0, 24 e 48 h de armazenamento refrigerado a 4-7 °C (temperatura de armazenamento de alimentos).

O protocolo de análise utilizado foi conforme recomendações da ISO⁹.

Após diluição decimal seriada, alíquotas de 0,1 mL das diluições foram distribuídas, com o auxílio da alça de Drigalski, em placas de m-CCDA (Oxoid®). Para a concentração de 10⁰ (amostra não diluída), 0,25 mL da amostra sem diluir foi distribuída em quatro placas do agar seletivo m-CCDA (Oxoid®), adicionado ao suplemento antibiótico (cefoperazone e anfotericina) (Oxoid®). A incubação foi realizada a 41,5° C por 44 ± 4 h em jarras para anaerobiose em condições de microaerofilia (Probac do Brasil®).

Colônias com morfologia suspeita de pertencerem ao gênero *Campylobacter* foram contadas e confirmadas pelas provas de oxidase e morfologia típica de bastonetes curvos e espiralados ou em “asa de gavota” na coloração de Gram modificada (uso da carboxifuccina substituindo a safranina).

Os resultados foram tabulados e

discutidos baseados em análise estatística descritiva, com utilização de médias e porcentagens.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não foram detectados resíduos de antibióticos betalactâmicos e de tetraciclina ou presença de *Campylobacter* spp. em nenhuma das amostras de leite pasteurizado ou UHT utilizados para o estudo.

Em todas as amostras do leite UHT não houve crescimento dos micro-organismos bioindicadores. Esses resultados eram esperados, uma vez que o leite UHT é submetido à alta temperatura e embalado asépticamente, o que garante longa vida na prateleira, mesmo sem refrigeração.

Das quatro amostras de leite pasteurizado, uma delas (25 %) apresentou contagem para coliformes totais e quatro (100 %) para bactérias mesófilas, porém, dentro dos limites permitidos pela legislação que é de, no máximo 4,0 NMP.mL⁻¹ e 8,0 x 10⁴ UFC.mL⁻¹, respectivamente⁹.

As contagens médias (UFC.mL⁻¹) de *C. jejuni* nos leites imediatamente após a inoculação experimental e após armazenamento refrigerado por 24 h e 48 h estão na Tabela 1.

O número de células viáveis de

C. jejuni diminuiu ao longo do armazenamento refrigerado em ambos os tipos de leite. Porém, a redução no leite UHT foi discreta se comparada a do leite pasteurizado. No leite pasteurizado houve diminuição de aproximadamente 1 ciclo log nas primeiras 24 h e o número de células viáveis foi muito reduzido após 48 h de armazenamento.

O leite UHT ofereceu boas condições de sobrevivência ao micro-organismo inoculado. As contagens de *C. jejuni*, mesmo depois de 48 h em refrigerador se manteve em números próximos aos inoculados, não havendo redução logarítmica. A diminuição nas contagens de *C. jejuni* no leite pasteurizado ao longo do armazenamento corrobora com a hipótese de que a microbiota pré-existente no leite pasteurizado interferiu nos níveis de sobrevivência do micro-organismo inoculado, provavelmente, por competição ou inibição.

Segundo Hussain e colaboradores¹⁰, a principal forma de transmissão de *Campylobacter* spp. para humanos é por ingestão de alimentos contaminados. A contaminação do leite pode ocorrer no laticínio produtor após o beneficiamento, mas também pode acontecer nas residências, por meio da manipulação inadequada e contaminação cruzada, como o contato com outros alimentos contaminados ou fômites¹⁰.

Tabela 1. Contagens médias¹ de *C. jejuni* nos leites pasteurizado e UHT, inoculados e armazenados sob refrigeração (4 °C a 7 °C) por 0, 24 e 48 h

Inóculo (UFC.mL ⁻¹)	Tipo de leite	Tempo de armazenamento		
		0h	24h	48h
10 ⁴	Pasteurizado	2,3 x 10 ⁴ (+)	3,7 x 10 ³ (+)	3,0 x 10 ⁰ (-)
	UHT	8,2 x 10 ⁴ (+)	3,2 x 10 ⁴ (+)	7,3 x 10 ³ (+)
10 ³	Pasteurizado	2,3 x 10 ³ (+)	3,0 x 10 ² (-)	6,3 x 10 ⁰ (-)
	UHT	8,5 x 10 ³ (+)	6,9 x 10 ³ (+)	3,6 x 10 ³ (+)
10 ²	Pasteurizado	4,9 x 10 ² (+)	4,2 x 10 ¹ (-)	2,7 x 10 ⁰ (-)
	UHT	2,0 x 10 ³ (+)	2,2 x 10 ³ (+)	2,9 x 10 ³ (+)
10 ¹	Pasteurizado	9,2 x 10 ¹ (-)	4,0 x 10 ¹ (-)	1,3 x 10 ¹ (-)
	UHT	2,7 x 10 ² (-)	1,6 x 10 ² (-)	1,0 x 10 ² (-)

¹média de três repetições; (+): superior; (-): inferior à dose infectante de 4,0 a 5,0 x 10²

Existem na literatura relatos de campilobacteriose humana pelo consumo de alimentos contaminados de forma cruzada em cozinhas domésticas e comerciais. Em 1996, em um restaurante em Oklahoma, houve um surto de doença alimentar causado por *Campylobacter jejuni* pela ingestão de lanches que continham alface contaminada por esta bactéria oriunda de frangos crus. Isso enfatiza a necessidade de manter certos alimentos e utensílios de cozinha separados durante a manipulação e preparo da refeição¹¹.

A contaminação cruzada também é possível na manipulação e armazenamento doméstico inadequados de leite e outros alimentos a base de leite. Considerando os resultados obtidos neste estudo, a situação se torna de maior risco quando os alimentos são submetidos à cocção, eliminando a microbiota acompanhante, mas são posteriormente contaminados.

Chai e colaboradores¹² relataram que a contaminação de alimentos por *Campylobacter* pode ocorrer por meio das mãos, saliva, utensílios ou contato direto e indireto com outros alimentos. Assim, práticas de manipulação e higienização inadequadas podem aumentar a probabilidade de contaminação dos alimentos, e conseqüentemente, os casos de campilobacteriose humana.

De acordo com Hazeleger e colaboradores¹³, as espécies de *Campylobacter* classificadas como gastroentéricas são termotolerantes, com crescimento ótimo em temperaturas entre 37 °C a 42 °C, porém, sobrevivem por um longo período a 4 °C. Este fato foi comprovado em estudos precursores e também durante a realização deste experimento no leite UHT, no qual *C. jejuni* sobreviveu e se manteve em números relativamente constantes mesmo depois de 48 h quando armazenado em geladeira.

Pode-se inferir que a bactéria desenvolve estratégias que permitem sua sobrevivência, neste caso, o estresse à baixa temperatura. Garénaux e colaboradores¹⁴ mostraram que *Campylobacter* possui respostas de adaptação efetivas as situações de estresse que podem

permitir sua sobrevivência em condições adversas, como a variação da temperatura, como por exemplo, reduzindo sua dimensão celular e alterando sua morfologia típica de bacilos curvos para formas cocóides em período transitório, o que pode resultar nas formas viáveis não cultiváveis.

Além disso, o leite também possui propriedades crioprotetoras que auxiliam na sobrevivência do micro-organismo¹⁵. A autora demonstrou que o leite pode ser utilizado como crioprotetor em laboratório conservando *Campylobacter* em temperatura de congelamento e garantindo a manutenção de sua viabilidade por mais tempo, comparado ao método tradicional de conservação em glicerol. Sendo que esse efeito crioprotetor do leite pode ser devido à alteração na fluidez da membrana da célula ou pela contribuição do cálcio na estabilidade das enzimas celulares¹⁵.

Segundo a *Advisory Committee on the Microbiological Safety of Food*¹⁶, a ingestão de 4,0 a 5,0 x 10² UFC do micro-organismo é o suficiente para gerar um quadro de infecção por *Campylobacter* spp. Assim, é possível inferir a partir dos resultados obtidos, que existem riscos de infecção alimentar por *C. jejuni* na situação experimental testada (Tabela 1).

Os resultados obtidos neste estudo, aliado aos dados disponíveis na literatura, demonstram a importância da implementação de boas práticas de higiene na manipulação e armazenamento do leite pós-beneficiamento visando prevenir a sua contaminação e de outros alimentos por *C. jejuni*. Estes cuidados devem ser constantes também no ambiente doméstico.

