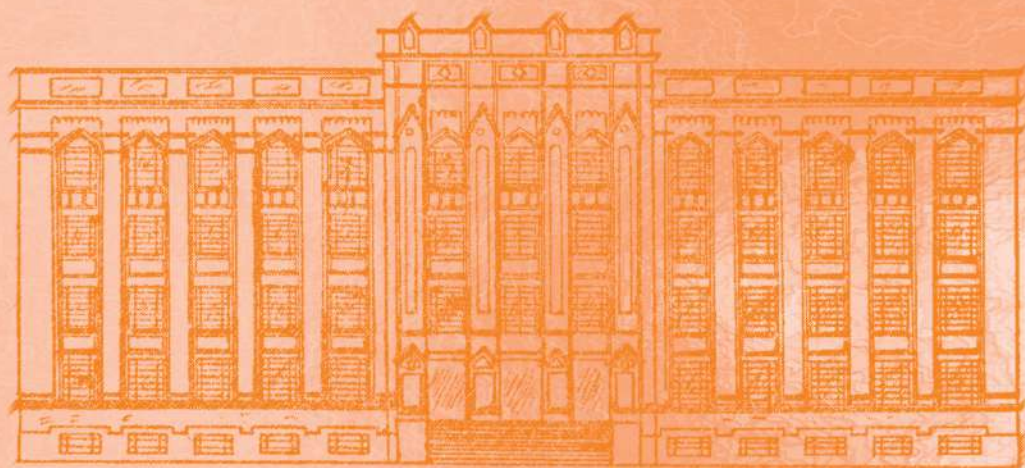


# REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ

ISSN 0073-9855  
RIALA6



Volume 63 número 2, 2004



GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO  
SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE



GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO  
SECRETARIA DE ESTADO DE SAÚDE  
COORDENAÇÃO DOS INSTITUTOS DE PESQUISA  
INSTITUTO ADOLFO LUTZ

**REVISTA  
DO  
INSTITUTO ADOLFO LUTZ**

**Volume 63 número 2, 2004**

**ISSN 0073-9855**

**Julho - Dezembro - 2004**

# INSTITUTO ADOLFO LUTZ

---

## **Diretor Responsável**

Carlos Adalberto de Camargo Sannazzaro  
Diretor Geral do Instituto Adolfo Lutz

## **Comissão de Redação**

Janete Alaburda – Presidente  
Cecília Cristina Marques dos Santos – Secretária  
Ângela Cristina Ghilardi  
Cristina Adelaide Figueiredo  
Cristina Takami Kanamura  
Luz Marina Trujillo  
Marina Yoshiê Sakamoto Maeda  
Raquel dos Anjos Fazioli  
Sabria Aued Pimentel  
Thaís Valéria Milanez – Membro Convidado  
Claydes de Quadros Zamboni – Membro Emérito

## **Setor de Publicações**

Rocely Aparecida de Souza Bueno

---



REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ  
(Secretaria de Estado de Saúde)  
São Paulo, SP – Brasil, 1941

1941-2004,  
2004, 63 (2)

ISSN 0073-9855  
RIALA 6

CDD<sub>18</sub> 614.07205

(\*) 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, AGRINDEX., 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, Virology Abstracts e outros.

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

Endereço / Address  
Biblioteca do Instituto Adolfo Lutz  
Av. Dr. Arnaldo, 355 – São Paulo / SP - Brasil  
01246-902  
Tel/Fax: (11) 3082-9939  
Email: [rial@ial.sp.gov.br](mailto:rial@ial.sp.gov.br)

## AOS INTERESSADOS

A REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ tem por finalidade a divulgação de trabalhos relacionados com as atividades laboratoriais em Saúde Pública. Os artigos destinados à revista serão recebidos apenas se redigidos de acordo com as normas apresentadas a seguir:

### 1) NORMAS PARA PUBLICAÇÃO

O trabalho submetido à publicação deve ser inédito, não sendo permitida a sua apresentação simultânea em outro periódico, conforme declaração a ser assinada pelos autores. Serão aceitos manuscritos em forma de artigos originais, revisões, relatos de casos, notas científicas, comunicações científicas e resumos de teses e dissertações. Os autores deverão informar na carta de encaminhamento em qual categoria o trabalho se enquadra. Os trabalhos redigidos em língua portuguesa ou inglesa, deverão ser enviados para o Setor de Publicações do Instituto Adolfo Lutz, em três cópias impressas, sendo uma completa e as outras duas omitindo os nomes dos autores e respectivas instituições, tanto na página de rosto quanto nos resumos em português e inglês. Após aprovação do trabalho, será solicitado aos autores o envio do artigo completo em disquete 3 ½ acompanhado de uma cópia impressa.

### 2) PUBLICAÇÃO DE UM MANUSCRITO

Os trabalhos serão aceitos para publicação após criticamente, revisados e avaliados por pareceristas indicados pela Comissão de Publicação. Os manuscritos revisados serão devolvidos aos autores para as devidas correções. O novo texto deverá retornar à Comissão que notificará a aceitação ou recusa do trabalho.

### 3) CATEGORIAS

Os seguintes tipos de trabalhos serão aceitos para publicação na Revista do Instituto Adolfo Lutz.

#### 3.1) COMUNICAÇÃO CIENTÍFICA

É o relato sucinto de resultados parciais de um trabalho experimental digno de publicação, embora insuficientes ou inconsistentes para constituírem um artigo original. Deve ser relevante e que mereça rápida divulgação. Deve apresentar no máximo 4 páginas impressas, incluindo tabelas e figuras (no máximo duas tabelas ou 2 figuras ou uma tabela e uma figura) e até 10 referências. O texto deve conter todos os tópicos de um artigo científico, porém sem as divisões.

#### 3.2) NOTA CIENTÍFICA

É o relato conciso de novas e importantes descobertas que requer divulgação rápida para garantir originalidade. A nota científica não deve conter tópicos, porém deve ser redigida de acordo com as instruções para preparação do artigo original. Deve apresentar no máximo 10 páginas, incluindo tabelas e figuras e até 10 referências.

#### 3.3) RELATO DE CASO

Contempla principalmente a área médica, em que o resultado é anterior ao interesse de sua divulgação ou a ocorrência

dos resultados não é planejada. Inclui novas técnicas, terapias, diagnóstico, patologias, materiais e soluções inovadoras para problemas especiais, fenômenos anatômicos e fisiológicos. Deve conter os tópicos: introdução, objetivos, casuística ou resultados, discussão e conclusões e apresentar no máximo duas páginas incluindo figuras e tabelas e até 5 referências.

#### 3.4) ARTIGO DE REVISÃO

Avaliação da literatura sobre determinado assunto, cuja divulgação possa contribuir para melhorar o conhecimento da área em questão. Deve ser subdividido em tópicos, conter resumos em inglês e português. O artigo deve ter um índice e conter no máximo 25 páginas.

#### 3.5) RESUMOS DE TESES E DISSERTAÇÕES

Serão aceitos para publicação os resumos de teses e dissertações até um ano após a defesa. Deverão conter o nome do autor e seu endereço eletrônico, o nome do orientador, título da obra (em português e em inglês), nome da instituição em que foi apresentado o trabalho e ano de defesa. O resumo poderá ser publicado em língua portuguesa ou inglesa, sendo de total responsabilidade do autor o conteúdo do mesmo e também a sua revisão ortográfica e gramatical.

#### 3.6) ARTIGO ORIGINAL

Relato completo de pesquisa original ainda não publicada. Deve apresentar no máximo 20 páginas impressas, incluindo figuras, tabelas e referências bibliográficas.

##### 3.6.1) PREPARAÇÃO DO MANUSCRITO OU ARTIGO

###### Geral

Os textos devem ser redigidos com processador de texto Word for Windows 6.0 ou compatível, no formato A4, espaço duplo, fonte Times New Roman, tamanho 12. Se usar versão superior, enviar o arquivo em Rich Text Format (.rtf). Devem ser evitados arquivos compactados.

###### Estrutura:

**Página de rosto:** a) título do artigo; b) nome do(s) autor(es): nome seguido do último sobrenome por extenso e em caixa alta (ex.: Ana Maria C. D. da SILVA); c) local de trabalho indicado por número sobrescrito. O autor responsável e o seu endereço deverão estar assinalados com asterisco (\*) para encaminhamento da correspondência.

**Resumo:** deve ser redigido em português, ser claro e conciso num único parágrafo, contendo objetivo, metodologias, resultados e conclusões. Não exceder 300 palavras.

**Palavra-chave:** podem ser utilizados até seis descritores que identifiquem o conteúdo do artigo.

**Introdução:** deve iniciar em página nova e deve conter os objetivos da pesquisa, justificativa de sua importância, apresentação das principais variáveis, definições necessárias e discussão do problema de acordo com a literatura pertinente.

**Material e Métodos:** o método deve estar claramente descrito e validado, de modo a possibilitar a sua reprodução. Qualquer modificação, em métodos já publicados, deve ser devidamente explicitada.

**Resultados:** devem ser claros e concisos e podem apresentar tabelas e figuras quando necessárias, que devem ser auto explicativas.

**Discussão:** deve fornecer a interpretação dos resultados em função das informações apresentadas. Este item pode ser incluído no de resultados, não havendo necessidade de repeti-lo em item a parte.

**Conclusão:** deve ser clara, concisa podendo, em alguns casos, ser incluída no item discussão não havendo a necessidade de repeti-la em item a parte.

**Agradecimentos:** é opcional e deve vir após a discussão/conclusão.

**Title, Abstract e Key Words:** devem ser redigidos em inglês e seguir as recomendações apresentadas para a página de rosto, do resumo e das palavras-chave.

**Referências:** As referências devem ser citadas seguindo os “Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals” produzidos pelo International Committee of Medical Journal Editors, também conhecidos como Vancouver Style. Os autores devem seguir as diretrizes da quinta edição (Annals of Internal Medicine 1997; 126: 36-47 ou na página (website) <http://acponline.org/journals/resource/unifreqr/htm> .

As referências devem ser numeradas consecutivamente na ordem em que foram mencionadas a primeira vez no texto. Identifique as referências no texto, tabelas e legendas de ilustrações por numerais arábicos entre parênteses. As referências citadas em tabelas ou em legendas devem ser numeradas de acordo com a seqüência estabelecida pela sua primeira identificação no texto.

Segundo o Sistema Vancouver, deve-se evitar a utilização de resumos como referências; as “observações inéditas” e as “comunicações pessoais” não podem ser usadas como referências, mas as comunicações escritas (não verbais) podem ser inseridas entre parênteses no texto. Os artigos aceitos para publicação, porém, ainda não publicados, podem ser incluídos na relação das referências, bastando indicar a revista e citar entre parêntesis “no prelo”. Informações extraídas de manuscritos submetidos, porém ainda não aceitos, devem ser citados no texto como “observações inéditas” (entre parêntesis).

Os títulos das revistas devem ser abreviados de acordo com o estilo usado ou no Index Medicus seja pela List of Journals Indexed in Index Medicus ou no “website” <http://www.nlm.nih.gov> ou pelo Chemical Abstracts , ISI Science Citation Index, World List of Periodicals (publicado por Butterworks, Londres).

Exemplos

### 1. Artigos em revistas

1.1. Periódicos - Liste os primeiros seis autores seguidos por et al.

Telles MAS, Mosca A. Avaliação da técnica de microdiluição em placa para determinação de concentração inibitória mínima de isoniazida em cepas de Mycobacterium tuberculosis. Rev Inst Adolfo Lutz 2000; 59(1/2): 15-9.

1.2. Número com suplemento

Payne DK, Sullivan MD, Massie MJ. Women’s psychological reactions to breast cancer. Semin Oncol 1996; 23 (1 Suppl 2): 89-97.

1.3. Volume com suplemento

Maio FD. Determinação de chumbo sanguíneo: a importância de programas interlaboratoriais na avaliação da qualidade analítica laboratorial. Rev Inst Adolfo Lutz 2002; 61 (Suppl 1): 3.

1.4. Instituição como autor

The Cardiac Society of Australia and New Zealand. Clinical exercise stress testing. Safety and performance guidelines. Med J Aust 1996; 164: 282-4.

1.5. No prelo (forthcoming)

Leshner AI. Molecular mechanisms of cocaine addiction. N Engl J Med. No prelo 1996.

## 2. Livros e outras monografias

2.1. Indivíduo como autor

Ringsven MK, Bond D. Gerontology and leadership skills for nurses. 2<sup>nd</sup> ed. Albany (NY): Delmar Publishers; 1996.

2.2. Editor(es), compilador(es) como autor(es)

Norman IJ, Redfern SJ, editors. Mental health care for elderly people. New York: Churchill Livingstone; 1996.

2.3. Instituição como autor e editor

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

2.4. Capítulo num livro

Franco DBG, Landgraf M. Microorganismos patogênicos de importância em alimentos. In: Franco DBG, Landgraf, M, editores. Microbiologia dos Alimentos . 2<sup>nd</sup> ed. São Paulo: Ed Atheneu; 1996. p. 55-60.

2.5. Resumo/Trabalho de congresso publicados

DuPont B. Bone marrow transplantation in severe combined immunodeficiency with an unrelated MLC compatible donor. In: White HJ, Smith R, eds. Proceedings of the third annual meeting of the International Society for Experimental Hematology. Houston: International Society for Experimental Hematology, 1974: 44-6.

2.6. Dissertação/Tese

Cairns RB. Infrared spectroscopic studies of solid oxygen [Tese de doutorado]. Berkeley, California: University of California, 1965. 156 pp.

## 3. Material legal

A normalização proposta por Vancouver para legislação não se aplica à realidade brasileira, estudos estão sendo realizados, enquanto isto recomenda-se adotar as normas a seguir:

Os elementos essenciais são: jurisdição (ou cabeçalho da entidade no caso de se tratar de normas), título, numeração e data, emenda e dados da publicação.

Exemplos:

Portaria nº 695 de 1998 da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 30 mar. 1998. Seção 1, nº 60-E, p. 5-6.