O armazenamento de quaisquer embalagens de leite, sendo este pasteurizado ou UHT, deve ser realizado evitando a proximidade com outros alimentos de origem animal que possam estar contaminados com *Campylobacter* spp.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que *C. jejuni* é capaz de sobreviver

em leite pasteurizado e UHT mantidos sob refrigeração por até 48 h. A viabilidade de *C. jejuni* foi maior no leite UHT, provavelmente devido à ausência de outros micro-organismos competidores e/ou inibidores nesta variedade, comparada ao leite pasteurizado que possui uma microbiota natural.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

1. European Food Safety Authority - EFSA. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011. *J EFSA*.2013;11: 3129 [250 p]. [DOI:10.2903/j.efsa.2013.3129].
2. World Health Organization - WHO. 2012. The global view of *Campylobacteriosis*. Utrecht, Netherlands, p. 9-11.
3. Esteves WTC, Ferreira AP, Siciliano S. Potencial impacto na Saúde Pública por *Campylobacter* spp. Estudo de caso: curso inferior do Rio São João, RJ, Brasil. *Cad Saúde Colet*.2011;19(1):74-81.
4. Silva MR. Investigação epidemiológica de um surto de infecção alimentar por *Campylobacter jejuni* associado ao consumo de leite cru [monografia]. Lavras (MG): Universidade Federal de Lavras; 2003.
5. Centro de Informações e Respostas Estratégicas de Vigilância em Saúde - CIEVS. Informe Epidemiológico CIEVS Paraná – Eventos Semana Epidemiológica 10, 2013 [acesso 2015 Fev 13]. Disponível em: [http://www.sesa.pr.gov.br/arquivos/File/ACS/Informe10.pdf].
6. Gorman R, Bloomfield S, Adley CC. A study of cross-contamination of food-borne pathogens in the domestic kitchen in the Republic of Ireland. *Int J Food Microbiol*.2002;76(1-2):143–50.
7. Users Guide BAX®System (2007) PCR assay with automated detection for bacterial screening. Du Pont Qualicon, Wilmington, DE.
8. Silva N, Junqueira VCA, Silveira NFA, Taniwaki MH, Santos RFS, Gomes RAR. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos, 3ª Edição, São Paulo: Varela; 2007.
9. International Standards Organization - ISO. ISO 10272-1: Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter* spp. – Part 1: detection method. ISO, 2006; ISO 10272-1.
10. Hussain I, Shahid Mahmood M, Akhtar M, Khan A. Prevalence of *Campylobacter* species in meat, milk and other food commodities in Pakistan. *Food Microbiol*.2007;24(3):219-22. [DOI: 10.1016/j.fm.2006.06.001].
11. Centers for Disease Control and Prevention - CDC. Outbreak of *Campylobacter* enteritis associated with cross-contamination of food – Oklahoma. *MMWR Surveill Summ*.1998;47(7):129-31.
12. Chai LC, Robin T, Ragavan UM, Gunsalam JW, Bakar FA, Ghazali FM, et al. Thermophilic *Campylobacter* spp. in salad vegetables in Malaysia. *Int J Food Microbiol*.2007;117(1):106-11.
13. Hazeleger W, Arkesteijn C, Tooropbouma A, Beumer R. Detection of the coccoid form of *Campylobacter jejuni* in chicken products with the use of the polymerase chain reaction. *Int J Food Microbiol*. 1994;24(1/2):273-81.
14. Garénaux A, Jugiau F, Rama F, Jonge R, Denis M, Federighi M, et al. Survival of *Campylobacter jejuni* strains from different origins under oxidative stress conditions: effect of temperature. *Curr Microbiol*.2008;56(4):293–7. [DOI: 10.1007/s00284-007-9082-8].
15. Moura MS. Influência de crioprotetores e pré-adaptação na viabilidade e produção de transcritos por cepas de *Campylobacter jejuni* mantidas a -20 °C [dissertação de mestrado]. Uberlândia (MG): Universidade Federal de Uberlândia, 2013.
16. Advisory Committee on the Microbiological Safety of Food - ACMSE. Second Report on *Campylobacter*. 2005 [acesso 2014 Abr 16]. Disponível em: [http://www.food.gov.uk/multimedia/pdfs/acmsfcampylobacter.pdf].

Comparação entre a análise macroscópica realizada durante a inspeção em abatedouro bovino e o exame microscópico na detecção de processos patológicos

Comparison between the macroscopic analysis during the inspection in bovine slaughterhouse and the microscopic examination to detect pathological processes

RIALA6/1664

Bruno Rafael Lima NASCIMENTO¹, Manoel Soares DAMASCENO NETO¹, Michelle da Silva MACIEL², Valéria Duarte CERQUEIRA³, Carina Martins de MORAES¹, Milton Begeres de ALMEIDA^{3*}

*Endereço para correspondência: ³Laboratório de Anatomia Patológica, Instituto de Medicina Veterinária, Programa de Pós-graduação em Saúde Animal na Amazônia, 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: begeres@yahoo.com.br

¹Laboratório de Higiene e Qualidade de Alimentos, Instituto de Medicina Veterinária, Programa de Pós-graduação em Saúde Animal na Amazônia, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Pará (UFPA), Campus Castanhal

²Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Castanhal, Pará

Recebido: 24.04.2015 - Aceito para publicação: 11.09.2015

RESUMO

O presente trabalho teve por objetivo comparar o resultado da análise macroscópica realizada pelo Serviço de Inspeção Federal durante o exame *post-mortem* com a avaliação das características microscópicas de lesões indicativas de doenças em órgãos e vísceras condenados, em um matadouro-frigorífico do município de Castanhal, Pará. Amostras de diferentes órgãos e vísceras condenados pelo Serviço de Inspeção durante a análise *post mortem* foram coletadas em um matadouro-frigorífico e encaminhadas ao Laboratório de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Pará – Campus Castanhal, para realizar a análise histopatológica. Durante o período de quatro meses foram acompanhados 30.223 abates bovinos, que resultaram em 12.467 órgãos e vísceras condenados, dos quais foram coletadas 26 amostras para o presente trabalho. Este estudo demonstrou que o diagnóstico macroscópico realizado pelos agentes de inspeção foi compatível com a análise microscópica em 20 (76,9 %) das 26 amostras analisadas. Neste contexto, os critérios de condenação sanitária adotados pelos agentes de inspeção foram muito semelhantes aos resultados de diagnósticos histopatológicos encontrados neste trabalho.

Palavras-chave. inspeção sanitária, patologia, microscopia, abate de animais.

ABSTRACT

This study aimed at comparing the result of macroscopic analysis performed by the Federal Inspection Service during the *post-mortem* examination and the evaluation of the microscopic characteristics of lesions indicative of diseases in the condemned organs and viscera in an industrial slaughterhouse in the city of Castanhal, Pará-Brazil. Samples of diverse organs and viscera condemned by Federal Inspection Service during the *post-mortem* investigation were collected in a slaughterhouse located in the city of Castanhal-Pará. These samples were sent to the Pathology Laboratory of the Faculty of Veterinary Medicine of the Federal University of Pará – Campus Castanhal, where the histopathological analysis was performed. During the four-month period, 30,223 cattle slaughter were followed, and of these 12,467 organs and viscera were condemned. Among the condemned samples, 26 were collected for conducting the study. This investigation showed that the macroscopic diagnosis performed by the inspection agents were consistent with the microscopy analysis findings in 20 (76.9 %) of 26 evaluated samples. In this context, the sanitary condemnation criteria adopted by the inspection agents were very similar to the histopathological diagnosis results found in this study.

Keywords. sanitary inspection, pathology, microscopy, animal culling.

INTRODUÇÃO

O Serviço de Inspeção Veterinária possui um papel extremamente importante no controle das enfermidades transmitidas por alimentos e na área de saúde pública. Em matadouros frigoríficos, o destino das carnes e derivados durante o exame *post mortem* depende de um diagnóstico macroscópico. Contudo, como múltiplas enfermidades podem ter os mesmos aspectos macroscópicos, há possibilidade de ocorrerem falhas de diagnóstico no momento da inspeção. Desta forma, exames complementares podem ser realizados, visando a confirmação do diagnóstico presuntivo¹.

Vários trabalhos científicos têm demonstrado que a falta de acurácia nas diversas linhas de inspeção tem elevado os custos de produção dos frigoríficos². Além disso, Mendes e Pilati² observaram que os critérios utilizados para a condenação e a liberação de órgãos que foram submetidos ao serviço oficial de inspeção de carnes têm sido controversos. Dentre os exames complementares a serem utilizados, o histopatológico destaca-se, pois pode auxiliar o inspetor a confirmar ou não os diagnósticos realizados durante o abate e tais informações podem permitir a tomada de medidas sanitárias preventivas pelos setores responsáveis pela saúde animal e pela saúde humana.

O presente trabalho teve por objetivo comparar o resultado da análise macroscópica realizada pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF) durante a inspeção *post-mortem* com as características microscópicas de lesões indicativas de alterações patológicas, em órgãos e vísceras condenados em um frigorífico do município de Castanhal, Estado do Pará.

MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização do presente trabalho, amostras de diferentes órgãos e vísceras condenados pelo SIF durante a inspeção *post mortem* foram coletadas em um matadouro frigorífico localizado no município de Castanhal - Estado do Pará, que recebe e abate animais

oriundos de municípios das regiões norte e nordeste do país. Durante o período de quatro meses foram acompanhados 30.223 abates bovinos, que tiveram 12.467 órgãos e vísceras condenados, dos quais foram coletadas 26 amostras para análises histológicas, sendo quatro amostras de coração (C₁ a C₄), cinco de pulmão (P₁ a P₅), cinco de fígado (F₁ a F₅), duas de intestino (I₁ e I₂) e dez de rins (R₁ a R₁₀). Foram coletadas amostras que indicassem alguma enfermidade de importância para a espécie bovina ou para saúde pública, ou ainda que causassem repugnância ao consumidor. A seleção do número amostras a serem coletadas se deu a partir da casuística apontada pelo estabelecimento.

Todas as amostras foram acondicionadas em recipientes contendo solução de formalina tamponada a 10 %, e identificadas de forma individual imediatamente após a coleta, com a letra correspondente a inicial da víscera, seguido do número. Posteriormente, o material foi encaminhado para o Laboratório de Patologia Animal da Universidade Federal do Pará, onde foi processado. No laboratório, as amostras fixadas em formol foram cortadas e acondicionadas em cassetes para desidratação em álcool, clarificação em xilol e inclusão em parafina. Os blocos de parafina contendo fragmentos das amostras foram cortados ao micrótomo com 5 µm de espessura, fixados em lâminas histológicas e corados pela técnica de hematoxilina/eosina. As lâminas histológicas foram observadas em microscópio óptico e suas características foram descritas e comparadas com a literatura disponível. Todos os dados obtidos foram analisados através de estatística descritiva.

RESULTADOS

Os resultados obtidos demonstraram que o diagnóstico macroscópico realizado pelos agentes de inspeção foi compatível com o microscópico em 20 (76,9 %) das 26 amostras analisadas. Durante a execução das análises, 254 corações foram condenados pelo SIF, sendo 71,7 % desses condenados por pericardite e 28,3 %

por algum tipo de contaminação, segundo julgamento dos agentes de inspeção. Destas peças, quatro amostras de corações condenadas por pericardite foram coletadas (C1 a C4). Concomitantemente, foram condenados 7.224 pulmões, sendo que 0,3 % destes foram casos de adenite, 22,5 % condenação por aspiração de sangue, 21,3 % por aspiração de conteúdo ruminal, 2 % por bronquite, 16,7 % por congestão, 36,9 % por enfisema, 0,1 % por hidatidose e 0,2 % por pleuris (pleurite). Foram coletadas cinco amostras de pulmões condenados na inspeção, sendo três dessas amostras condenadas por enfisema (P₁, P₂ e P₃), uma por pleuris (P₄) e uma por bronquite (P₅). As condenações por enfisema, aspiração de sangue ou de conteúdo ruminal somaram 80,7 % do total de pulmões condenados.

Da mesma forma, 573 fígados foram condenados. Destes, 34,7 % foram condenados por teleangiectasia, 25,5 % por abscesso hepático, 13,1 % por esteatose, 11,2 % por cirrose, 10,5 % por perihepatite e 5 % por contaminação. Foram coletadas cinco amostras de fígado, sendo duas de teleangiectasia (F₁ e F₂), uma de congestão (F₃), uma de esteatose (F₄) e uma de abscesso hepático (F₅). Foram condenados ainda 1.010 tratos gastrointestinais, englobando os estômagos e os intestinos, sendo 21,5 % dessas condenações por contaminação dos estômagos, 23,5 % por contaminação dos intestinos e 55 % por esofagostomose. Duas amostras de intestinos acometidos com esofagostomose (I₁ e I₂) foram coletadas para a realização do exame microscópico.

Por fim foram condenados 3.406 rins, sendo 51,5 % por isquemia, 28 % por congestão, 11,7 % por quisto urinário (cisto urinário), 8,3 % por nefrite e 0,5 % por uronefrose. Para fins de análise, foram coletadas cinco amostras (R₁ a R₅) suspeitas de cisto urinário, quatro amostras de congestão (R₆ a R₉) e uma de isquemia (R₁₀). A Tabela 1 demonstra os resultados obtidos através da análise histológica das referidas amostras.

DISCUSSÃO

A inespecificidade da análise macroscópica das lesões identificadas em frigoríficos, bem como a importância de métodos complementares de diagnóstico para o Serviço de Inspeção Veterinária tem sido alvo de estudo de vários pesquisadores. Furlanetto e colaboradores³ realizaram uma pesquisa visando analisar o uso de métodos complementares na inspeção *post mortem* com suspeita de tuberculose e concluíram que equívocos podem ocorrer durante a inspeção, quando apenas a avaliação macroscópica é utilizada. Da mesma forma, Mendes e colaboradores¹ realizaram avaliação visando confirmar se linfonodos de carcaças condenadas por tuberculose macroscopicamente por profissionais do SIF apresentam lesões microscópicas compatíveis com esta enfermidade e detectaram que, embora o índice de acerto por parte dos agentes de inspeção tenha sido satisfatório, poderia ter sido melhorado através da análise anatomopatológica. Os resultados demonstrados em nosso trabalho corroboram com as observações realizadas pelos referidos autores.

Além disso, Mendes e colaboradores¹ salientam que a implantação de técnicas histológicas proporcionaria ao inspetor uma metodologia útil para diferenciar entre um processo infeccioso ou não. Este fato pode ser extrapolado para outros tipos de lesões, como as aqui descritas. Além disso, essa técnica poderia servir de treinamento para o inspetor, gerando conhecimento através do aprendizado, o que possibilitaria a realização de uma correlação entre a lesão macroscópica e a microscópica, que acarretaria possivelmente na diminuição de futuros erros¹.

Neste trabalho, quatro amostras de coração condenados por pericardite foram analisadas e o exame histopatológico confirmou o diagnóstico realizado pelo Serviço de Inspeção. A pericardite serofibrinosa e fibrinosa são as formas mais comumente encontradas em bovinos. Pode-se observar esses tipos de pericardite em moléstias nas quais também ocorre

uma pleurite fibrinosa, como a encefalomielite bovina esporádica, pasteurelose, pleuropneumonia dos bovinos e caprinos, e também em diversas infecções bacterianas primárias do pericárdio, embora nem sempre a causa seja identificada⁴. Entretanto, sinais clínicos de pericardite traumática como taquicardia, sons cardíacos anormais, distensão da veia jugular, sinais de dor e febre, não ocorrem nestes casos.

Das amostras de coração analisadas neste trabalho, duas apresentaram inúmeros cistos de *Sarcocystis* sp. Os bovinos são os hospedeiros intermediários para três espécies de sarcosporídeos: *Sarcocystis cruzi*, *Sarcocystis hirsuta* e *Sarcocystis hominis*, cujos hospedeiros definitivos são o cão, o gato e os primatas, respectivamente. As espécies de *Sarcocystis* do homem (*S. hominis*) e do gato (*S. hirsuta*) são pouco patogênicas para os bovinos, praticamente não causando sinais clínicos. Por outro lado, o *S. cruzi*, cujo hospedeiro definitivo é o cão, provoca sinais clínicos e doença severa em bovinos⁵. Pouco se conhece sobre a etiologia desses parasitos e a formação de cistos no tecido muscular causados por eles, porém, por seu aspecto desagradável, os corações que apresentam esta lesão durante a inspeção *post mortem* são descartados.