Resolução n.16, de 13 de dez. 1984 do Conselho Federal de Educação. Dispõe sobre reajustamento de taxas, ... e altera a redação do artigo 5 da Resolução n.1 de 14/1/83. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil], Brasília, DF, 13 dez. 1984. Seção 1, p. 190-1.

#### 4. Material Eletrônico

##### 4.1. Artigo de revista em formato eletrônico

Morse SS. Factors in the emergence of infectious diseases. *Emerg Infect Dis* [serial online] 1995 Jan-Mar [cited 1996 Jun 5]; 1(1):[24 screens]. Available from: URL: <http://www.cdc.gov/ncidod/EID/eid.htm>

##### 4.2. Monografia em formato eletrônico

CDI, Clinical Dermatology Illustrated [monograph on CD-ROM], Reeves JRT, Maibach H. CME Multimedia Group, producers. 2nd ed. Version 2.0. San Diego: CME; 1995.

##### 4.3. Arquivo de computador

Hemodynamics III: the ups and downs of hemodynamics [computer program]. Version 2.2. Orlando (FL): Computerized Educacional Systems; 1993.

#### 5. Patente

Larsen CE, Trip R, Johnson CR, inventors; Novoste Corporation, assignee. Methods for procedures related to the electrophysiology of the heart. US patent 5,529,067. 1995 Jun 25.

**Abreviaturas** - devem ser evitadas ou usadas apenas as oficiais.

**Unidades de medida e seus símbolos** - utilizar as legais do Sistema Internacional de Metrologia.

**Tabelas** – as tabelas devem ser encaminhadas em folhas separadas e designadas no texto como “Tabelas”. A sua localização aproximada deve ser indicada no texto. Serão numeradas consecutivamente, com números arábicos e encabeçadas pelos respectivos títulos, que devem ser breves e indicar claramente o conteúdo. Os dados apresentados em tabela não devem ser repetidos em gráficos.

**Ilustrações** (fotografias, gráficos, desenhos, mapas etc. ): as ilustrações devem ser encaminhadas em folhas separadas e

designadas no texto como “Figuras”: terão numeração única e seqüencial, em algarismos arábicos e devem apresentar na sua parte inferior e fora da área de reprodução, que devem ser breves e identificar claramente o seu conteúdo. As suas localizações aproximadas devem ser indicadas no texto. Todas as ilustrações devem ser tão claras que permitam sua reprodução com redução de 6,5 cm no sentido da largura, sem perda de nitidez ou legibilidade. As ilustrações coloridas estão sujeitas à confirmação. Se as ilustrações enviadas já tiverem sido publicadas, mencionar a fonte e a permissão para a reprodução.

#### Da Publicação

1. Os trabalhos destinados à publicação na **Revista do Instituto Adolfo Lutz** deverão ser encaminhados à Biblioteca do Instituto Adolfo Lutz, Setor de Publicações, Av. Dr. Arnaldo, 355, Cerqueira César, São Paulo/SP, 01246-902, a/c: Rocely Bueno.

2. A publicação de artigos na Revista está condicionada à aprovação da Comissão de Redação de Publicações Oficiais do Instituto Adolfo Lutz, que poderá sugerir ao autor alterações no original. Este original só será aceito quando tiver o visto desta comissão.

3. Todo trabalho entregue para publicação deverá ser assinado pelo autor e trazer endereço para correspondência ou endereço eletrônico. No caso de mais de um autor, deverá ser expressamente indicado o responsável pela publicação.

4. Os trabalhos serão publicados em ordem cronológica de aprovação, salvo o caso especial de comunicação e nota científica, que terá prioridade.

5. A data de recebimento e a de aprovação do artigo constarão obrigatoriamente no final do mesmo.

6. As provas tipográficas serão revisadas pela Comissão de Redação de Publicações Oficiais do Instituto Adolfo Lutz. Essa Comissão se reserva o direito de introduzir alterações nos originais, visando a manutenção da homogeneidade e a qualidade da publicação, respeitando, porém, o estilo e as opiniões dos autores.

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

#### Da Distribuição

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

## **CARTA AO LEITOR**

A Revista do Instituto Adolfo Lutz, criada em 1940, publicada semestral e ininterruptamente, tem como objetivo principal divulgar informações científicas nas áreas de interesse da Saúde Pública. A partir de 2001, esta Revista conta com a publicação dos resumos dos Encontros do Instituto Adolfo Lutz e da Pós-Graduação da Coordenação dos Institutos de Pesquisas (CIP/SES/SP), na forma de suplementos.

Todo esse sucesso tem sido possível devido ao esforço conjunto da Comissão Editorial, Setor de Publicações/Diretoria de Serviços Básicos e Diretoria Geral do Instituto Adolfo Lutz, bem como pela colaboração de todos os funcionários deste Instituto e pesquisadores externos.

Visando um aperfeiçoamento contínuo de nosso trabalho para melhorar a qualidade da divulgação científica, estamos editando nossa Revista num novo formato, alteramos as normas de publicação que deverão ser implantadas a partir de 2005 e que estão publicadas no final deste fascículo.

Comissão de Redação das Publicações Oficiais do  
Instituto Adolfo Lutz

SUMÁRIO/CONTENTS

Artigo de Revisão/ Review

- 987 Avanços na pesquisa de carotenóides em alimentos: Contribuições de um laboratório brasileiro**  
Advances in food carotenoid research: Contribution of a Brazilian laboratory  
Delia B. RODRIGUEZ-AMAYA ..... 129-138

Artigo/Article

- 988 Análise cromatográfica em camada delgada comparativa de extratos de *Curcuma zedoaria* (Christm.) Roscoe**  
Comparative analysis of *Curcuma zedoaria* (Christm.) Roscoe extracts by means of thin-layer chromatography  
Mônica Arcon BATISTIC; Maria Aparecida NICOLETTI; Mariangela Tirico AURICCHIO ..... 139-142
- 989 Caracterização Farmacognóstica de *Polygonum persicaria* L.**  
Pharmacognostic characterization of *Polygonum persicaria* L.  
Helena M. YANO; Edna T.M. KATO; Elfriede M. BACCHI ..... 143-148
- 990 Validação de metodologia por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para análise de ácido fólico adicionado em farinhas de trigo e milho**  
Determination of folic acid in enriched wheat and corn flour by means of high performance liquid chromatography  
Juliana A. LIMA; Rodrigo R. CATHARINO; Helena T. GODOY ..... 149-154
- 991 Teor de vitamina A em leites tipo C fortificados na cidade de São Paulo**  
Determination of vitamin A concentration in enriched type C milk in São Paulo city/Brazil  
Leda C. A. LAMARDO; Monica STOFER; Sandra A. NAVAS; Emiko I. INOMATA; Fernando S. FONSECA;  
Rosana Lisboa SANTANA; Janete ALABURDA; Myrna SABINO ..... 155-158
- 992 Teor de gordura e composição de ácidos graxos em polpa de frutos de coqueiro anão em diferentes idades de maturação**  
Variability of fat content and fatty acid composition in oil of dwarf coconut palm at its maturation time  
Wilson Menezes ARAGÃO; Elizangela Mércia de OLIVEIRA CRUZ; Mário TAVARES; Francisco Elias RIBEIRO; Evandro de Almeida TUPINAMBÁ; Sabria AUED PIMENTEL ..... 159-167
- 993 Composição de ácidos graxos em óleos e gorduras de fritura**  
Fatty acids composition in frying fats and oils  
Maria do Rosário Viçeta LOPES; Sabria AUED-PIMENTEL; Miriam Solange Fernandes CARUSO; Neuza JORGE; Valter RUVIERI ..... 168-176



|             |   |         |
|-------------|---|---------|
| <b>994</b>  | <b>Queijo minas frescal: avaliação da qualidade e conformidade com a legislação</b><br>“Minas frescal” cheese: Evaluation of quality and its observance of Brazilian Guidelines<br>Berenice M. BRIGIDO; Valéria P.S.FREITAS; Elaine M.A.MAZON; Beatriz PISANI; Maria Ângela G. PRANDI;<br>Maria Helena C.R. PASSOS .....  | 177-185 |
| <b>995</b>  | <b>Validação de método multirresíduo para análise de pesticidas organohalogenados em maçãs</b><br>Validation of multiresidue method for analysis of organohalogenates pesticides in apples<br>Marvina N. IMOTO; Paulo S. G. FONTOURA; Renato J. S. de FREITAS .....   | 186-192 |
| <b>996</b>  | <b>Composição química de pratos à base de milho: comparação entre dados laboratoriais e de tabelas</b><br>Chemical composition of maize dishes: comparison between laboratory and composition table data<br>Mara Reis SILVA; Maria Margareth Veloso NAVES; Amanda Goulart de OLIVEIRA; Maria Sebastiana SILVA .....   | 193-199 |
| <b>997</b>  | <b>Nitritos e nitratos em hortícolas produzidas pelos sistemas de cultivo convencional, orgânico e hidropônico na Região Metropolitana de Curitiba</b><br>Nitrites and nitrates in horticultures produced by the conventional, organic and hydroponic cultivation systems in the Metropolitan Region of Curitiba<br>Sônia C. STERTZ; Patrícia T. P. S. PENTEADO; Renato João S. de FREITAS .....  | 200-207 |
| <b>998</b>  | <b>Contaminação das águas subterrâneas por nitrato em Presidente Prudente – SP, Brasil</b><br>Nitrate contamination in groundwater in Presidente Prudente-SP, Brazil<br>Manoel Carlos T. F. de GODOY; Marcos Norberto BOIN; Daniele Cristina SANAIOTTI; Joel B. da SILVA .....  | 208-214 |
| <b>999</b>  | <b>Qualidade microbiológica da água utilizada nas barracas de praia da orla de Salvador-BA</b><br>Quality of water used in the beach huts of Salvador-Bahia seashore microbiological aspects<br>Carine de Sousa ANDRADE; Clícia Capibaribe LEITE; Matilde Dantas da SILVA; Patrícia Nascimento de ASSIS; Alaíse Gil GUIMARÃES .....   | 215-219 |
| <b>1000</b> | <b>Microcistinas em água de hemodiálise de clínicas do estado de São Paulo</b><br>Microcystins in hemodialysis water from the clinics of São Paulo state/Brazil<br>Valter RUVIERI; Luzia SHUNDO; Janete ALABURDA; Myrna SABINO .....  | 220-223 |
| <b>1001</b> | <b>Água de diálise: ocorrência de leveduras, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e bactérias heterotróficas</b><br>Hemodialysis water: occurrence of yeasts, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , and heterotrophic bacteria<br>Marise SIMÕES; Maria de Fátima C. PIRES .....  | 224-231 |
| <b>1002</b> | <b>Surtos de doenças transmitidas por alimentos contaminados por <i>Staphylococcus aureus</i>, ocorridos no período de dezembro de 2001 a abril de 2003, na região de São José do Rio Preto - SP.</b><br>Foodborne disease outbreaks caused by <i>Staphylococcus aureus</i> , in region of São José do Rio Preto - SP, during the period from December 2001 to April 2003.<br>Jacqueline Tanury Macruz PERESI; Ivete Aparecida Zago Castanheira de ALMEIDA; Inara Siqueira de Carvalho TEIXEIRA; Sonia Izaura de LIMA; Fátima Aparecida CARNICEL; Fernando Leite HOFFMANN ..... | 232-237 |
| <b>1003</b> | <b>Occurrence of <i>Salmonella</i> spp and <i>Escherichia Coli</i> O157:H7 in raw meat marketed in São Paulo state, Brazil, and evaluation of its cold tolerance in ground beef</b><br>Ocorrência de <i>Salmonella</i> spp e <i>Escherichia Coli</i> O157:H7 em carnes cruas comercializadas na cidade de São Paulo, Brasil e tolerância a baixas temperaturas em carne moída<br>Miyoko JAKABI; Dilma Scala GELLI; Christiane Asturiano RISTORI; Ana Maria Ramalho DE PAULA; Harumi SAKUMA; Giselle Ibetete S Lopez LOPES; Sueli A. FERNANDES; Renata B. LUCHESI .....          | 238-242 |
| <b>1004</b> | <b>Ocorrência de Enteroparasitoses em Alunos da Escola Pública de Ensino Fundamental do Município de Catanduva (São Paulo, Brasil)</b><br>Survey of parasitic diseases in students at a public primary school at Catanduva city (São Paulo, Brazil)<br>Júnia Maria M. FALEIROS; Giovana GALLO; Merylucia M. K. SILVA; Rodrigo RAFUL; André R. NASORRI; Lívia Francine R. PIPINO; Ricardo B. JUNQUEIRA; Pedro L. S. PINTO .....  | 243-247 |

|                             |   |         |
|-----------------------------|---|---------|
| <b>1005</b>                 | <b>Estudo comparativo com diversos fixadores para aplicação em microscopia eletrônica de transmissão</b><br>A comparative study on several fixatives applied in transmission electron microscopy procedure<br>Daniel S. ABRAHÃO ; Ana Rita TOLEDO PIZA; Marilena dos Anjos MARTINS; Jacinto C. SILVA NETO;<br>Elaine C.J. FERREIRA; Ludmila Nakamura RAPADO; Tânia Matiko HOSODA; Raquel C.SILVA; Ana Carolina<br>AZZUZ; Noemi Nosomi TANIWAKI; Maria de Fátima Costa PIRES ..... | 248-254 |
| <b>1006</b>                 | <b>Deteção de <i>Cryptosporidium</i> em amostras fecais por técnica de Nested-PCR e comparação com métodos imunológico e parasitológico</b><br>Detection of <i>Cryptosporidium</i> in fecal samples tested by Nested-PCR and comparison between immunologic and parasitologic methos<br>Aparecida Helena de Souza GOMES; Hermínia Yohko KANAMURA; Marcos Eduardo de ALMEIDA; Ana Julia Urias dos Santos ARAUJO .....  | 255-261 |
| <b>1007</b>                 | <b>Avaliação da capacidade de absorção e distribuição de amostras de sangue total em diferentes tipos de papel-filtro</b><br>Evaluation of the efficacy of total blood sample absorption and the blood smear diffusion on different types of filter paper<br>Aparecida Helena S. GOMES; Maria de Lourdes B. ARINE; Rosa Maria SZAROTA; Mayra David LANGER .....   | 262-268 |
| Relato de Caso/ Case Report |   |         |
| <b>1008</b>                 | <b>Infeção humana por <i>Lagochilascaris minor</i> Leiper 1909, no Vale do Ribeira, estado de São Paulo, Brasil (Relato de Caso)</b><br>Human infection with <i>Lagochilascaris minor</i> observed in Vale do Ribeira, São Paulo state, Brazil (Case Report)<br>Almir Venilton MONTEIRO; Silvia Mayumi Koga ZAPOTOSKI; Domingas M. A. G. Vieira TORRES; Márcio A. BERENCHTEIN; Pedro Luiz Silva PINTO .....   | 269-272 |