Dos pulmões condenados durante o período de execução do trabalho, enfisema e aspiração de sangue ou de conteúdo ruminal foram as alterações mais evidenciadas. Segundo Lima e colaboradores⁶, a má insensibilização do animal durante o fluxograma de abate provoca um quadro de enfisema agônico, com consequente aspiração de sangue e de conteúdo ruminal para os pulmões. Desta forma, os índices de condenação de pulmão observados em nosso trabalho podem estar relacionados a procedimentos de abate inadequados.

O enfisema alveolar é caracterizado por distensões e ruptura das paredes alveolares, com formação de bolhas de ar de tamanhos variáveis no parênquima pulmonar. Microscopicamente, muitos alvéolos são demasiadamente grandes e apresentam aberturas amplas entre si, ou para um espaço comum, em decorrência das paredes

alveolares rompidas. Já o enfisema pulmonar intersticial é um distúrbio em que o ar se acumula nos septos interlobulares, por sob a pleura e em qualquer local em que ocorra tecido intersticial nos pulmões⁷. Esse tipo de enfisema é observado mais frequentemente como um fenômeno terminal, quando a morte por alguma causa distinta foi acompanhada por esforços violentos para compensação da crescente anóxia. Uma das situações mais familiares desse tipo é a morte por perda de sangue⁸.

Em uma das amostras de pulmão analisadas neste trabalho foi realizado o diagnóstico histopatológico de broncopneumonia bacteriana. As principais bactérias envolvidas nas pneumonias e broncopneumonias em bovinos são *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Histophilus somni*, *Mycoplasma bovis*, *Arcanobacterium pyogenes*, *Bibersteinia trehalosi*⁹.

Da análise realizada nas amostras de fígado, observou-se que a principal causa de condenação foi teleangiectasia, seguida por abscesso hepático e a causa menos observada foi a contaminação do órgão. Em um estudo realizado no estado de Minas Gerais, as condenações de fígado ocorreram por abscesso (37,27 %), cirrose (27,55 %), contaminação (14,36 %), teleangiectasia (9,22 %), perihepatite (6,91 %) e hidatidose (2,42 %)⁵. Em Santa Catarina, Mendes e Pilatti² observaram uma frequência de condenação por teleangiectasia de 32,3 %. Esses dados demonstram que existe variação dos motivos de condenação de fígados entre nas Regiões brasileiras.

A teleangiectasia é especialmente comum em bovinos, e não tem qualquer significado clínico. Caracteriza-se pela dilatação de vasos sanguíneos funcionais em qualquer parte do corpo. No fígado, a lesão consiste de pequeno grupo de sinusóides dilatados dentro de qualquer parte de um lóbulo⁸. Já a esteatose ou lipidose hepática é o acúmulo de triglicérides e outros metabólitos lipídicos (gorduras neutras e colesterol), no fígado, causando alterações na função hepática (aumento das enzimas hepáticas, icterícia), uma vez que o fígado é o principal órgão do metabolismo lipídico¹¹. Embora as lesões

Tabela 1. Comparação entre o diagnóstico macroscópico realizado pelos agentes de Inspeção e o diagnóstico histopatológico em órgãos e vísceras condenados durante a inspeção post-mortem realizada em um frigorífico registrado no Serviço de Inspeção Federal (SIF), localizado no município de Castanhal, Estado do Pará, Brasil

Identificação da amostra	Órgão/Viscera	Diagnóstico macroscópico (Abatedouro-frigorífico)	Análise anatomo-patológica (Laboratorial)	Diagnóstico histopatológico
C1	Coração	Pericardite	Infiltrado de macrófagos, linfócitos e plasmócitos na pleura visceral e miocárdio, com marcado edema. Presença de inúmeras estruturas compatíveis com <i>Sarcocystis</i> sp. e redes de fibrina no pericárdio.	Pericardite mononuclear crônica moderada
C2				
C3	Coração	Pericardite	Tecido conjuntivo frouxo e infiltrado moderado de linfócitos e plasmócitos	Pericardite linfoplasmocitária discreta focal
C4	Coração	Pericardite	Infiltrado plasmocitário discreto no pericárdio	Órgão sem lesões clinicamente significativas
P1	Pulmão	Enfisema	Rompimento das paredes alveolares, com formação de comunicações interalveolares	Enfisema
P2				
P3	Pulmão	Enfisema	Presença de pequenas e discretas áreas de enfisema	Enfisema pulmonar alveolar
P4	Pulmão	Pleuris	Presença de grandes áreas de enfisema envolvendo septos interlobulares	Enfisema intersticial
P5	Pulmão	Bronquite	Broncopneumonia piogranulomatosa, multifocal a coalescente e acentuada	Broncopneumonia piogranulomatosa
F1	Fígado	Teleangiectasia	Congestão e dilatação vascular, com compressão do parênquima adjacente	teleangiectasia
F2	Fígado	Teleangiectasia	infiltrado multifocal de linfócitos próximo a superfície capsular e nenhuma dilatação vascular	serosite linfocítica, discreta, focal
F3	Fígado	Congestão	infiltrado periportal mononuclear discreto, pequenas áreas focais de necrose e substituição e presença de pigmentos biliares discretos	Hepatite peri-portal crônica, discreta.
F4	Fígado	Esteatose	esteatose focal discreta, próximo à capsula do fígado e congestão moderada	Esteatose
F5	Fígado	Abscesso	granuloma caracterizado por centro necrótico rodeado por macrófagos e células epitelióides, delimitado por tecido conjuntivo e presença de pequenos granulomas adjacentes	Granuloma

continua

continuação

I1	Intestino	esofagostomose	inflamação da mucosa intestinal e ao corte a presença do parasito <i>Oesophagostomum</i> sp. Microscopia: Infiltrado de macrófagos e células epitelióides na lâmina própria e submucosa	esofagostomose
I2	Intestino	esofagostomose	inflamação da mucosa intestinal e ao corte a presença do parasito <i>Oesophagostomum</i> sp. Microscopia: Infiltrado de linfócitos, plasmócitos, macrófagos e eosinófilos na mucosa e submucosa intestinal, serosa apresentando uma área isolada de infiltrado de eosinófilos e macrófagos formando um granuloma	esofagostomose
R1			Presença de distensões esféricas com paredes delgadas e tamanhos que variavam de poucos milímetros até 6 cm de diâmetro, com conteúdo translúcido em seu interior. Microscopia: Área cística delimitada por tecido conjuntivo no córtex renal, sem conteúdo	
R2	Rim	Cisto urinário		Cisto urinário
R3				
R4	Rim	Cisto urinário	Presença de distensões esféricas com paredes delgadas e tamanhos que variavam de poucos milímetros até 6 cm de diâmetro, com conteúdo translúcido em seu interior. Microscopia: sem identificação de área cística	Cisto urinário
R5	Rim	Cisto urinário	Aglomerado de hemácias abaixo da cápsula	Hematoma subcapsular
R6	Rim	Congestão	Presença de cisto urinário e áreas de coloração vermelho escura, próximas ao cisto. Microscopia: congestão moderada da área medular e presença de cisto na área cortical delimitado por tecido conjuntivo e área de infiltrado linfoplasmocitário focal discreto	Cisto urinário
R7				
R8	Rim	Congestão	Congestão moderada na região medular	Congestão
R9	Rim	Congestão	Áreas enegrecidas puntiformes sob a superfície capsular, com penetração no parênquima. Microscopia: congestão moderada nas regiões cortical e medular do rim.	Congestão
R10	Rim	Isquemia	Infiltrado glomerular e túbulo-intersticial de linfócitos e macrófagos	Glomerulonefrite mononuclear crônica moderada

OBS. As informações em negrito indicam amostras que demonstraram diferença entre o diagnóstico macroscópico e microscópico

histológicas encontradas nos fígados analisados não tenham reflexos clínicos, certamente a decisão de condenar o órgão se deu em função do prejuízo de suas características comerciais, visto que segundo a legislação brasileira vigente o fato de uma peça cárnea, órgão ou víscera causar repugnância é motivo para condenação do alimento¹¹.

Das amostras de intestino analisadas, observou-se a presença de granulomas. O granuloma é um foco de inflamação crônica consistindo de agregados microscópicos de

macrófagos transformados em células semelhantes a células epiteliais cercadas por um colar de leucócitos mononucleares, especialmente linfócitos, e ocasionalmente, plasmócitos¹². Os vermes nodulares de ruminantes (*Oesophagostomum columbianum* e *Oesophagostomum radiatum*) causam nódulos mineralizados subserosos que são característicos da doença. Esses nódulos geralmente não apresentam significado clínico, mas tornam o intestino impróprio para uso na fabricação de derivados.

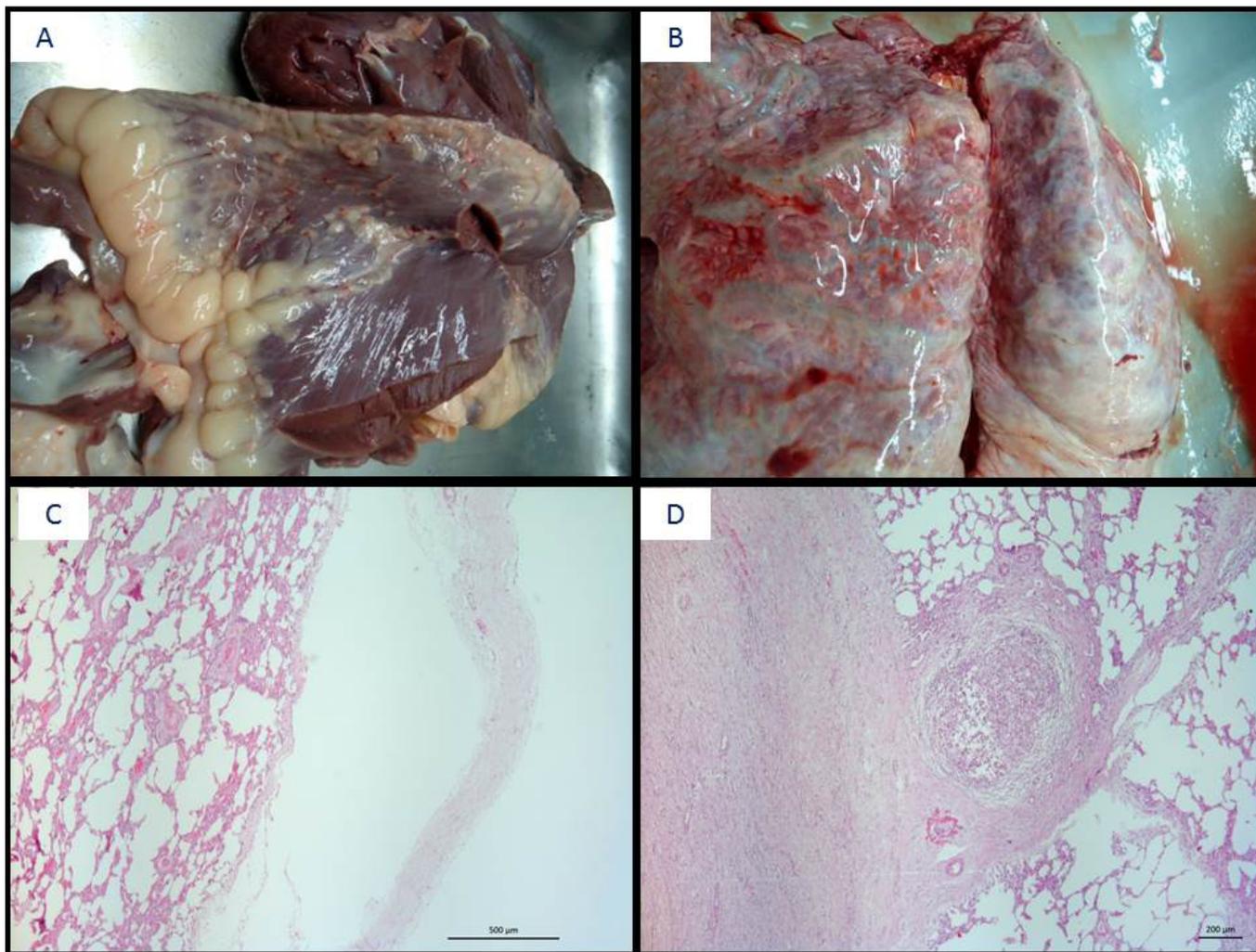


Figura 1. Resultados obtidos a partir da análise anatomo-patológica de órgãos condenados pelo Serviço de Inspeção Veterinário em um matadouro-frigorífico localizado no município de Castanhal, Estado do Pará, Brasil, onde: A: Bovino, coração: Aspecto macroscópico de víscera condenada por pericardite; B: Bovino, pulmão: Aspecto macroscópico de órgão condenado por enfisema; C: Bovino, pulmão: Fotomicrografia de pulmão condenado por pleurisy, evidenciando enfisema sub-pleural. Coloração de hematoxilina-eosina. Aumento de 5X; D: Bovino, pulmão: Fotomicrografia de pulmão condenado por pneumonia, evidenciando infiltrado piogranulomatoso focal, com formação de piogranuloma. Coloração de hematoxilina-eosina. Aumento de 5X

Durante o período de realização deste trabalho foram observadas condenações de rins principalmente por isquemia e congestão. Estes dados discordam com os descritos anteriormente por Mendes e colaboradores¹, que demonstraram uma frequência de 35 % de condenações de rins por cisto urinário, 9,5 % por isquemia e 6 % por congestão. Já no município de Simões Filho, estado da Bahia, segundo Almeida Filho e colaboradores¹³, os rins foram responsáveis por 52,10 % das condenações, sendo que as principais alterações detectadas foram congestão venosa (32,83 %), isquemia (31,87 %) e nefrite (28,86 %).

A isquemia renal, advinda de notável redução da perfusão renal, pode produzir lesão celular tubular sub-letal e disfunção ou causar a morte celular por necrose ou apoptose. Já os cistos renais são distensões esféricas, principalmente dos túbulos corticais ou medulares, de parede fina, tamanho que varia de pouco visível a vários centímetros de diâmetro, e são preenchidos com fluido claro aquoso. Por sua vez, os rins congestionados possuem coloração roxo escuro e liberam sangue da superfície de corte, devido ao acúmulo de sangue não oxigenado no sistema venoso renal. Microscopicamente, os vasos venosos e arteriais são distendidos com sangue e se houve tempo suficiente para coagulação do sangue, soro e células sanguíneas podem estar presentes¹⁴.

Embora os dados aqui demonstrados sejam de extrema relevância, novos estudos incluindo um maior número de amostras e análise anatomo-patológica de órgãos liberados pelo SIF devem ser realizados, visando reforçar as informações aqui disponibilizadas.

CONCLUSÃO

Concluiu-se que os critérios de condenação sanitária adotados pelos agentes de inspeção foram muito semelhantes aos diagnósticos histopatológicos encontrados no presente trabalho e que a análise microscópica pode servir de ferramenta, tanto para o treinamento dos agentes de inspeção quanto para o auxílio do diagnóstico realizado na rotina de trabalho destes profissionais.

REFERÊNCIAS

1. Mendes RE, Schneider AF, Werlich DE, Lucca NJ, Lorenzett MP, Pilati, C. Estudo anatomopatológico em tecidos condenados pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF) por suspeita de tuberculose. *Cienc Anim Bras*. 2013;14(4):448-53. [DOI: 10.5216/cab.v14i4.8581].
2. Mendes RE, Pilatti C. Estudo morfológico de fígado de bovino abatido em frigoríficos industriais sob inspeção estadual no oeste e no planalto central de Santa Catarina, Brasil. *Cienc Rural*.2007;37(6):1728-34.
3. Furlanetto LV, Figueiredo EES, Conte Júnior CA, Carvalho RCT, Silva FGS, Silva JT, et al. Uso de métodos complementares na inspeção *post mortem* de carcaças com suspeita de tuberculose bovina. *Pesq Vet Bras*.2012;32(11):1138-44. [DOI: 10.1590/S0100-736X2012001100011].
4. Jones TC, Hunt RD, King NW. *Patologia Veterinária*. São Paulo (SP): Manole; 2000.
5. Ruas JL, Cunha CW, Silva SS. Prevalência de *Sarcocystis* spp. (Lankester, 1882) em bovinos clinicamente sadios, da região do Rio Grande do Sul, Brasil. *Rev Bras Agrocienc*.2001;7(3):227-30. [DOI: 10.18539/CAST.V7I3.402]
6. Lima MFC, Suassuna ACD, Ahid SMM, Filgueira KD. Análise das alterações anatomopatológica durante a inspeção *post mortem* em bovinos no abatedouro frigorífico industrial de Mossoró, Rio Grande do Norte. *Cienc Anim*.2007;17(2):113-6.
7. López A. Sistema respiratório, mediastino e pleuras. *In: Mcgavin MD, Zachary JF, organizador. Bases da Patologia em Veterinária*. Rio de Janeiro: Elsevier; 2009. 1324 p.
8. Braun U. Traumatic pericarditis in cattle: Clinical, radiographic and ultrasonographic findings. *Vet J*.2009;182(2):176-86. [DOI: 10.1016/j.tvjl.2008.06.021].
9. Panciera RJ, Confer AW. Pathogenesis and Pathology of Bovine Pneumonia. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*.2010;26:191-214. [DOI:10.1016/j.cvfa.2010.04.001].