#### RESUMOS DE TESES E DISSERTAÇÕES

|   |     |
|---|-----|
| <b>Mycobacteria research in water buffalo milk.</b><br>Jordão Junior, C.M. ....   | 273 |
| <b>Immunological activity evaluation of <i>Alchornea</i> spp in vitro on the production of hydrogen peroxide, nitric oxide and tumor necrosis factor-<math>\alpha</math> by murine macrophages.</b><br>Lopes, F.C.M. .... | 273 |
| <b>Agradecimento aos Relatores .....</b>  | 275 |

# Avanços na pesquisa de carotenóides em alimentos: contribuições de um laboratório brasileiro

## Advances in food carotenoid research: contribution of a Brazilian laboratory

RIALA6/987

Delia B. RODRIGUEZ-AMAYA

\* Endereço para correspondência: Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, C. P. 6121, 13083-970 Campinas, SP

Recebido: 16/02/2004 – Aceito para publicação: 06/09/2004

### RESUMO

Os carotenóides são pigmentos naturais, constituintes dos alimentos, sendo alguns deles precursores de vitamina A. São associados com a diminuição do risco de doenças degenerativas como câncer, doenças cardiovasculares, degeneração macular e catarata, sendo os compostos bioativos mais estudados. Os nossos estudos vêm contribuindo de maneira significativa para os avanços neste assunto em diversos aspectos. Reconhecidas internacionalmente, as nossas contribuições científicas podem ser agrupadas da seguinte forma: (a) avaliação, otimização e desenvolvimento de métodos analíticos; (b) determinação da composição de carotenóides em alimentos brasileiros, resultando em um extenso e confiável banco de dados; (c) investigação dos fatores que influenciam na composição de carotenóides em alimentos; (d) avaliação dos efeitos de processamento e estocagem de alimentos nos carotenóides; (e) estudo da estabilidade dos carotenóides, inclusive da cinética, dos mecanismos de degradação e do uso de microencapsulação; (f) caracterização de fontes alternativas de carotenóides como flores, leveduras e microalgas. É considerada a pesquisa mais integrada e completa nesta área, em nível mundial.

**Palavras-Chave.** carotenóides, análise, composição, frutas, vegetais, processamento

### ABSTRACT

Carotenoids are natural pigments, constituents of foods, some of which are precursors of vitamin A. They have been associated with the reduction of the risk for degenerative diseases, such as cancer, cardiovascular diseases, macular degeneration and cataract, and have been the most investigated bioactive compounds. Our studies have been significantly contributing to advances in this field in different aspects. Our internationally well-known scientific contributions can be classified into the following categories: (a) evaluation, optimization and development of analytical methods; (b) determination of the carotenoid composition in Brazilian foods, which resulted in an extensive and reliable database; (c) investigation of the factors that influence carotenoid composition in foods; (d) evaluation of the effects of food processing and storage on carotenoids; (e) study of carotenoid stability, including kinetics and mechanisms of degradation, and the use of microencapsulation; (f) characterization of alternative sources of carotenoids such as flowers, yeasts, cyanobacteria and microalgae. Our investigations have been internationally regarded as the most integrated and complete research in this area

**Key Words.** carotenoids, analysis, composition, fruits, vegetables, processing.

## INTRODUÇÃO

Num passado não muito distante, os alimentos eram tidos somente como fontes de substâncias essenciais para o preenchimento dos requisitos nutricionais básicos. Hoje, há uma percepção de que os alimentos oferecem muito mais. Eles são fontes de compostos ou elementos biologicamente ativos, que proporcionam benefícios adicionais à saúde, como redução do risco de doenças crônicas, fortalecimento do sistema imunológico e desaceleração ou amenização dos males típicos do envelhecimento, dando origem ao novo conceito dos alimentos funcionais. Vários fatores estimularam as investigações neste sentido: os avanços científicos significativos que proporcionaram evidências convincentes ligando a dieta ao estado de saúde, o aumento marcante nos custos hospitalares, o crescimento da população de idosos nos países mais afluentes, os avanços tecnológicos na indústria de alimentos e o aperfeiçoamento da legislação que se tornou mais favorável a comercialização de alimentos funcionais<sup>35</sup>.

Entre os fitoquímicos bioativos estão os carotenóides. Estes compostos são pigmentos naturais responsáveis pela cor atraente de muitos alimentos como frutas, hortaliças, peixes e crustáceos. A cor de um carotenóide se deve a um extenso sistema de duplas ligações conjugadas, assim sendo, a cor de um alimento carotenogênico depende dos carotenóides presentes, das suas concentrações e também do seu estado físico. O alimento pode ser amarelo como o milho, onde os principais carotenóides são a luteína e a zeaxantina, ou laranja como as frutas cítricas, onde a  $\beta$ -criptoxantina é majoritária, ou vermelho como o tomate, onde predomina o licopeno. A propriedade corante por si só justificou a intensa investigação sobre carotenóides por muito tempo. A cor é um atributo fundamental na escolha dos alimentos pelos consumidores. Esta pode ser a propriedade sensorial mais importante dos alimentos, com impacto decisivo no julgamento da qualidade global do alimento, influenciando até a percepção de outras características sensoriais como o sabor<sup>17</sup>.

Alguns carotenóides são precursores de vitamina A. A vitamina A pré-formada na dieta provém de alimentos de origem animal como fígado, leite e carne. Os alimentos de origem vegetal fornecem carotenóides que podem ser transformados em vitamina A pelo organismo humano. Estima-se que, no âmbito mundial, cerca de 60% da vitamina A alimentar vem das pró-vitaminas A<sup>117</sup>. Devido ao custo geralmente mais alto dos alimentos de origem animal, a contribuição na dieta das pró-vitaminas A alcança 82% em países em desenvolvimento. Os carotenóides pró-vitâmicos A têm a vantagem de não serem convertidos a vitamina A enquanto o corpo humano não está necessitando, evitando a potencial toxidez do excesso de vitamina A.

Dos mais de 650 carotenóides naturais hoje conhecidos, apenas em torno de 50 são passíveis de serem precursores de vitamina A com base nas suas estruturas. O  $\beta$ -caroteno é a pró-vitamina A mais importante, tanto em termos de biopotência (ao

qual é atribuída 100% de atividade) como pela sua larga ocorrência<sup>87</sup>. Estruturalmente, a vitamina A (retinol) é meia molécula de  $\beta$ -caroteno, com uma molécula adicional de água no fim da cadeia lateral. Um anel  $\beta$  não substituído, com uma cadeia lateral poliênica de 11 carbonos é o requisito mínimo para que um carotenóide possa ter atividade pró-vitâmica A.

A deficiência de vitamina A é um dos três problemas de saúde pública considerados mais sérios, com graves consequências especialmente para crianças dos países em desenvolvimento, segundo os órgãos das Nações Unidas, e com os quais estão comprometidos a diminuir ou eliminar. A deficiência severa leva a cegueira de milhões de crianças e resulta em taxas muito altas de mortalidade (60%). Mesmo a deficiência sub-clínica é associada ao aumento de 23% da mortalidade. A cegueira noturna, provocada pela hipovitaminose A moderada ou severa, em mulheres na idade reprodutiva tem sido recentemente reconhecido como um problema de saúde pública.

Em anos mais recentes, outras atividades biológicas têm sido atribuídas aos carotenóides, como o fortalecimento do sistema imunológico e a diminuição do risco de doenças degenerativas como câncer, doenças cardiovasculares, degeneração macular e catarata<sup>8,23,47,51,71</sup>. Estes efeitos benéficos à saúde são independentes da atividade pró-vitâmica A e têm sido relacionados à propriedade antioxidante dos carotenóides, mediante o seqüestro de oxigênio singleto e de radicais livres<sup>46,78</sup>. A capacidade mostrada pelos carotenóides de seqüestrar oxigênio singleto é ligada ao sistema de duplas ligações conjugadas, sendo a máxima eficiência demonstrada para carotenóides com nove ou mais destas duplas ligações<sup>22</sup>. Outros mecanismos de ação contra doenças têm sido relatados: modulação do metabolismo de cancerígenos, regulação do crescimento e diferenciação celular, inibição da proliferação celular, estimulação da comunicação intercelular, estimulação da resposta imunológica e filtragem de luz azul<sup>3,70,72</sup>.

As evidências científicas para uma ação biológica de alimentos ou componentes de alimentos provêm de estudos epidemiológicos, estudos biológicos/experimentais e ensaios de intervenção<sup>18,123</sup>. Na década de 80, numerosos estudos epidemiológicos mostraram forte e consistentemente que a ingestão de  $\beta$ -caroteno ou o nível de  $\beta$ -caroteno plasmático correlacionava inversamente com a incidência de câncer, principalmente câncer de pulmão<sup>9,124-126</sup>. Esta observação foi apoiada por estudos *in vitro* e em animais. A relação inversa foi também relatada com referência às doenças cardiovasculares<sup>23,45</sup>. Porém, dois grandes estudos de intervenção realizados na Finlândia<sup>4</sup> e nos Estados Unidos<sup>73</sup> em meados de 90 relataram um aumento na incidência de câncer de pulmão com a suplementação de  $\beta$ -caroteno. Foi reconhecido mais tarde que: (a) Os teores de  $\beta$ -caroteno utilizados nos ensaios de intervenção foram altíssimos (foram administrados diariamente por 5-8 anos no primeiro estudo e 3,7 anos no segundo, cápsulas contendo  $\beta$ -caroteno 5 a 7 vezes a ingestão diária deste carotenóide pela alimentação nos estudos epidemiológicos); (b) Os alimentos teriam outros carotenóides e outros compostos

bioativos que poderiam atuar em conjunto com  $\beta$ -caroteno enquanto que os suplementos continham somente  $\beta$ -caroteno ou  $\beta$ -caroteno com tocoferol no primeiro ensaio e  $\beta$ -caroteno com vitamina A, no segundo; (c) Os participantes eram fumantes ou trabalhadores expostos por tempo prolongado ao amianto, sendo que o processo oxidativo poderia ter atingido uma etapa na qual o carotenóide não teria mais atuação<sup>11,103</sup>. Em outro estudo envolvendo médicos com baixo consumo de fumo, portanto de baixo risco, a suplementação prolongada com alto teor de  $\beta$ -caroteno não teve efeito adverso<sup>36</sup>. Já em Linxian, China, uma região de alta incidência de câncer gástrico e de esôfago e de deficiência de micronutrientes, a suplementação conjunta de  $\beta$ -caroteno, vitamina E e selênio diminuiu em 21% as mortes devido ao câncer gástrico<sup>10</sup>. Conseqüentemente, os carotenóides reconquistaram sua proeminência, agora com ênfase em carotenóides além do  $\beta$ -caroteno.

As pesquisas do Laboratório de Carotenóides na Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, contribuíram de maneira significativa para os avanços na área de carotenóides em alimentos em diversos aspectos. Reconhecidas internacionalmente, as nossas contribuições científicas podem ser agrupadas da seguinte forma: (a) avaliação, otimização e desenvolvimento dos métodos analíticos; (b) determinação da composição de carotenóides em alimentos brasileiros, resultando em um extenso banco de dados confiáveis; (c) investigação dos fatores que influem na composição de carotenóides em alimentos; (d) avaliação dos efeitos de processamento e estocagem de alimentos nos carotenóides; (e) estudo da estabilidade dos carotenóides, inclusive da cinética, dos mecanismos de degradação e do uso de microencapsulação; (f) caracterização de fontes alternativas de carotenóides como flores, leveduras e microalgas. É aparentemente a pesquisa mais completa que existe nesta área, em nível mundial. Os artigos decorrentes dos vários estudos são largamente citados na literatura internacional.

## METODOLOGIA ANALÍTICA

A identificação e quantificação dos compostos bioativos em alimentos são imprescindíveis para as investigações sobre alimentos funcionais e para os programas que preconizam dietas saudáveis para a população. Problemas analíticos que resultaram em dados errôneos vêm impedindo o progresso nesta área, inclusive nos estudos epidemiológicos que correlacionam componentes dos alimentos à incidência de doenças.

Vários trabalhos<sup>7,12,13,25,29,38,41,43,56-58,61,63,64,79,110,114,116,120</sup> foram realizados no nosso laboratório no sentido de desenvolver, avaliar e aprimorar os métodos quantitativos para carotenóides; investigar meticolosamente as fontes de erro e propor medidas para garantir a exatidão dos resultados analíticos; confirmar a identidade ou elucidar a estrutura de carotenóides. Os resultados destes trabalhos são integrados aos de outros grupos em artigos

de revisão<sup>40,88,89,111</sup>, capítulos de livros<sup>90,94,106,108</sup>, e em um livro<sup>97</sup> que se tornou leitura obrigatória em laboratórios de carotenóides no mundo inteiro. Além de garantir a exatidão dos dados quantitativos, a identificação conclusiva dos carotenóides é de suma importância uma vez que a cor e as atividades biológicas estão intimamente ligadas às estruturas<sup>95</sup>.

Por muito tempo, houve grande confusão em relação à adequação e exatidão dos métodos. Embora, mais dados confiáveis sobre carotenóides em alimentos estão sendo gerados atualmente, um volume considerável de dados errôneos ainda persiste na literatura. Isso reflete as dificuldades inerentes a este tipo de análise. Os principais fatores que dificultam a análise de carotenóides são: (a) a existência de um número muito grande de carotenóides, (b) a variação quali e quantitativa na composição de alimentos, (c) a faixa muito ampla de concentrações em que os carotenóides se encontram num alimento, e (d) a susceptibilidade dos carotenóides à isomerização e oxidação durante a análise e estocagem de amostras antes da análise<sup>88,97</sup>. As principais fontes de erro são: (a) amostras analíticas não representativas, (b) extração incompleta dos carotenóides, (c) perdas físicas dos carotenóides durante as várias etapas, (d) separação cromatográfica incompleta, (e) identificação equivocada, (f) quantificação e cálculos errados, e (g) isomerização e oxidação de carotenóides durante a análise.