10. Myers RK, Mcgavin MD. Respostas celulares e teciduais à lesão. In: Mcgavin MD, Zachary JF, organizador. *Bases da Patologia em Veterinária*. Rio de Janeiro: Elsevier; 2009. 1324p.
11. 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. 1952.
12. Kumar V, Abbas AK, Fausto N. Inflamação aguda e crônica. In: Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC. *Robbins & Cotran, Patologia - Bases Patológicas das Doenças*. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005. p.49-89.
13. Almeida Filho JM, Torres PEIMV, Cruz AL, Edington LN, Lopes MB, Caregnato CZ et al. Principais causas de condenação de órgãos de bovinos abatidos em matadouros sob serviço de inspeção estadual em Simões Filho – BA de maio de 2007 à julho de 2010. *Rev Hig Aliment*. 2011;25(194/195):511.
14. Newman JN, Confer AW, Panciera RJ. Sistema Urinário. In: Mcgavin MD, Zachary JF, organizador. *Bases da patologia em Veterinária*. Rio de Janeiro: Elsevier; 2009. 1324p.

Boas Práticas em Serviços de Alimentação do Mercado Municipal de Curitiba-PR

Good Practices in Food Services at the Municipal Market of Curitiba – PR

RIALA6/1665

Gisele RAIMUNDO¹, Ana Lúcia SERAFIM², Laissa Benites MEDEIROS³, Caroline dos Santos PEIXOTO⁴, Naína Lopes de Souza de JESUS⁵, Lize STANGARLIN-FIORI^{6*}

* Endereço para correspondência: ⁶Departamento de Nutrição, Universidade Federal do Paraná. Av. Lothário Meissner, 632, Jardim Botânico, Curitiba, PR, Brasil. CEP: 80210-170. Tel: 41 9277-2506. E-mail: lizestangarlin@hotmail.com

¹Curso de Nutrição, Universidade Tuiuti do Paraná, Curitiba, PR

²Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS

³Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, RS

⁴Curso de Nutrição, Centro Universitário Franciscano, Santa Maria, RS, Brasil

⁵Pós-graduação MBA em Gestão da Qualidade e Segurança Alimentar, Universidade Tuiuti do Paraná, Curitiba, PR, Brasil

Recebido: 17.03.2015 - Aceito para publicação: 26.08.2015

RESUMO

Os mercados municipais localizados nas grandes cidades brasileiras são considerados pontos turísticos importantes e devem dispor de alimentos e serviços de qualidade. O objetivo do estudo foi de avaliar as Boas Práticas em Serviços de Alimentação do mercado municipal de Curitiba, Paraná. Foram avaliados seis estabelecimentos, por meio de lista de verificação, observando-se os requisitos de Boas Práticas, que foi aplicada por profissional capacitado na área de segurança dos alimentos. Calculou-se o percentual de adequação geral e por requisitos, e os Serviços de Alimentação foram classificados em Grupo 1- de 76 a 100 % de atendimento dos itens; Grupo 2- de 51 a 75 % e Grupo 3- de 0 a 50 %. Todos os estabelecimentos foram classificados no Grupo 2 e o maior percentual de adequação foi o controle integrado de vetores e pragas urbanas e o abastecimento de água, com 100 % de conformidade. Os requisitos de documentação, registros e responsabilidades não apresentaram itens adequados. Conclui-se que há necessidade de melhoria nos requisitos exigidos quanto às Boas Práticas para Serviços de Alimentação, principalmente nos itens documentação, registros e responsabilidade, que são essenciais para a organização, padronização das atividades de rotina e contribuição para oferta de alimentos seguros.

Palavras-chave. manipulação de alimentos, higiene dos alimentos, qualidade dos alimentos, inspeção de alimentos.

ABSTRACT

The municipal markets located in the large Brazilian cities are considered as important touristic spots, and they ought to provide high quality food and service. This study evaluated the Good Practices in Food Services at the Municipal Market of Curitiba, Paraná. Six establishments were evaluated by means of a checklist covering the Good Practice requirements, which was applied by a food-safety trained professional. The percentages of overall adequacy and of every requisite were calculated, and the Food Services were classified into Group 1- reaching 76-100 % of items; Group 2- 51-75 %; Group 3- 0-50 %. All of the evaluated markets were classified into Group 2, and the highest adequacy percentages were in the integrated urban vector and pest control and in the water supply, showing 100 % of compliance. The requirements on documentation, records and responsibilities did not reach any adequacy. The evaluated Food Services should be improved in the requirements for Good Practices, especially regarding to the documentation, records and responsibility items, as they are essential for the organization, standardization of the routine activities and for subsiding the safe food tender.

Keywords. food handling, food hygiene, food quality, food inspection.

INTRODUÇÃO

O mercado municipal de Curitiba (PR) foi construído em 1958, e atualmente dispõe de 72 mil itens de alimentação, tornando-se um local de referência para o encontro de turistas e gastronomia. Sua praça de alimentação possui diversos tipos de Serviços de Alimentação, como sanduicherias, pastelarias, casas de massas, cozinha japonesa, restaurantes com carnes especiais ou vegetarianos e restaurantes orgânicos, sendo considerado um ponto turístico importante do município¹.

O cuidado em relação às condições higiênico-sanitárias nos Serviços de Alimentação localizados nos mercados municipais é de suma importância, pois a contaminação dos alimentos é cada vez mais frequente e pode afetar a saúde dos consumidores^{2,3}. Dados epidemiológicos da Secretaria de Vigilância em Saúde, entre os anos de 2000 a 2014, registraram 9.928 casos de surtos de doença de origem alimentar no Brasil, sendo os Serviços de Alimentação, o segundo local de maior ocorrência⁴.

Visando o controle higiênico-sanitário dos alimentos e a saúde dos indivíduos, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária publicou em 2004, a Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) n.º 216⁵, que dispõe sobre os requisitos necessários para a implementação das Boas Práticas em Serviços de Alimentação. Esse é considerado um programa de segurança dos alimentos, que consiste na adequação das melhorias estruturais, pessoais, operacionais e documentais da empresa, visando garantir as condições higiênico-sanitárias do alimento preparado⁶.

Diante do exposto, o objetivo desse estudo foi avaliar as Boas Práticas em Serviços de Alimentação do mercado municipal de Curitiba, PR.

MATERIAL E MÉTODOS

Para definir a amostra do estudo foi realizado um levantamento das características dos estabelecimentos localizados no mercado municipal da cidade de Curitiba, PR, sendo

definidos aqueles que serviam refeições no horário do almoço e que tivessem interesse em participar.

Para a coleta de dados, utilizou-se uma lista de verificação para avaliação das Boas Práticas em Serviços de Alimentação, baseado na Resolução RDC nº 216/2004⁵ e proposto por Saccol et al⁷. A lista contemplava os seguintes requisitos: edificações e instalações (17 itens); higienizações de instalações, equipamentos, móveis e utensílios (7 itens); controle integrado de vetores e pragas urbanas (3 itens); abastecimento de água (4 itens); manejo de resíduos (3 itens); manipuladores de alimentos (8 itens); matérias-primas, ingredientes e embalagens (6 itens); preparação e transporte de alimentos (23 itens); exposição ao consumo do alimento preparado (7 itens); documentação e registro e responsabilidade (10 itens). A lista foi aplicada em cada Serviço de Alimentação, no período de agosto a dezembro de 2013, por um profissional capacitado na área de segurança dos alimentos, sendo os requisitos avaliados como adequado, inadequado ou não se aplica. Após, calculou-se o percentual de adequação geral e por requisitos, sendo os estabelecimentos classificados em Grupo 1, quando apresentaram de 76 a 100 % de atendimento dos itens; Grupo 2, com 51 a 75 % de atendimento dos itens e Grupo 3, com 0 a 50 % de atendimento dos itens⁸.