Com a introdução de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), a impressão transmitida pela literatura internacional foi de que os problemas já haviam sido superados e a análise de carotenóides se tornou uma atividade de rotina. Uma apreciação cuidadosa dos dados publicados, entretanto, mostrava que não era o caso. Publicamos, portanto, um artigo crítico de revisão apontando os problemas que persistiram e os erros que poderiam ser percebidos nos trabalhos publicados, inclusive as limitações dos métodos da Associação Oficial de Químicos Analíticos (AOAC) dos E.U.A. e dos métodos recomendados pela Cooperação em Pesquisa Científica e Tecnológica (COST) da Europa<sup>88</sup>. Este artigo (33 páginas impressas) foi recebido pelo editor em 21 de outubro de 1988 e aceito sem nenhuma modificação em 1 de novembro de 1988. Foi largamente citado e considerado excelente pela comunidade internacional, sendo objeto de várias reuniões da AOAC e COST, influenciando os rumos de análise de carotenóides no âmbito mundial.

Embora sendo a técnica analítica preferida para os carotenóides atualmente, a CLAE tem as suas fontes inerentes de erro: (a) incompatibilidade entre o solvente de injeção e a fase móvel, resultando em picos deformados ou divididos; (b) perdas variáveis de carotenóides na coluna CLAE; (c) picos sobrepostos; (d) pureza variável e instabilidade dos padrões de carotenóides; (e) identificação errônea; (f) inexatidão no preparo das soluções-padrão e na calibração; (g) cálculos errados. Ilustrações destes erros e medidas que podem ser tomadas para evitá-los foram apresentadas em um artigo de revisão<sup>40</sup>.

## BANCO BRASILEIRO DE DADOS DE CAROTENÓIDES EM ALIMENTOS

Com o seu imenso território e uma grande parte de clima tropical e sub-tropical, que favorece a biossíntese de carotenóides, o Brasil possui uma variedade notável de alimentos ricos em carotenóides. Uma boa parte desta riqueza natural já foi analisada, inclusive produtos processados e alimentos preparados obtidos em restaurantes<sup>1,2,5,6,14-16,27,30-34,37,42,59,60,62,67-69,76,77,80,81,112,113,115,118,121,122</sup>, proporcionando o mais extenso banco de dados confiáveis sobre carotenóides no mundo<sup>91,93,100,101,105</sup>. A dimensão desta base de dados pode ser melhor apreciada se for considerado que a grande maioria dos dados vem de um único laboratório. Alguns poucos dados foram obtidos em laboratórios, como os da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, por pessoas que foram treinadas no nosso laboratório. O banco de dados dos E.U.A., o segundo mais extenso, constitui-se de dados provenientes de vários laboratórios.

Embora alguns trabalhos nossos tenham focado as pró-vitaminas A, devido à importância destas no combate à deficiência de vitamina A, a maior parte das análises realizadas no nosso laboratório determinou tanto os carotenóides pró-vitâmicos A como os não pró-vitâmicos, muito antes que outros laboratórios comesçassem a determinar também aqueles que não possuíam atividade pró-vitâmica A. Isso colocou o nosso laboratório numa posição de liderança quando o papel dos carotenóides em relação às doenças degenerativas ganhou destaque no mundo.

O nosso banco de dados está sendo usado por pesquisadores de universidades e institutos de pesquisa em áreas como nutrição, epidemiologia, ciência e tecnologia de alimentos, saúde pública e agricultura. São também consultados por técnicos das indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética.

Os principais carotenóides encontrados em alimentos são o  $\beta$ -caroteno,  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -criptoxantina, luteína, licopeno e violaxantina. Os primeiros cinco são também os mais encontrados no sangue humano. Juntamente com a zeaxantina, são os carotenóides já demonstrados como benéficos à saúde humana. Os carotenóides  $\beta$ -caroteno,  $\alpha$ -caroteno e  $\beta$ -criptoxantina são pró-vitaminas A. A luteína e a zeaxantina são os carotenóides implicados na redução do risco de degeneração macular (principal causa de cegueira no idoso) e catarata<sup>65</sup>. Mais eficiente que o  $\beta$ -caroteno como antioxidante<sup>19</sup>, o licopeno mostrou ação contra o câncer, a evidência sendo mais forte em relação ao câncer de próstata, estômago e pulmão<sup>24</sup>. A possível atuação de violaxantina em relação às doenças ainda não foi demonstrada.

Durante o levantamento da nossa extensa base de dados, vários achados foram alcançados, alguns dos quais chegaram a ser surpreendentes. Buriti<sup>31</sup> e tucumã<sup>100</sup>, alimentos nativos da região amazônica, são fontes riquíssimas de  $\beta$ -caroteno. O buriti tem o maior teor de  $\beta$ -caroteno entre os numerosos alimentos já analisados no nosso laboratório, além de ter também níveis altos de  $\alpha$ -caroteno e  $\gamma$ -caroteno, outras pró-vitaminas A. A

pupunha<sup>100</sup> contém  $\delta$ -caroteno, um carotenóide não pró-vitâmico A, como o principal, mas também tem boas quantidades de  $\beta$ -caroteno e  $\gamma$ -caroteno. Como os lipídios estimulam a absorção dos carotenóides, estes carotenóides de frutas de palmeiras podem ter a vantagem adicional de possuírem maior biodisponibilidade.

A acerola<sup>14</sup>, riquíssima em vitamina C, é também uma boa fonte de  $\beta$ -caroteno. Por muito tempo, este carotenóide foi considerado o predominante de manga. O principal carotenóide da manga, na verdade, é violaxantina, que é facilmente perdida durante a análise<sup>62</sup>. De qualquer forma, a manga é uma boa fonte de  $\beta$ -caroteno. Este carotenóide é o majoritário em caju e nêspera, mas os níveis são baixos.

O  $\alpha$ -caroteno às vezes acompanha o  $\beta$ -caroteno, mas geralmente em teores menores. São fontes destes dois carotenóides a cenoura e algumas variedades de abóbora e moranga<sup>1,2,37</sup>.

A  $\beta$ -criptoxantina é o principal carotenóide de muitas frutas com polpa de cor laranja como cajá<sup>113</sup>, nectarina<sup>33</sup>, mamão laranja<sup>39</sup>, pêssego<sup>100</sup> e a fruta do pé de tomate<sup>112</sup>.

A luteína em alta concentração é encontrada na flor comestível de *Tropaeolum majus*<sup>68</sup>. Este carotenóide é também o predominante em verduras folhosas e outros vegetais verdes<sup>5,6,42,69</sup>, seguido pelo  $\beta$ -caroteno<sup>5,6,42,69,83</sup>. Algumas variedades de abóbora e moranga<sup>1,2,37</sup> contêm altos teores de luteína, acompanhada por menores quantidades de  $\beta$ -caroteno.

O tomate e seus produtos, assim como a melancia, são praticamente as únicas fontes de licopeno em muitos países. O Brasil, no entanto, tem além destes<sup>69,118,121</sup>, a goiaba vermelha<sup>74,81</sup>, o mamão vermelho<sup>39</sup> e a pitanga<sup>14</sup>. A pitanga contém também quantidades substanciais de  $\beta$ -criptoxantina,  $\gamma$ -caroteno e rubixantina.

Outros carotenóides predominam em outras frutas como  $\zeta$ -caroteno em maracujá<sup>16,57</sup>, violaxantina em abricó<sup>100</sup> e zeaxantina em pequi<sup>100</sup>.

## FATORES QUE INFLUENCIAM A COMPOSIÇÃO EM CAROTENÓIDES

Além das diferenças composicionais entre alimentos, existe variação na composição de um dado alimento. Esta variabilidade natural deve ser conhecida e não deve ser confundida com erros analíticos. Esta informação também auxilia na otimização dos níveis carotenogênicos dos alimentos. Portanto, além de determinar os conteúdos dos carotenóides nos alimentos oferecidos à população, vários dos artigos citados acima investigaram também os fatores que influenciam na composição. Os fatores mais influentes são: (a) variedade ou cultivar, (b) estágio de maturação, (c) clima ou localização geográfica, (d) parte da planta utilizada e (e) técnica de produção<sup>102</sup>.

Diferenças qualitativas e principalmente quantitativas ocorrem entre cultivares ou variedades como foi demonstrado

em cucurbitáceas<sup>1,2,37</sup>, mamão<sup>39</sup>, manga<sup>62</sup> e couve<sup>60</sup>.

O amadurecimento de frutas é acompanhado por um aumento marcante na biossíntese de carotenóides, que pode ser visto pela mudança de coloração. Isso foi demonstrado em *Cucurbita moschata* cultivar Menina Verde<sup>1</sup>, manga<sup>62</sup> e acerola<sup>14</sup>. Em folhas, o aumento dos carotenóides foi de 3 a 4 vezes na alface e chicória<sup>6</sup> e ligeira na couve<sup>5</sup>. Em espinafre, porém, as folhas mais jovens apresentaram teores ligeiramente maiores que as mais velhas<sup>6</sup>.

A exposição ao sol e a temperatura elevada favorecem a biossíntese de carotenóides. Portanto, os mesmos cultivares de mamão (Formosa)<sup>39</sup> e manga (Keitt)<sup>62</sup> produzidos no estado da Bahia continham concentrações mais altas que os de São Paulo. Acerolas produzidas no Ceará e Pernambuco apresentaram conteúdos carotenogênicos semelhantes, mas nitidamente maiores do que os da acerola proveniente de São Paulo<sup>14</sup>.

Por outro lado, a couve produzida no campo na época de verão teve concentrações mais baixas de carotenóides que a produzida no inverno. Este resultado é compatível com a maior fotodegradação dos carotenóides da folha pela maior exposição ao sol e alta temperatura. De fato, em folhas protegidas por uma cobertura plástica, os teores de carotenóides foram maiores no verão<sup>5,6</sup>.

Na couve produzida sem uso de defensivos agrícolas, todos os carotenóides alcançaram níveis mais altos do que na couve produzida convencionalmente em local vizinho<sup>60</sup>.

Além da política prevalente de aumentar a produtividade dos alimentos, está ganhando força o pensamento de que os teores de micronutrientes (biofortificação) e outros compostos benéficos a saúde devem ser otimizados por práticas agrônomicas e genética convencional ou por manipulação genética, lembrando-se de que o melhoramento por procedimentos agrícolas tradicionais devem ser tentados antes das técnicas moleculares. Ao nosso ver, a estratégia agrícola só pode ter êxito se for complementada e reforçada pela tecnologia de alimentos<sup>96,107</sup>. Para isso, o comportamento dos carotenóides em toda cadeia alimentar deve ser conhecido.

## ALTERAÇÕES DURANTE O PROCESSAMENTO E ESTOCAGEM

A cadeia poliênica, responsável pelas propriedades especiais e desejáveis dos carotenóides, é também a causa da sua instabilidade. As condições que conduzem à isomerização e oxidação dos carotenóides ocorrem durante o preparo doméstico, processamento industrial e estocagem dos alimentos. Calor, luz e ácidos promovem a isomerização dos carotenóides *trans*, como são normalmente encontrados na natureza, para a forma *cis*, com ligeira perda de cor e atividade biológica. A oxidação, principal causa de degradação dos carotenóides, depende da disponibilidade de oxigênio, tipo de carotenóide e de seu estado físico. É estimulada pela luz, calor, metais, enzimas

oxidativas e peróxidos, e é inibida por antioxidantes. Vários trabalhos foram realizados no nosso laboratório para verificar o comportamento dos carotenóides durante o processamento e estocagem de alimentos<sup>26,28,75,82,84,119</sup>. Estes trabalhos foram colocados em perspectiva e integrados aos da literatura internacional em um capítulo de livro<sup>92</sup>, um livro<sup>96</sup> que foi traduzido ao espanhol para distribuição na América Latina<sup>98</sup> e artigos de revisão<sup>99,104</sup>.

A isomerização foi bem demonstrada na produção de óleos provenientes de dendê<sup>119</sup>. Para minimizar a rancidez hidrolítica no óleo, os frutos de dendê devem ser esterilizados imediatamente após colheita visando inativar a enzima lipase. Neste tratamento térmico, porém, ocorre uma perda considerável de *trans-α*-caroteno e *trans-β*-caroteno com aumento dos seus isômeros *cis*.

A oxidação enzimática pode ocorrer nas etapas anteriores ao cozimento ou processamento, quando o alimento é descascado, cortado, ralado ou triturado, pois, a desintegração das estruturas celulares, protetoras dos carotenóides, libera conjuntamente as enzimas e os carotenóides, provocando a oxidação. Este fenômeno pode também ocorrer em verduras minimamente processadas<sup>5,6</sup>.

A perda da cor e atividade biológica dos carotenóides é uma preocupação no processamento térmico e estocagem de alimentos. A degradação dos carotenóides durante pasteurização e enlatamento foi demonstrada em goiaba<sup>75</sup>, manga<sup>26</sup> e mamão<sup>28</sup>. A perda depende do carotenóide presente, do grau de destruição da estrutura celular e da temperatura e tempo de processamento. Durante a estocagem, a degradação depende da disponibilidade de oxigênio, exposição à luz, temperatura e tempo. As perdas são minimizadas mediante a aplicação de boas práticas tecnológicas como: processar logo após o corte ou trituração e a escolha mais apropriada do binômio tempo-temperatura durante o processamento, das condições de estocagem e do tipo de embalagem.

No sentido de promover uma fonte de licopeno além de produtos de tomate, o nosso laboratório auxiliou os produtores de goiaba a desenvolver o “guatchup”<sup>82</sup>, na escolha do cultivar com maior conteúdo de licopeno e no monitoramento da perda de licopeno durante o processamento.