Os resultados foram analisados por meio de estatística descritiva simples (média e porcentagem), com a apresentação em tabelas de frequência.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após os critérios de inclusão, a amostra do estudo foi composta por seis Serviços de Alimentação do mercado municipal de Curitiba, PR, sendo distribuídos nos seguintes serviços: um *self-service*, três A La Carte e dois A La Carte e *self-service* juntos.

Na Tabela 1, encontra-se o resultado da média geral e classificação dos Serviços de Alimentação avaliados em relação às Boas Práticas. Constatou-se que todos os estabelecimentos foram classificados no Grupo 2, com 51 a 75 % de atendimento dos itens. Este resultado foi

semelhante ao encontrado em outro estudo⁹, o que demonstrou que apesar do programa de Boas Práticas apresentar caráter obrigatório para Serviços de Alimentação, desde o ano de 2004, ainda existem locais em desacordo com os requisitos exigidos pela legislação sanitária vigente e estes precisam ser melhorados para garantir as condições higiênico-sanitárias dos alimentos e não colocar em risco a saúde dos consumidores.

Para a implementação das Boas Práticas em Serviços de Alimentação todos os requisitos da legislação sanitária vigente⁵ devem estar em conformidade no estabelecimento, entretanto para ordenar as prioridades de adequação em caso de haverem muitos itens inadequados, sugere-se que sejam realizadas primeiramente, em caráter de urgência, as melhorias dos requisitos considerados de maior risco sanitário. Neste sentido recomenda-se priorizar, no primeiro momento, os itens relacionados ao tempo e temperatura dos alimentos; a prevenção da contaminação cruzada, levando em consideração aspectos de higienização e condutas e comportamentos dos manipuladores de alimentos e os critérios de matéria-prima e ingredientes utilizados, pois os mesmos podem interferir diretamente na qualidade e

segurança dos alimentos.

Outra recomendação é a utilização da Lista de Avaliação de Boas Práticas aplicada para Categorização dos Serviços de Alimentação na Copa do Mundo FIFA/2014, para elencar os itens prioritários no processo de adequação. Essa lista apresenta 51 itens determinados pela Anvisa como essenciais para produção de alimentos seguros¹⁰.

Em relação ao percentual de adequação dos requisitos de Boas Práticas para Serviços de Alimentação (Tabela 2), constatou-se que o controle integrado de vetores e pragas urbanas e abastecimento de água foram os que apresentaram melhor percentual de adequação, obtendo 100% em todos os estabelecimentos. Esse resultado foi satisfatório e demonstrou que a administração do mercado municipal apresentou-se comprometida com a legislação sanitária vigente, pois esses requisitos são de sua responsabilidade.

Estudo realizado em quinze estabelecimentos alimentícios da região central do Rio Grande do Sul, também evidenciou maior percentual de adequação nos requisitos de controle integrado de vetores e pragas urbanas e abastecimento de água, porém atribuíram este resultado a maior exigência destes itens por parte dos órgãos fiscalizadores dos seus municípios¹¹. Isso confirmou que a fiscalização frequente e conscientização dos responsáveis podem ser determinantes para a implementação das Boas Práticas em Serviços de Alimentação.

No item edificações e instalações (Tabela 2), os estabelecimentos apresentaram média de 95 % de adequação, sendo evidenciado como principais não conformidades à presença de equipamento em desuso nas áreas internas e ausência de instalações sanitárias e vestiários para os manipuladores em todos os estabelecimentos avaliados, sendo utilizado o banheiro de uso comum para os clientes.

Estudo realizado por Ferreira et al¹² em Serviço de Alimentação, também observaram a ausência de sanitários exclusivos para os manipuladores de alimentos e inadequações em relação à estrutura física. Isso demonstra

Tabela 1. Média geral de adequação dos locais pesquisados e a respectiva classificação, quanto às Boas Práticas para Serviços de Alimentação, Curitiba, Brasil, 2013

Serviços de Alimentação	% Adequação	Classificação
1	62	Grupo 2
2	60	Grupo 2
3	62	Grupo 2
4	59	Grupo 2
5	65	Grupo 2
6	67	Grupo 2

Legenda: Grupo 1: 76 a 100 % de adequação; Grupo 2: 51 a 75 % de adequação; Grupo 3: 0 a 50 % de adequação

Tabela 2. Avaliação do percentual de adequação dos requisitos de Boas Práticas média geral, em seis Serviços de Alimentação do mercado municipal de Curitiba, PR, Brasil, 2013

Requisitos	Serviços de Alimentação (% AD)						MG (%AD)
	1	2	3	4	5	6	
Edificações e instalações	100	90	90	100	95	95	95
Higienizações de instalações, equipamentos móveis e utensílios	80	65	60	80	70	75	72
Controle integrado de vetores e pragas urbanas	100	100	100	100	100	100	100
Abastecimento de água	100	100	100	100	100	100	100
Manejo de resíduos	100	85	85	90	90	90	90
Manipuladores de alimentos	75	70	70	75	60	70	70
Matérias-primas, ingredientes e embalagens	95	85	80	90	90	85	87
Preparação e transporte de alimentos	85	70	70	80	75	70	75
Exposição ao consumo do alimento preparado	95	95	80	90	90	85	89
Documentação e Registro	0	0	0	0	0	0	0
Responsabilidade	0	0	0	0	0	0	0

Legenda: AD: adequação; MG: média geral

que muitos estabelecimentos não têm ou não priorizam recursos financeiros para a realização dos investimentos necessários⁸. A estrutura física é considerada um requisito determinante na implementação das Boas Práticas em Serviços de Alimentação e os estabelecimentos que não apresentarem uma adequada planta física poderão comprometer a produção de um alimento seguro e consequentemente a eficiência do programa.

No requisito de manipuladores de alimentos (Tabela 2), constatou-se que a média atingida pelos Serviços de Alimentação foi de 70 % em atendimento à legislação vigente, não sendo observada a presença de cartazes de orientação sobre os procedimentos para higienização das mãos e demais hábitos de higiene afixados em local visível. Esse resultado pode contribuir para a realização de procedimentos inadequados e descuidos em relação às condutas e comportamentos dos manipuladores de alimentos durante as

rotinas de trabalho. Verificou-se ainda, que os estabelecimentos não tinham programa de capacitação e não supervisionam periodicamente os manipuladores em relação aos critérios exigidos para as Boas Práticas em Serviços de Alimentação.

Os manipuladores de alimentos podem ser uma via de transmissão de micro-organismos patogênicos aos alimentos, quando não realizam os procedimentos corretamente⁷. Portanto, as capacitações e supervisões devem ser realizadas frequentemente com intuito de auxiliar na adequação das atividades de rotina e que o comportamento adquirido se torne hábito.

Os Serviços de Alimentação avaliados no estudo, não apresentaram percentual de adequação em relação à documentação, registros e responsabilidade (Tabela 2). Este resultado foi atrelado à ausência de Manual de Boas Práticas, de Procedimentos Operacionais Padronizados e do responsável pela manipulação de alimentos, comprovadamente submetido

a curso de capacitação, conforme exigido pela legislação sanitária vigente⁵.

A elaboração dos documentos de Boas Práticas é de suma importância em Serviços de Alimentação, pois auxilia na padronização das atividades de rotina e no controle das condições higiênicossanitárias. Estudo realizado em estabelecimentos alimentícios do Rio de Janeiro (RJ), verificaram que após a implementação desses documentos houve melhorias nos procedimentos de higienização; maior desempenho das tarefas pelos colaboradores; diminuição do desperdício e facilidade na inspeção da fiscalização sanitária¹³.

A ausência na adequação dos requisitos exigidos pelo programa de Boas Práticas em Serviços de Alimentação pode estar relacionada ao baixo investimento disponibilizado pelos estabelecimentos, ausência de tempo, interesse, conhecimento e experiência dos responsáveis pela manipulação, gestores e manipuladores de alimentos, assim como pouca exigência dos órgãos oficiais¹⁴. Neste sentido, evidencia-se a necessidade dos envolvidos nas atividades de manipulação, aprofundarem seus conhecimentos em relação aos itens de Boas Práticas, tendo uma visão mais crítica para identificar e melhorar as possíveis não conformidades encontradas nos Serviços de Alimentação.

CONCLUSÃO

Conclui-se que os Serviços de Alimentação do mercado municipal, avaliados no estudo, precisam adequar-se quanto aos requisitos exigidos pela legislação sanitária vigente, em relação às Boas Práticas.