## CINÉTICA E MECANISMO DE DEGRADAÇÃO

Ao contrário da riqueza de informações existentes sobre a oxidação de lipídios, a oxidação de carotenóides, apesar da sua importância, não está bem elucidada. Presume-se que o primeiro passo é a formação de epoxicarotenóides e apocarotenais. Fragmentações subsequentes levam à formação de compostos de baixa massa molecular, com perda total da cor e atividade biológica, mas passam a formar parte do aroma, agradável em produtos como o chá e o vinho ou desagradável em alimentos como a cenoura desidratada<sup>109</sup>. São poucas as evidências para este esquema e os mecanismos não estão estabelecidos.

Em sistemas-modelo de baixa umidade (amido de milho, fécula de batata e celulose cristalina) e aquoso, o  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno, licopeno e luteína demonstraram predominantemente uma cinética de primeira ordem<sup>20,21</sup>. O licopeno foi o carotenóide que mais degradou. Em alimentos liofilizados, os carotenóides ( $\alpha$ -caroteno e  $\beta$ -caroteno em cenoura,  $\beta$ -caroteno e luteína em salsa,  $\beta$ -caroteno e licopeno em goiaba) também se adequaram numa cinética de primeira ordem. A luz demonstrou ter um efeito preponderante, acelerando a degradação dos carotenóides, tanto nos sistemas-modelo como nos alimentos liofilizados. A grande susceptibilidade do licopeno à degradação, observada nos sistemas-modelo, não se confirmou nos alimentos liofilizados, mostrando a influência marcante da matriz. Este efeito protetor das matrizes alimentares foi também manifestado em relação à luteína, mas não tanto em termos de  $\alpha$ -caroteno e  $\beta$ -caroteno.

Em dois trabalhos recentes, a formação de epoxicarotenóides e apocarotenais a partir de  $\beta$ -caroteno e licopeno foram estudados<sup>85,86</sup>, comprovando a participação destas duas reações como etapas iniciais da oxidação. Como são produtos intermediários, estes compostos não se acumulam, sendo assim encontrados em quantidades extremamente pequenas, o que dificulta a sua detecção e identificação. Utilizando CLAE com detectores de conjunto de diodos e de massas, foram identificados cinco epoxicarotenóides, cinco apocarotenais, uma carotenona, dois hidroxicarotenóides e uma semi-carotenona, provenientes do  $\beta$ -caroteno. Do licopeno, foram identificados oito epoxicarotenóides e seis apocarotenais. Em outros trabalhos, os produtos finais da degradação, que são aldeídos, cetonas e álcoois de 2 a 10 carbonos, foram identificados por cromatografia gasosa-espectrometria de massa<sup>76</sup>. Com a identificação dos produtos intermediários e finais da degradação oxidativa, estamos propondo os mecanismos de oxidação, o que significará um grande avanço científico na área.

A tendência atual na preservação de compostos instáveis é a microencapsulação. Dois trabalhos foram realizados sobre a microencapsulação de licopeno<sup>49,50</sup>, mostrando a grande eficiência da ciclodextrina em proteger o licopeno por tempo prolongado.

## FONTES ALTERNATIVAS

Como fonte de carotenóides para a produção de aditivos ou suplementos alimentares, certas fontes naturais não necessariamente comestíveis, mas com teores várias vezes maiores que os encontrados em alimentos, estão sendo procurados mundialmente. No Brasil, as flores, *Cosmos sulphureus* e *Thelechitonía trilobata*, que crescem espontaneamente e florescem praticamente ao longo do ano inteiro, foram analisadas e comprovadas como sendo fontes muito ricas de luteína<sup>53</sup>. Os teores de luteína obtidos são comparáveis ou maiores do que os citados para a flor *Tagetes erecta*, a atual fonte comercial deste carotenóide. Uma outra

flor, a *Pyrostegia venusta*, mostrou uma composição complexa, com grandes quantidades de diversos carotenóides, sendo o principal a rubixantina<sup>54</sup>.

A microalga marinha *Tetraselmis gracilis* apresentou oito carotenóides, com luteína como principal<sup>52</sup>. Já na microalga *Synechococcus subsalus*, o  $\beta$ -caroteno e zeaxantina foram os carotenóides majoritários, enquanto que na *Hilea* sp. houve predominância de aloxantina<sup>55</sup>.

Na cianobactéria *Synechocystis pevalekii*, o  $\beta$ -caroteno foi também o carotenóide predominante<sup>66</sup>. Em condições de estresse (redução dos micronutrientes), porém, o  $\beta$ -caroteno diminuiu e a zeaxantina aumentou substancialmente, passando a ser o principal. Estes resultados demonstram que as condições de cultivo podem ser estabelecidas de tal forma a favorecer a biossíntese de carotenóides de difícil obtenção, que são importantes para a saúde humana. Já existem várias fontes comerciais de  $\beta$ -caroteno, mas são raras as fontes de zeaxantina.

Leveduras isoladas no Brasil de amostras de solo, flores, folhas e frutos foram também estudadas<sup>48</sup>. O  $\beta$ -caroteno foi o carotenóide predominante em *Rhodotorula graminis*-125, *Rhodotorula glutinis* e *Sporobolomyces*, enquanto que o toruleno foi o carotenóide principal de *Rhodotorula mucilaginoso*. A *Rhodotorula glutinis* foi a que apresentou maior concentração de carotenóides.

## APLICAÇÃO DOS RESULTADOS

Devido aos nossos estudos pioneiros de avaliação da diversidade de alimentos brasileiros, mostrando os altos teores e ampla gama de valiosos carotenóides para a saúde humana, o Brasil é hoje mundialmente reconhecido por possuir não só uma vasta fonte de carotenóides como pelo volume de informações importantes sobre estes compostos.

Os nossos dados sobre os conteúdos de carotenóides pró-vitamínicos A em alimentos e os efeitos de preparo doméstico, processamento e estocagem vêm sendo utilizados em programas e projetos para o combate da deficiência de vitamina A no Brasil e outros países em desenvolvimento. Está servindo como base de órgãos ou programas internacionais como Opportunities for Micronutrient Intervention, Food and Agriculture Organization of the United Nations, International Vitamin A Consultative Group, Vitamin A Partnership África e Harvest plus. Breeding crops for better nutrition.

O banco de dados por nós elaborado tem sido utilizado para a promoção de maior consumo de alimentos ricos em pró-vitamina A, inclusive a preservação destes compostos durante o preparo doméstico, processamento e estocagem. Os métodos analíticos que temos desenvolvidos são empregados por vários países para obter dados dos seus próprios alimentos.

Os dados sobre os carotenóides principais de alimentos, incluindo os não pró-vitamínicos A, estão sendo utilizados em estudos epidemiológicos que correlacionam o consumo de carotenóides com a diminuição do risco de



doenças degenerativas como câncer, doenças cardiovasculares, catarata e degeneração macular. Estes dados estão sendo também utilizados por produtores brasileiros (como os produtores de goiaba) na escolha de variedades mais ricas em carotenóides para produção e comercialização, e pela indústria de alimentos (como GOIABRAS) na escolha de matérias primas e no desenvolvimento de alimentos funcionais (alimentos promotores e preservadores da boa saúde), que gozam de grande destaque atualmente. Ainda utilizados timidamente, estes dados podem ser eficazmente empregados como “marketing” para frutas e verduras brasileiras, que têm composição excepcional, tanto quali como quantitativamente, no mercado doméstico e internacional.

Os nossos resultados sobre as taxas de degradação de carotenóides e os fatores que influenciam a degradação são usados por várias indústrias alimentícias na tomada de medidas para efetiva retenção destes compostos durante processamento e estocagem de alimentos, evitando a perda da cor (um problema sério que diminui a aceitabilidade dos produtos pelos consumidores) e das atividades biológicas benéficas dos carotenóides.

Em suma, o impacto da nossa contribuição se estende ao campo do *agribusiness*, à saúde, tanto direta como indiretamente, e à educação do cidadão quanto consumidor de alimentos.

## AGRADECIMENTOS

A autora agradece CNPq, FINEP, FAPESP e CAPES pelos financiamentos e bolsas. Este artigo foi escrito como parte das atividades do projeto PRONEX/CNPq nº 662307/1996-8.

## REFERÊNCIAS

1. Arima, H.K.; Rodriguez-Amaya, D.B. Carotenoid composition and vitamin A value of commercial Brazilian squashes and pumpkins. **J. Micronutr. Anal.** 4: 177-91, 1988.
2. Arima, H.K.; Rodriguez-Amaya, D.B. Carotenoid composition and vitamin A value of a squash and a pumpkin from Northeastern Brasil. **Arch. Latinoamer. Nutr.** XL(2): 284-92, 1990.
3. Astorg, P. Food carotenoids and cancer prevention: An overview of current research. **Trends Food Sci. Technol.** 8: 406-13, 1997.
4. ATBC (Alpha-Tocopherol, Beta-Carotene) Cancer Prevention Study Group. The effect of vitamin E and beta-carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in smokers. **New Engl. J. Med.** 330: 1029-35, 1994.
5. Azevedo-Meleiro, C.H.; Rodriguez-Amaya, D.B. Carotenoid composition of kale as influenced by maturity, season and minimal processing. **J. Sci. Food Agric.** (enviado).
6. Azevedo-Meleiro, C.H.; Rodriguez-Amaya, D.B. Carotenoid composition of endive and New Zealand spinach as influenced by maturity, season and minimal processing. **J. Food Comp. Anal.** (enviado).
7. Azevedo-Meleiro, C.H.; Rodriguez-Amaya, D.B. Confirmation of the identity of the carotenoids of tropical fruits by HPLC-DAD and HPLC-MS. **J. Food Comp. Anal.** 17:385-96, 2004.
8. Bendich, A. Recent advances in clinical research involving carotenoids. **Pure Appl. Chem.** 66: 1017-24, 1994.
9. Block, G.; Patterson, B.; Subar, A. Fruits, vegetables, and cancer prevention: A review of the epidemiological evidence. **Nutr. Cancer** 18: 1-29, 1992.
10. Blot, W.J. et al. Nutrition intervention trials in Linxian, China: Supplementation with specific vitamin/mineral combinations, cancer incidence, and disease-specific mortality in the general population. **J. Natl. Cancer Inst.** 85: 1483-92, 1993.
11. CARIG. Beta-carotene and the carotenoids. Beyond the intervention trials. **Nutr. Rev.** 54: 185-8, 1996.
12. Carvalho, P.R.N. et al. Determinação de carotenóides e provitamina A por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). **Coletanea ITAL.** 21: 317-28, 1991.
13. Carvalho, P.R.N.; Collins, C.H.; Rodriguez-Amaya, D.B. Comparison of provitamin A determination by normal-phase gravity-flow column chromatography and reversed-phase high performance liquid chromatography. **Chromatogr.** 33: 133-7, 1992.
14. Cavalcante, M.L.; Rodriguez-Amaya, D.B. Carotenoid composition of the tropical fruits *Eugenia uniflora* and *Malpighia glabra*. In: Charalambous, G. (Ed.). **Food Science and Human Nutrition.** Amsterdam: Elsevier Science Publishers; 1992. p. 643-50.
15. Cecchi, H.M.; Rodriguez-Amaya, D.B. Carotenoid composition and vitamin A value of fresh and pasteurized cashew-apple (*Anacardium occidentale* L.) juice. **J. Food Sci.** 46: 147-9, 1981.
16. Cecchi, H.M.; Rodriguez-Amaya, D.B. Carotenóides e valor de vitamina A em suco de maracujá processado. **Ciênc. Cultura** 33(1): 72-6, 1991.
17. Clysdale, F.M. Color perception and food quality. **J. Food Qual.** 14: 61-74., 1991.
18. Clysdale, F.M. What scientific data are necessary? **Nutr. Rev.** 54: S195-S198, 1996.
19. Di Mascio, P.; Kaiser, S.; Sies, H. Lycopene as the most efficient biological singlet oxygen quencher. **Arch. Biochem. Biophys.** 274: 532-8, 1989.
20. Ferreira, J.E.M.; Rodriguez-Amaya, D.B. Degradação de licopeno em um sistema modelo e em goiaba liofilizada. Trabalho apresentado no **IV Brazilian Meeting on Chemistry of Food and Beverages**, Campinas, 2002.
21. Ferreira, J.E.M.; Rodriguez-Amaya, D.B. Degradação de luteína em sistemas modelos e em salsa liofilizada. Trabalho apresentado no **IV Brazilian Meeting on Chemistry of Food and Beverages**, Campinas, 2002.
22. Foote, F.S.; Chang, Y.C.; Denny, R.W. Chemistry of singlet oxygen X. Carotenoid quenching parallels biological protection. **J. Am. Chem. Soc.** 92: 5216-5218, 1970.
23. Gaziano, J.M.; Hennekens, C.H. The role of beta-carotene in the prevention of cardiovascular disease. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** 691: 148-55, 1993.
24. Giovannucci, E. Tomatoes, tomato-based products, lycopene, and cancer: Review of the epidemiologic literature. **J. Natl. Cancer Inst.** 91: 317-31, 1999.
25. Godoy, H.T. et al. Confirmation of the structure of papaya B-cryptoxanthin monoepoxide. **Food Chem.** 36: 281-6, 1990.
26. Godoy, H.T.; Rodriguez-Amaya, D.B. Changes in individual carotenoids on processing and storage of mango (*Mangifera indica*) slices and puree. **Int. J. Food Sci. Technol.** 22: 451-60, 1987.
27. Godoy, H.T.; Rodriguez-Amaya, D.B. Carotenoid composition of commercial mangos from Brazil. **Lebens. Wissen. Technol.** 22: 100-3, 1989.
28. Godoy, H.T.; Rodriguez-Amaya, D.B. Comportamento dos carotenóides de purê de mamão (*Carica papaya*) sob processamento e estocagem. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** 11: 210-20, 1991.
29. Godoy, H.T.; Rodriguez-Amaya, D.B. Avaliação das metodologias para determinação de pró-vitamina A. **Rev. Farm. Bioquím. Univ. S. Paulo.** 29: 17-24, 1993.
30. Godoy, H.T.; Rodriguez-Amaya, D.B. Occurrence of *cis*-isomers of provitamin A in Brazilian fruits. **J. Agric. Food. Chem.** 42: 1306-13, 1994.

31. Godoy, H.T.; Rodriguez-Amaya, D.B. Burity (*Maurita vitifera*) uma fonte riquíssima de provitamina A, **Arq. Biol. Tec.** 38: 109-20, 1995.
32. Godoy, H.T.; Rodriguez-Amaya, D.B. Carotenoid composition and vitamin A value of Brazilian loguati (*Eriobotrya japonica* L.). **Arch. Latinoamer. Nutr.** 45: 336-9, 1995.
33. Godoy, H.T.; Rodriguez-Amaya, D.B. Composição de carotenóides em nectarina (*Prunus persica*) brasileira. **Rev. Inst. Adolfo Lutz** 57:73-9, 1998.
34. Godoy, H.T.; Rodriguez-Amaya, D.B. Occurrence of *cis*-isomers of provitamin A in Brazilian vegetables. **J. Agric. Food Chem.** 46:3081-6, 1998.
35. Hasler, C.M. Functional foods: Their role in disease prevention and health promotion. **Food Technol.** 52: 63-70, 1998.
36. Hennekens et al. Lack of effect of long-term supplementation with beta-carotene on the incidence of malignant neoplasms and cardiovascular disease. **New Engl. J. Med.** 334: 1145-9, 1996.
37. Hess, C.A.; Rodriguez-Amaya, D.B. Reavaliação da composição de carotenóides em cucurbitaceae por CLAE-DAD e CLAE-EM. **Acta do 5 Encontro de Química de Alimentos. Qualidade, Segurança & Inovação.** Porto: Universidade Católica de Porto; 2001. p. 104-9.
38. Kimura, M.; Rodriguez-Amaya, D.B.; Godoy, H.T. Assessment of the saponification step in the quantitative determination of carotenoids and provitamin A. **Food Chem.** 35: 187-95, 1990.
39. Kimura, M.; Rodriguez-Amaya, D.B.; Yokoyama, S.M. Cultivar differences and geographic effects on the carotenoid composition and vitamin A value of papaya. **Lebens. Wissen. Technol.** 24: 415-8, 1991.
40. Kimura, M.; Rodriguez-Amaya, D.B. Sources of errors in the quantitative analysis of food carotenoids by HPLC. **Arch. Latinoamer. Nutr.** 49: 58S-67S, 1999.
41. Kimura, M.; Rodriguez-Amaya, D.B. A scheme for obtaining standards and HPLC quantification of leafy vegetable carotenoids. **Food Chem.** 78: 389-98, 2002.
42. Kimura, M.; Rodriguez-Amaya, D.B. Carotenoid composition of hydroponic leafy vegetables. **J. Agric. Food Chem.** 51: 2603-7, 2003.
43. Kimura, M.; Rodriguez-Amaya, D.B. Carotenoids of tomato and tomato paste: Verification of the occurrence of *g*-carotene. **Rev. Inst. Adolfo Lutz** 62: 21-6, 2003.
44. Kimura, M.; Rodriguez-Amaya, D.B. Estabelecimento das condições cromatográficas para análise de carotenóides em alimentos por CLAE: Uma ciência ou uma arte? **Bol. SBCTA** (no prelo), 2004.
45. Kohlmeier, L.; Hastings, S.B. Epidemiologic evidence of a role of carotenoids in cardiovascular disease prevention. **Am. J. Clin. Nutr.** 62: 1370S-1376S, 1995.
46. Krinsky, N.I. Antioxidant functions of carotenoids. **Free Radical Biol. Med.** 7: 617-35, 1989.
47. Krinsky, N.I. Actions of carotenoids in biological systems. **Annu. Rev. Nutr.** 13: 561-7, 1993.
48. Maldonado, I.R.; Rodriguez-Amaya, D.B.; Scamparini, A.R.P. Isolamento e seleção de leveduras produtoras de carotenóides. Trabalho apresentado no **III Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos**, Campinas, 1999.
49. Matioli, G.; Rodriguez-Amaya, D.B. Licopeno encapsulado em goma arábica e maltodextrina: Estudo da estabilidade. **Braz. J. Food Technol.** 5: 197-203, 2002.
50. Matioli, G.; Rodriguez-Amaya, D.B. Microencapsulação do licopeno com ciclodextrinas. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** 23 (Supl): 102-5, 2003.
51. Mayne, S.T. Beta-carotene, carotenoids, and disease prevention in humans. **FASEB J.** 10: 690-701, 1996.
52. Mello, M.C.; Rodriguez-Amaya, D.B.; Lourenço, S.O. Carotenóides na microalga *Tetraselmis gracilis*. Trabalho apresentado no **Congresso Latino-Americano de Carotenóides em Alimentos**, Campinas, 1998.
53. Mello, M.C.; Rodriguez-Amaya, D.B. Teores de luteína em flores de *Cosmos sulphureus* e *Thelechitonina trilobata*. Trabalho apresentado no **Congresso Latino-Americano de Carotenóides em Alimentos**, Campinas, 1998.
54. Mello, M.C.; Rodriguez-Amaya, D.B. As flores de *Pyrostegia venusta* como fonte alternativa de carotenóides. Trabalho apresentado no **IV Brazilian Meeting on the Chemistry of Food and Beverages**, Campinas, 2002.
55. Mello, M.C.; Lourenço, S.O.; Rodriguez-Amaya, D.B. Determinação da composição de carotenóides em *Synechococcus subsalsus* e *Hillea* sp. Trabalho apresentado na **IV Brazilian Meeting on the Chemistry of Food and Beverages**, Campinas, 2002.
56. Mercadante, A.Z. et al. Isolation of methyl 9'-Z-*apo*-6'-lycopenoate from *Bixa orellana*. **Phytochem.** 41: 1201-3, 1996.
57. Mercadante, A.Z.; Britton, G.; Rodriguez-Amaya, D.B. Carotenoids from yellow passion fruit (*Passiflora edulis*). **J. Agric. Food Chem.** 46: 4102-6, 1998.
58. Mercadante, A.Z.; Rodriguez-Amaya, D.B. Comparison of normal-phase and reversed-phase gravity-flow column methods for provitamin A determination. **Chromatogr.** 28: 249-52, 1989.
59. Mercadante, A.Z.; Rodriguez-Amaya, D.B. Carotenoid composition and vitamin A value of some native Brazilian green leafy vegetables. **Int. J. Food Sci. Technol.** 25: 213-9, 1990.
60. Mercadante, A.Z.; Rodriguez-Amaya, D.B. Carotenoid composition of a leafy vegetable in relation to some agricultural variables. **J. Agric. Food Chem.** 39: 1094-7, 1991.
61. Mercadante, A.Z.; Rodriguez-Amaya, D.B. Desempenho da camada delgada versus camada delgada de alta eficiência multi-desenvolvimento para triagem de carotenóides. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** 11: 200-9, 1991.
62. Mercadante, A.Z.; Rodriguez-Amaya, D.B. Effects of ripening, cultivar differences, and processing on the carotenoid composition of mango. **J. Agric. Food Chem.** 46: 128-30, 1998.
63. Mercadante, A.Z.; Rodriguez-Amaya, D.B. Confirmação da identidade de carotenóides minoritários pró-vitâmnicos A em verduras folhosas verdes. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** 21: 216-22, 2001.
64. Mercadante, A.Z.; Rodriguez-Amaya, D.B.; Britton, G. HPLC and mass spectrometric analysis of carotenoids from mango. **J. Agric. Food Chem.** 45: 120-3, 1997.
65. Moeller, S.M.; Jacques, P.F.; Blumberg, J.B. The potential role of dietary xanthophylls in cataract and age-related macular degeneration. **J. Am. Coll. Nutr.** 19: 522S-527S, 2000.
66. Muller, M.C.; Rodriguez-Amaya, D.B.; Lourenço, S.O. Carotenóides da cianobactéria *Synechocystis pevalekii* produzida em condições normais e sob limitação por nutrientes. **Rev. Bras. Ciênc. Far.** (enviado).
67. Niizu, P.Y.; Rodriguez-Amaya, D.B. Melancia como fonte de licopeno. **Rev. Inst. Adolfo Lutz** 62: 195-9, 2003.
68. Niizu, P.Y.; Rodriguez-Amaya, D.B. (2004) The flowers and leaves of *Tropaeolum majus* L. as rich sources of lutein. **J. Food Sci.** (enviado)
69. Niizu, P.Y.; Rodriguez-Amaya, D.B. New data on the carotenoid composition of raw salad vegetables. **J. Food Comp. Anal.** (enviado).
70. Olson, J.A. Carotenoids and human health. **Arch. Latinoamer. Nutr.** 49:7S-11S, 1999.
71. Olson, J.A. Carotenoids. In: Shils, M.E.; Olson, J.A.; Shike, M.; Ross, A.C. (Eds.) **Modern Nutrition in Health and Disease**, 9<sup>th</sup> ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1999, p. 525-41
72. Olson, J.A.; Krinsky, N.I. The colorful, fascinating world of the carotenoids: Important physiologic modulators. **FASEB J.** 9:1547-50, 1995.
73. Omenn, G.S. et al. Effects of a combination of beta-carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. **New Engl. J. Med.** 334:1150-5, 1996.
74. Padula, M.; Rodriguez-Amaya, D.B. Characterization of the carotenoids and assessment of the vitamin A value of Brazilian guava. **Food. Chem.** 20: 11-9 1986.
75. Padula, M.; Rodriguez-Amaya, D.B. Changes in individual carotenoids and vitamin C on processing and storage of guava juice. **Acta Aliment.** 16: 209-16, 1987.