Sugere-se que sejam realizadas primeiramente, em caráter de urgência, as melhorias dos requisitos considerados de maior risco sanitário, ou seja, aqueles relacionados ao tempo e temperatura dos alimentos, a prevenção da contaminação cruzada, levando em consideração aspectos de higienização e condutas e comportamentos dos manipuladores de alimentos e os critérios de matéria-prima e ingredientes utilizados,

pois os mesmos podem interferir diretamente na qualidade e segurança dos alimentos. Os itens em relação à documentação, registros e responsabilidade também devem ser adequados, pois são essenciais para a organização e padronização das atividades de rotina e contribuição para a oferta de alimentos seguros.

Neste sentido, cabe aos responsáveis pelas atividades de manipulação, proprietários, gestores e manipuladores de alimentos maior conhecimento em relação aos requisitos de Boas Práticas, no qual pode ser adquirido por meio de capacitações ou consultorias externas, isto facilita a avaliação e adequação das prioridades e permite maior comprometimento e eficácia dos procedimentos realizados nos Serviços de Alimentação.

REFERÊNCIAS

1. Mercado Municipal de Curitiba. 2013 [acesso 2015 Jun 05]. Disponível em: [<http://www.mercadomunicipaldecuritiba.com.br>].
2. Chouman K, Ponsano EHG, Michelin AF. Qualidade microbiológica de alimentos servidos em restaurantes *self-service*. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2010;69(2):261-6.
3. Santana NG, Almeida RCC, Ferreira JS, Almeida PF. Microbiological quality and safety of meals served to children and adoption of good manufacturing practices in public school catering in Brazil. *Food Control*. 2009;20(3):255-61.
4. Brasil. Ministério da Saúde. Boletim Eletrônico Epidemiológico. 2014 [acesso 2015 Ago 05]. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/ano05_n06_ve_dta_brasil.pdf].
5. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº. 216, de 15 de setembro de 2004. Dispõe sobre Regulamento Técnico de Boas Práticas para Serviços de Alimentação. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 16 set. 2004.
6. Saccol ALF, Stangarlin L, Richards NS, Hecktheuer LH. Avaliação das boas práticas em duas visões: técnica e da empresa. *Braz J Food Technol*. 2009;1(1):19-23.

7. Saccol ALF, Stangarlin L, Hecktheuer LH. Instrumentos de apoio para implantação das boas práticas em serviços de alimentação. 1ª ed. Rio de Janeiro: Editora Rubio; 2012.
8. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº. 275, de 21 de outubro de 2002. Aprovar o regulamento técnico sobre as embalagens e equipamentos metálicos em contato com alimentos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 23 out. 2003. Seção 1, p. 126.
9. Genta TMS, Mikcha JNG, Matioli G. Hygiene conditions of the self-service restaurants by evaluating the microbial quality of the mixed-food preparations. *Rev Inst Adolfo Lutz*.2009;68(1):73-82.
10. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). Portaria nº. 817, de 10 de maio de 2013. Aprova as diretrizes nacionais para a elaboração e execução do projeto-piloto de categorização dos serviços de alimentação para a Copa do Mundo FIFA 2014. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 10 mai. 2013.
11. Stangarlin L, Hecktheuer LH, Serafim AL, Medeiros LB. Evaluation of hygienic-sanitary conditions of hospital nutrition and dietary services from the perspectives of internal and external auditors. *Food Sci Technol*.2013;33(3):521-5. [DOI: 10.1590/S0101-20612013005000058].
12. Ferreira MA, São José JFB, Tomazini APB, Martini HSD, Milagres RCM et al. Avaliação da adequação às boas práticas em unidades de alimentação e nutrição. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2011;70(2):230-5
13. Neto CSF, Guimarães KAS, Sárcia W. Implementação dos Procedimentos Operacionais Padronizados numa Unidade de Alimentação e Nutrição Institucional na cidade do Rio de Janeiro, RJ. *Rev Hig Alim*. 2007;21(154):18-21.
14. 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.

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

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

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

Política Editorial

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

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

Os manuscritos submetidos são analisados inicialmente pelos editores quanto ao atendimento aos padrões da RIAL e às normas para o envio dos originais. Aqueles manuscritos selecionados são encaminhados para avaliação por pares externos de área pertinente, sempre de instituições distintas àquela da origem do manuscrito, sendo garantido o anonimato e a confidencialidade durante todo o processo de avaliação. Após receber os pareceres, o Corpo Editorial, que detém a decisão final sobre a publicação ou não do texto, avalia a aceitação do texto sem modificações, a recusa ou a devolução ao autor com as sugestões apontadas pelos relatores.

Os manuscritos submetidos devem atender à política editorial da RIAL e às Instruções aos Autores, que seguem os *Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Writing and Editing for Biomedical Publication* (<http://www.icmje.org>), além dos critérios éticos da pesquisa humana e animal.

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

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

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

Informações Gerais

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

São aceitos manuscritos nos idiomas: português e inglês.

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

Revista do Instituto Adolfo Lutz (RIAL)

Núcleo de Acervo

Av. Dr. Arnaldo, 355 - Cerqueira César - São Paulo - SP - Brasil - CEP: 01246-000

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

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

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

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

Capítulos de livro:

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

Dissertações, teses e monografias:

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

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

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

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

Dados eletrônicos:

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

Legislação:

Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 10 jan. 2001. Seção 1, nº 7-E, p. 45-53.

Autoria institucional:

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

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

Patente:

Larsen CE, Trip R, Johnson CR, inventors: Novoste Corporation, assignee. Methods for procedures related to eletrophysiology of the heart. US patent 5,529,067. 1995 Jun 25.

Casos não contemplados nesta instrução devem ser citados conforme indicação do Committee of Medical Journals Editors (Grupo Vancouver), disponível em: <http://www.cmje.org>. Referências a documentos não indexados na literatura científica mundial, em geral de divulgação circunscrita a uma instituição ou a um evento (teses, relatórios de pesquisa, comunicações em eventos, dentre outros) e informações extraídas de documentos eletrônicos, não mantidas permanentemente em sites, se relevantes, devem figurar no rodapé das páginas do texto onde foram citadas.

2.5 Números de figuras e tabelas: A quantidade de figuras e tabelas de cada manuscrito deve respeitar a quantidade definida para cada categoria de artigos aceitos pela RIAL. Todos os elementos gráficos ou tabulares apresentados serão identificados como figura ou tabela, e numerados sequencialmente a partir de um, e não como quadros, gráficos etc.

A) Tabelas: Devem ser redigidas em processador de texto Word for Windows 2003 ou compatível e serem apresentadas em arquivos separados, numeradas consecutivamente com algarismos arábicos, na ordem em que foram citadas no texto. A cada uma deve-se atribuir um título breve, não se utilizando traços internos horizontais ou verticais. As notas explicativas devem ser limitadas ao menor número possível e colocadas no rodapé das tabelas e não no cabeçalho ou título. Se houver tabela extraída de outro trabalho, previamente publicado, os autores devem solicitar formalmente autorização da revista que a publicou, para sua reprodução.

B) Figuras: As ilustrações (fotografias, desenhos, gráficos etc.) devem ser citadas como Figuras, apresentadas em arquivos separados e numeradas consecutivamente com algarismos arábicos na ordem em que foram citadas no texto. Devem conter título e legenda apresentados na parte inferior da figura. Só serão admitidas para publicação figuras suficientemente claras e com qualidade digital que permitam sua impressão, preferencialmente no formato vetorial. No formato JPEG, a resolução mínima deve ser de 300 dpi. Figuras em cores serão publicadas quando for necessária à clareza da informação e os custos deverão ser cobertos pelos autores. Se houver figura extraída de outro trabalho, previamente publicado, os autores devem solicitar autorização, por escrito, para sua reprodução.

3. Declarações e documentos solicitados: Em conformidade com as diretrizes do International Committee of Medical Journal Editors, são solicitados alguns documentos e declarações do(s) autor(es) para a avaliação de seu manuscrito. Observe a relação dos documentos abaixo e, nos casos em que se aplique, anexe o documento ao processo. O momento em que tais documentos serão solicitados é variável:

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

A carta de Apresentação do manuscrito, assinada por todos os autores, deve conter:

- Um parágrafo declarando a responsabilidade de cada autor: ter contribuído substancialmente para a concepção e planejamento ou análise e interpretação dos dados; ter contribuído significativamente na elaboração do rascunho ou na revisão crítica do conteúdo; e ter participado da aprovação da versão final do manuscrito. Para 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.



Instituto Adolfo Lutz



SECRETARIA
DA SAÚDE



ISSN 0073-9855