76. Padula, M.; Rodriguez-Amaya, D.B. Degradation of b-carotene in a low-moisture model system at 30°C. Formation of non-volatile and volatile products. **J. Agric. Food Chem.** (em preparação para publicação).
77. Padula, M.; Rodriguez-Amaya, D.B.; Moraes, M.A.C. Comparison of the carotenoid composition and general properties of the processed juice of guava cultivar IAC-4 and commercial juices. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** 3: 109-16, 1983.
78. Palozza, P.; Krinsky, N.I. Antioxidant effects of carotenoids *in vivo* and *in vitro*: An overview. **Meth. Enzymol.** 213: 403-420, 1992.
79. Pereira, M.R.; Amaya-Farfan, J.; Rodriguez-Amaya, D.B. Avaliação da metodologia analítica para determinação de b-caroteno em macarrão fortificado. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** 18:35-8 1998.
80. Pereira, M.R.; Amaya-Farfan, J.; Rodriguez-Amaya, D.B. b-carotene content of Brazilian fortified pasta. **Food Control** 10: 81-5, 1999.
81. Porcu, O.; Rodriguez-Amaya, D.B. Goiaba (in natura) e produtos processados de goiaba como fonte de licopeno. **Acta do 5 Encontro de Química de Alimentos. Qualidade, Segurança & Inovação.** Porto: Universidade Católica do Porto; 2001. p. 613-6.
82. Porcu, O.M.; Rodriguez-Amaya, D.B. Efeito do processamento industrial da goiaba nos teores de licopeno e  $\beta$ -caroteno. Trabalho apresentado no **IV Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos**, Campinas, 2001.
83. Ramos, D.M.R.; Rodriguez-Amaya, D.B. Determination of the vitamin A value of common Brazilian leafy vegetables. **J. Micronutr. Anal.** 3: 147-55, 1987.
84. Ramos, D.M.R.; Rodriguez-Amaya, D.B. Avaliação das perdas de carotenóides e valor de vitamina A durante desidratação e liofilização industrial de espinafre. **Arq. Biol. Tecnol.** 36: 83-94, 1993.
85. Rodriguez, E.B.; Rodriguez-Amaya, D.B. Formation of apocarotenals and epoxy-carotenoids from b-carotene by chemical reactions and by autoxidation in model systems and processed food. **Food Chem.** (em preparação para publicação).
86. Rodriguez, E.B.; Rodriguez-Amaya, D.B. Formation of apocarotenals and epoxy-carotenoids from lycopene by chemical reactions and by autoxidation in model systems and processed foods. **J. Food Sci.** (em preparação para publicação)
87. Rodriguez-Amaya, D.B. Os carotenóides como precursores de vitamina A. **Bol. SBCTA** 19: 227-42, 1985.
88. Rodriguez-Amaya, D.B. Critical review of provitamin A determination in plant foods. **J. Micronutrient Anal.** 5: 191-225, 1989.
89. Rodriguez-Amaya, D.B. Provitamin A determination - Problems and possible solutions. **Food Nutr. Bull.** 12: 246-50, 1990.
90. Rodriguez-Amaya, D.B. Carotenoids: Properties and analysis. In: Macrae, R.; Robinson, R.K.; Sadler, M. (Eds.) **Encyclopaedia of Food Science and Nutrition**. Vol. 1. London: Academic Press; 1993. p. 707-13.
91. Rodriguez-Amaya, D.B. Nature and distribution of carotenoids in foods. In: Charalambous, G. (Ed.). **Shelf-Life Studies of Foods and Beverages**. Chemical, Biological, Physical and Nutritional Aspects. Amsterdam: Elsevier Science Publishers; 1993. p. 547-89.
92. Rodriguez-Amaya, D.B. Stability of carotenoids during the storage of foods. In: Charalambous, G. (Ed.). **Shelf-Life Studies of Foods and Beverages**. Chemical, Biological, Physical and Nutritional Aspects. Amsterdam: Elsevier Science Publishers; 1993. p. 591-624.
93. Rodriguez-Amaya, D.B. Assessment of the provitamin A contents of foods - the Brazilian experience. **J. Food Comp. Anal.** 9: 196-230, 1996.
94. Rodriguez-Amaya, D.B. Análisis de carotenoides. In: Moron, C.; Zacarias, I.; Pablo, S. de (Eds.) **Producción y Manejo de Datos de Composición Química de Alimentos en Nutrición**. Chile: FAO; Chile. 1997. p. 231-41.
95. Rodriguez-Amaya, D.B. Carotenóides: Estrutura, propriedades e funções. In: Rodriguez-Amaya, D. B.; Pastore, G. M. (Eds.). **Ciência de Alimentos: Avanços e Perspectivas na América Latina**, Campinas: DCA-UNICAMP, Fundação Cargill: 1997. p. 21-31.
96. Rodriguez-Amaya, D.B. **Carotenoids and Food Preparation: The Retention of Provitamin A Carotenoids in Prepared, Processed and Stored Foods**. Arlington: Opportunities for Micronutrient Interventions; 1997. 88p.
97. Rodriguez-Amaya, D.B. **A Guide to Carotenoid Analysis in Foods**. Washington DC: International Life Sciences Institute (ILSI) Press; 1999. 64p.
98. Rodriguez-Amaya, D.B. Carotenoides y Preparación de Alimentos: **La Retención de los Carotenoides Provitamina A en Alimentos Preparados, Procesados y Almacenados**. Arlington: Opportunities for Micronutrient Interventions; 1999. 99p.
99. Rodriguez-Amaya, D.B. Changes in carotenoids during processing and storage of foods. **Arch. Latinoamer. Nutr.** 49: 38S-48S, 1999.
100. Rodriguez-Amaya, D.B. Latin American food sources of carotenoids. **Arch. Latinoamer. Nutr.** 49: 74S-85S, 1999.
101. Rodriguez-Amaya, D.B. Brazilian sources of carotenoids. **Proceedings of the Fourth International Symposium on Natural Colorants**, San Diego, E.U.A. 2000.
102. Rodriguez-Amaya, D.B. Factors influencing carotenoid composition in foods. **Proceedings of the Fourth International Symposium on Natural Colorants**, San Diego, E.U.A.; 2000. p. 252-63.
103. Rodriguez-Amaya, D.B. Carotenóides e saúde: Temas atuais. Em: Mercadante, A.Z. et al. (Eds.) **Ciência de Alimentos. Avanços e Perspectivas**, vol. II, Campinas: DCA-UNICAMP; 2001. p. 216-22.
104. Rodriguez-Amaya, D.B. Effects of processing and storage on food carotenoids. **Sight Life Newslett.** (Special Issue), 3: 25-35, 2002.
105. Rodriguez-Amaya, D.B. Brazil: A bounty of carotenoid sources. **Sight Life Newslett.**, 4: 3-9, 2002.
106. Rodriguez-Amaya, D.B. Food carotenoids: Analysis, composition and alterations during storage and processing of foods. In: Elmadafa, I.; König, J. (Eds.) **Modern Aspects of Nutrition – Present Knowledge and Future Perspectives**. Basel: Karger Medical and Scientific Publishers; 2002. p. 180-91.
107. Rodriguez-Amaya, D.B. Enhancing the carotenoid levels of foods through agriculture and food technology. FoodAfrica Internet Forum, abril de 2003.
108. Rodriguez-Amaya, D.B. Carotenoids: Occurrence, properties and analysis. In: Caballero, B.; Trugo, L.; Finglas, P. (Eds.) **Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition**. London: Elsevier Science Ltda.; 2003. p. 927-36.
109. Rodriguez-Amaya, D.B. Rotas químicas e bioquímicas para a formação de compostos voláteis. Em Franco, M.R.B. (Ed.) **Sabor e aroma: Temas Atuais**. São Paulo: Varela Editora e Livraria; (no prelo), 2004.
110. Rodriguez-Amaya, D.B. et al. Assessment of provitamin A determination by open column - visible absorption spectrophotometry. **J. Chromatogr. Sci.** 26: 624-9, 1988.
111. Rodriguez-Amaya, D.B.; Amaya-Farfan, J. Estado actual de los metodos analiticos para determinar provitamina A. **Arch. Latinoamer. Nutr.** 42: 180-91, 1992.
112. Rodriguez-Amaya, D.B.; Bobbio, P.A.; Bobbio, F.O. (1983). Carotenoid composition and vitamin A value of the Brazilian fruit *Cyphomandra betacea*. **Food Chem.** 12: 61-5, 1983.
113. Rodriguez-Amaya, D.B.; Kimura, M. Carotenóides e valor de vitamina A em cajá (*Spondias lutea*). **Ciênc. Tecnol. Aliment.** 9: 148-62, 1989.
114. Rodriguez-Amaya, D.B.; Tavares, C.A. Importance of *cis*-isomer separation in determining provitamin A in tomato and tomato products. **Food Chem.** 45: 297-302, 1992.
115. Sá, M.C. de; Rodriguez-Amaya, D.B. Carotenoid composition of cooked green vegetables from restaurants. **Food Chem.** 83(4): 595-600, 2003.
116. Sá, M.C. de; Rodriguez-Amaya, D.B. Optimization of HPLC quantification of carotenoids in cooked green vegetables. **J. Food Comp.** 17: 37-51, 2004.
117. Simpson, K.L. Relative value of carotenoids as precursors of vitamin A. **Proc. Nutr. Soc.** 42: 7-17, 1983.

Rodriguez-Amaya, D. B. Avanços na pesquisa de carotenóides em alimentos: contribuições de um laboratório brasileiro. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 63(2):129-38, 2004

---

118. Tavares, C.A.; Rodriguez-Amaya, D.B. Carotenoid composition of Brazilian tomatoes and tomato products. **Lebens. Wissen. Technol.** 27: 219-24, 1994.
119. Trujillo-Quijano, J.A.; Rodriguez-Amaya, D.B.; Esteves, W.; Plonis, G.F. Carotenoid composition and vitamin A values of oils from four Brazilian palm fruits. **Fat Sci. Technol.** 6: 222-6, 1990.
120. Wilberg, V.C.; Rodriguez-Amaya, D.B. Quantificação de carotenóides de sementes de urucum (*Bixa orellana* L.) por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). **Rev. Bras. Corantes Naturais.** 1: 145-52, 1992.
121. Wilberg, V.C.; Rodriguez-Amaya, D.B. Quantificação de -caroteno e licopeno em tomate e em alguns dos seus produtos por CLAE. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** 13: 132-41, 1993.
122. Wilberg, V.C.; Rodriguez-Amaya, D.B. HPLC quantitation of major carotenoids of fresh and processed guava, mango and papaya. **Lebens. Wissen. Technol.** 28: 474-80, 1995.
123. World Cancer Research Fund. (1997). **Food, nutrition and the prevention of cancer. A global perspective.** Washington DC: American Institute for Cancer Research; 1997. 670 p.
124. Ziegler, R.G. Vegetables, fruits, and carotenoids and the risk of cancer. **Am. J. Clin. Nutr.** 53: 251S-249S, 1991.
125. Ziegler, R.G. et al. Does b-carotene explain why reduced cancer risk is associated with vegetable and fruit intake? **Cancer Res.** (Suppl.) 52: 2060-6, 1992.
126. Ziegler, R.G. et al. Importance of alpha-carotene, beta-carotene, and other phytochemicals in the etiology of lung cancer. **J. Natl. Cancer Inst.** 88: 612-5, 1996.

# Análise cromatográfica em camada delgada comparativa de extratos de *Curcuma zedoaria* (Christm.) Roscoe

## Comparative analysis of *Curcuma zedoaria* (Christm.) Roscoe extracts by means of thin-layer chromatography

RIALA6/988

Mônica Arcon BATISTIC<sup>1\*</sup>, Maria Aparecida NICOLETTI<sup>2</sup>, Mariangela Tirico AURICCHIO<sup>1</sup>

\* Endereço para correspondência: Instituto Adolfo Lutz, Bromatologia e Química, Serviço de Medicamentos, Av. Dr. Arnaldo, 355, 5º andar CEP: 01246-902, São Paulo- SP - e-mail: mbatistic@ial.sp.gov.br

<sup>1</sup> Serviço de Medicamentos, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP

<sup>2</sup> Universidade de São Paulo, São Paulo, SP

Recebido: 14/12/2002 – Aceito para publicação: 14/10/2004

### RESUMO

As várias espécies do gênero *Curcuma* têm sido estudadas desde a década de 60, pois há muito são amplamente cultivadas e utilizadas na medicina popular de todo sudeste asiático. Hoje seu uso é bem difundido entre nós e, apesar da utilização de várias técnicas para a caracterização dos extratos, o controle de qualidade desses fitoterápicos constitui um desafio para o laboratório de Saúde Pública. Este estudo propõe um método rápido e pouco dispendioso, empregando cromatografia em camada delgada e que mostrou-se eficaz na avaliação de extratos de *Curcuma zedoaria*.

**Palavras-Chave.** *Curcuma zedoaria* (Christm.) Roscoe; cromatografia em camada delgada; perfil cromatográfico.

### ABSTRACT

Several *Curcuma* species have been studied since the sixties due to its widespread cultivation in the whole Southeast area, and for its use as popular medicine. Nowadays, *Curcuma* has also been largely employed in Brazil. Although diverse analytical techniques have been used for *Curcuma* extracts characterization, its quality control still defies the public health laboratory. The present work proposes a rapid and low cost method using thin-layer chromatography in order to differentiate *Curcuma zedoaria* from diverse origin.

**Key Words.** *Curcuma zedoaria* (Christ.) Roscoe; thin-layer chromatography; chromatographic profile.

### INTRODUÇÃO

As curcumas são plantas herbáceas perenes do gênero Indo-Malaio *Curcuma*, cultivadas há muito na Índia, China, Indonésia, Paquistão e outros países<sup>24</sup>, sendo usadas em afecções hepáticas em todo Sudeste Asiático. A *Curcuma zedoaria*, em particular, consta da publicação “The Indian Materia Medica”<sup>25</sup> desde 1927, tendo sido assinalada no Brasil por Coimbra em “Notas de Fitoterapia”<sup>2</sup>, já em 1958 e posteriormente por Miyake<sup>24</sup>, em 1986. Desde a década de 60, no Japão, várias espécies do gênero *Curcuma* vêm sendo estudadas quanto a sua composição<sup>30</sup>. De 1966 a 1972, Hikino et al.<sup>6,7,8,9,10,11,12,13,14,15</sup>, em uma série de estudos, isolaram e estabeleceram a estrutura dos sesquiterpenos como o curcumol, a curdiona, o curcumerol, a zederona, entre outros, aos quais tem sido atribuídas atividades antiinflamatória<sup>31</sup>,

hepatoprotetora<sup>21,22</sup> e antimutagênica<sup>19</sup>. A demetoxicurcumina e bisdemetoxicurcumina, isoladas por Syu et al.<sup>29</sup>, mostraram atividade citotóxica contra células de neoplasia maligna ovarianas. As frações polissacarídicas têm sido isoladas e despertado interesse quanto às possíveis ações farmacológicas, dentre as quais as atividades antitumoral, genotóxica e anticlastrogênica<sup>17,18</sup>. Gupta et al.<sup>4</sup> caracterizaram o *p*-metoxicinamato de etila como o principal agente da atividade anti-fúngica da *Curcuma zedoaria*.

O interesse no potencial farmacológico desta planta tem justificado estudos de micropropagação para aumento de sua produção como forma mais econômica, comparativamente à produção vegetativa<sup>23</sup>. Cao et al.<sup>1</sup> estabeleceram os parâmetros para a análise molecular para caracterizar taxonomicamente as espécies de *Curcuma* empregadas na China e no Japão, com base nas seqüências de genes.

Ao longo dos anos, várias técnicas vêm sendo utilizadas para a caracterização dos principais constituintes da *C. zedoaria*. Kato e Fisher<sup>16</sup> caracterizaram as raízes e rizomas desta espécie, utilizando a cromatografia em camada delgada. Nos últimos dez anos, podem ser citadas a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e a espectrometria de massas acoplada à cromatografia em fase gasosa (CG-EM), associadas à extração por fluido super crítico<sup>20</sup>. Hiermann e Radl<sup>5</sup> descreveram a utilização da eletroforese capilar; mais recentemente, o Optimum Performance Laminar Chromatography (OPLC) é apontado como método de separação mais eficiente para vários tipos de compostos<sup>3,26,27,28</sup>.

A despeito da reconhecida utilidade das preparações extrativas e de fitoterápicos feitos com *C. zedoaria*, controlar a qualidade de sua produção é um desafio para Laboratórios de Saúde Pública devido aos custos do instrumental necessário para essa atividade. Com o objetivo de superar essa limitação, neste estudo propomos um método rápido e de baixo custo, com base em cromatografia em camada delgada, e que permite diferenciar os perfis cromatográficos de extratos de *Curcuma* de diferentes origens.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Amostras

Foram estudadas quatro amostras de *Curcuma zedoaria* e uma amostra de *Curcuma longa*, das seguintes procedências: amostra 1- Ibiúna, SP; amostra 2- Ribeirão Preto, SP; amostra 3- Campo Grande, MS; amostra 4- Índia e amostra 5 (*C. longa*)- São Paulo, SP. A amostra de *Curcuma zedoaria* proveniente de Ibiúna, SP, foi identificada pela Dra. Inês Cordeiro, do Instituto de Botânica, onde a exsiccata foi depositada sob número de registro 338498, e utilizada como a droga padrão na análise cromatográfica.

### Métodos

#### Preparo das amostras

Para cada amostra, exceto para a amostra de Campo Grande, foram preparados dois tipos de extratos com mistura hidroalcoólica a 70%: por percolação simples e percolação fracionada. Foram preparados extratos metanólicos a partir da droga moída destas amostras, na concentração de 1 g por 5 mL de metanol, segundo Wagner<sup>32</sup>.

#### Sistema cromatográfico

Os cromatogramas foram desenvolvidos em duas diferentes fases móveis:

Fase móvel 1 - tolueno: acetato de etila (93:7)

Fase móvel 2 - clorofórmio

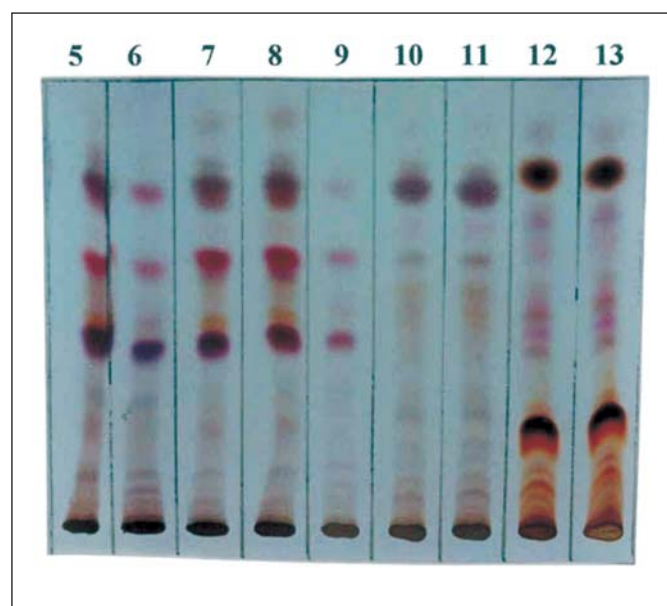
por cromatografia ascendente, utilizando-se placas de Sílica Gel 60 F 254 Merck, e o revelador anisaldeído sulfúrico, seguido de aquecimento a 110°C por 5 minutos<sup>32</sup>. Foram aplicados 5 µL de cada amostra dos extratos simples, fracionados e metanólicos.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

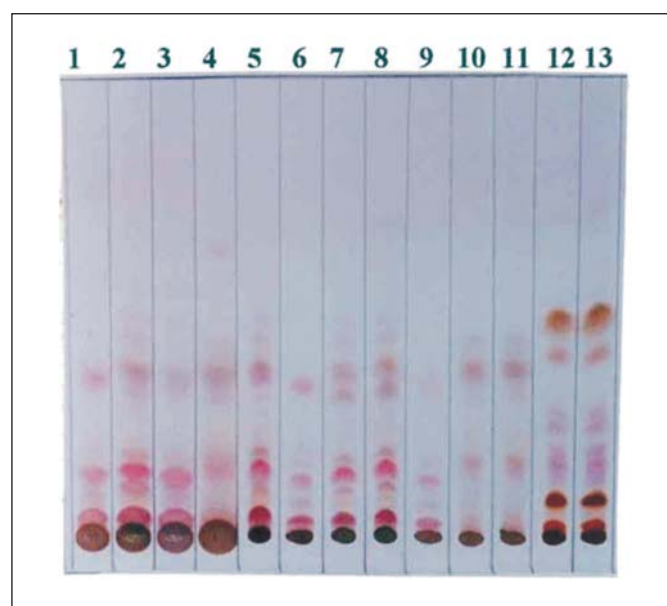
Nas figuras 1 e 2 estão representados os cromatogramas obtidos para os extratos simples, fracionados e metanólicos das cinco amostras, nas fases móveis 1 e 2. Observou-se que tanto para a fase móvel 1 como para a fase móvel 2 houve boa separação dos componentes dos extratos aplicados, com manchas diferenciadas e distribuídas por toda a placa, em diferentes Rf(s), variando de 0,1 a 0,93 (fase 1) e de 0,1 a 0,5 (fase 2). Pode-se constatar diferentes tons de coloração para as manchas obtidas em cada um dos extratos na fase móvel 1 (figura 1), favorecendo sua visualização e caracterização, ao contrário do que ocorreu com aquelas observadas na fase móvel 2 (figura 2).

Quanto aos perfis cromatográficos observados para cada amostra, pode-se notar que as manchas dos extratos fluidos obtidos por percolação simples (EFPS) foram menos intensas que aquelas obtidas por percolação fracionada (EFPF), sugerindo que o sistema utilizado responde às variações de concentrações entre os extratos. Esta observação pode ser relevante quando o processo de preparação da amostra a analisar não é conhecido e podem resultar em diferenças significativas no perfil cromatográfico. Os extratos metanólicos apresentaram perfis cromatográficos semelhantes aos obtidos para os dois tipos de percolação.

Apesar de métodos cromatográficos mais sofisticados disponíveis atualmente, o desenvolvimento da cromatografia em camada delgada (CCD), para amostras de extratos fluidos de *Curcuma zedoaria* de quatro diferentes procedências, demonstra que esta técnica é de grande utilidade na análise de drogas vegetais e suas preparações, mesmo nos laboratórios com limitações de recursos. Pelos resultados obtidos em ambos sistemas cromatográficos (figuras 1 e 2), pode-se afirmar que os extratos fluidos das amostras 2 e 3 são semelhantes ao obtido para a amostra 1, considerada como a droga padrão neste estudo. Optou-se pelo uso de uma droga com identidade botânica certificada para a caracterização cromatográfica tanto da droga como de suas preparações extrativas, e não simplesmente o uso de marcadores cromatográficos, já que a comparação dos perfis é o escopo do trabalho e por ser esta a situação mais comumente encontrada nos laboratórios oficiais. As diferenças observadas para a amostra 4, proveniente da Índia, são nítidas e perfeitamente detectadas por esta técnica, confirmando o fato de que condições climáticas, diferentes cultivos, variedades botânicas, tempo de secagem e outros fatores podem modificar os constituintes das drogas vegetais, alterando seu perfil cromatográfico. Porém, como a técnica de CCD pode fornecer a caracterização de uma determinada espécie, grandes alterações de perfis indicariam, com certeza, alterações, adulterações ou mesmo substituições desta droga por outra espécie qualquer. Isto pode ser constatado com a comparação dos perfis das amostras 1,2,3 e 4 com a amostra 5, de *Curcuma longa*, que apesar de pertencer ao mesmo gênero da *C. zedoaria*, revelou diferente composição, claramente visualizada nos cromatogramas.



**Figura 1.** Placa cromatográfica desenvolvida na fase móvel 1 (tolueno: acetato de etila- 93:7)



**Figura 2.** Placa cromatográfica desenvolvida na fase móvel 2 (clorofórmio)

Legendas das Figuras 1 e 2

- 1 - extrato metanólico de *C. zedoaria* (amostra 1- Ibiúna, SP)
- 2 - extrato metanólico de *G. zedoaria* (amostra 2- Ribeirão Preto, SP)
- 3 - extrato metanólico de *C. zedoaria* (amostra 3- Campo Grande, MS)
- 4 - extrato metanólico de *C. zedoaria* (amostra 4- Índia)
- 5 e 6 - extratos fracionado e simples de *C. zedoaria* (amostra 1)
- 7 e 8 - extratos simples e fracionado de *C. zedoaria* (amostra 2)
- 9 - extrato simples de *C. zedoaria* (amostra 3)
- 10 e 11 - extratos simples e fracionado de *C. zedoaria* (amostra 4)
- 12 e 13 - extratos simples e fracionado de *C. Tonga* (amostra 5)

Como neste estudo pretendeu-se caracterizar outros componentes da *C. zedoaria*, que não os óleos essenciais<sup>33</sup> por cromatografia em camada delgada, procedeu-se à percolação simples e fracionada das drogas em pó, para a obtenção de extratos hidroalcoólicos, paralelamente à uma extração com metanol a quente (60°C, por 5 minutos). A utilização do revelador anisaldeído sulfúrico mostrou eficiência na revelação das manchas das amostra de *C. zedoaria*, produzindo manchas de coloração bem variadas, com excelente diferenciação das mesmas. Sendo que os extratos metanólicos apresentaram perfis cromatográficos semelhantes aos obtidos para os dois tipos de percolação, o uso deste método por um laboratório de controle de qualidade sem instrumentação cara e sofisticada como, por exemplo, o de uma farmácia de manipulação, permitirá uma rápida avaliação da matéria-prima em pó desta droga, bem como do seu fitoterápico.

## REFERÊNCIAS

1. Cao, H et al. Molecular analysis of medicinally-used Chinese and Japanese *Curcuma* based on 18S rRNA gene and trnK gene sequences. *Biol. Pharm. Bull.*, 1: 1389-94, 2001.
2. Coimbra, R. **Notas de Fitoterapia**. 2ª ed., Edição do Laboratório Clínico Silva Araújo S.A., Rio de Janeiro, 1958.
3. Galand, N. et al. OPLC and AMD, recent techniques of planar chromatography: their interest for separation and characterization of extractive and synthetic compounds. *Fitoterapia*, 73: 121-34, 2002.
4. Gupta, S. K. et al. Isolation of Ethyl *p*-Methoxycinnamate, the major antifungal principle of *Curcuma zedoaria*. *Lloydia*, 39(4):218-22, 1976.
5. Hiermann, A ; Radl, B. Analysis of aromatic plant acids by capillary zone electrophoresis. *J. Chromatog. A*, 803: 311-4, 1998.
6. Hikino, H. et al. Structure of Curcumol. *Chem. Pharm. Bull.*, 14 (11): 1241-49, 1966.
7. Hikino, H. et al. Structure of Curdione. *Chem. Pharm. Bull.*, 15 (9): 1390-94, 1967.
8. Hikino, H. et al. Structure of Curcumenol. *Chem. Pharm. Bull.*, 16: 39- 42, 1968.
9. Hikino, H. et al. Structure of Dehydrocurdione, a Sesquiterpenoid of *Curcuma zedoaria*. *Chem. Pharm. Bull.*, 20 (5): 987-9, 1972.
10. Hikino, H. et al. Structure of Zederone. *Chem. Pharm. Bull.*, 16 (6): 1081-7, 1968.
11. Hikino, H. et al. Structure of Procuremenol. *Chem. Pharm. Bull.*, 16 (8): 1605-7, 1968.
12. Hikino, H. et al. Structure of Curcumol. *Chem. Pharm. Bull.*, 16 (5): 827-31, 1968.
13. Hikino, H. et al. Furanodiene, a precursor of furan-containing sesquiterpenoids. *Tetrahedron*, 8: 931-3, 1968.
14. Hikino, H. et al. Structure of Curzerenone, Epicurzerenone and isofuranogermacrene. *Tetrahedron*, 24: 2855-8, 1968.
15. Hikino, H. et al. Sesquiterpenoids. Part XXXVII. Absolute Configuration and Conformation of Zederone, a Sesquiterpenoid of *Curcuma zedoaria*. *J. Chem. Soc. (C)*: 688-91, 1971.
16. Kato, E.T.M.; Fisher, D.C.H. Estudo morfo-histológico e cromatográfico em camada delgada comparativo de raízes e de rizomas de *Curcuma zedoaria* (Bergius) Roscoe- droga, óleo essencial e extrato fluido. *LECTA- USF*, 14 (2): 9-26, jul./dez.1996.
17. Kim, K.I. et al. Antitumor, genotoxicity and anticlastrogenic activities of polysaccharide from *Curcuma zedoaria*. *Mol. Cells*. 31(4): 392-8, 2000.

18. Kim, K.I. et al. Effects of polyssaccharides from rhizomes of *Curcuma zedoaria* on macrophage functions. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, 65(11): 2369-77, 2001.
19. Lee, H.; Lin, J.Y. Antimutagenic activity of extracts from anticancer drugs in Chinese medicine. **Mutat. Res.**, 204(2):229-234, 1998.
20. Ma, H.Z. et al. Application of off-line supercritical-fluid extraction-gas chromatography for the investigation of chemical-constituents in *Curcuma zedoaria*. **Phytochem. Analysis**, 6(6): 292-6, 1995.
21. Matsuda, H. et al. Inhibitory effect and action mechanism of sesquiterpenes from Zedoariae Rhizoma on D- galactosamine/ lipopolysaccharide-induced liver injury. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, 8(4):339-44, 1998.
22. Matsuda, H. et al. Hepatoprotective constituents from Zedoariae rhizoma: absolute stereostructures of three new carabrane-type sesquiterpenes, curcumenolactones A, B and C. **Bioorg. Med. Chem.**, 9: 909-16, 2001.
23. Mello, M.O. et al. Quantificação da Micropropagação de *Curcuma zedoaria* Roscoe. **Sci. Agric.**, 57(4): 703-7, 2000.
24. Miyake, E. T. Zedoária- *Curcuma zedoaria* Roscoe. **Rev. Bras. Farmacogn.**, 1(2): 118-262, 1986.
25. Nadkarni, K.M. **The Indian Materia Medica** , Bombay, 1927.
26. Nyireddy, S. The bridge between TLC and HPLC: overpressured layer chromatography (OPLC). **Trends Analyt. Chem.**, 20 (2): 91-101, 2001.
27. Poole, C.F., Dias, N. C. Practitioner's guide to method development in thin-layer chromatography. **J. Chromatog. A** , 892: 123-42, 2000.
28. Poole, C.F. Planar chromatography at the turn of the century. **J. Chromatog. A** , 856:399-427, 1999.
29. Syu, W. J. et al. Cytotoxicity of curcuminoids and some novel compounds from *Curcuma zedoaria*. **J. Nat. Prod.**, 61(12): 1531-4, 1998.
30. Takano, I. et al. Guaiane sesquiterpene lactones from *Curcuma aeruginosa*. **Phytochemistry**, 40(4): 1197- 2000, 1995.
31. Yoshioka, T. et al.. Antiinflammatory potency of dehydrocurdione, a zedoary-derived sesquiterpene. **Inflamm. Res.**, 47(12):476-81, 1998.
32. Wagner, H.; Bladt, S. **Plant drug analysis**. Heidelberg, Springer-Verlag, 1996, 384 p.



# Caracterização Farmacognóstica de *Polygonum persicaria* L.

## Pharmacognostic characterization of *Polygonum persicaria* L.

RIALA6/989

Helena M. YANO,<sup>\*1</sup>; Edna T.M. KATO<sup>2</sup>; Elfriede M. BACCHI<sup>2</sup>

\* Endereço para correspondência: Av. Dr Arnaldo, 355, BQ, 5º andar, CEP 01246-902. São Paulo-SP, Brasil, e-mail: heleyano@ig.com.br

<sup>1</sup> Instituto Adolfo Lutz-Central, Seção de Farmacognosia

<sup>2</sup> Departamento de Farmácia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo

### RESUMO

*Polygonum persicaria* L. (Polygonaceae) é uma planta empregada na medicina popular brasileira como anti-hemorroidal, antiúlcera e vermífuga. As folhas e os caules foram estudados sob os aspectos macro e microscópicos. Fotografias ilustram as descrições. O perfil cromatográfico em camada delgada do extrato foi obtido comparativamente com substâncias de referência. Esses dados em conjunto fornecem parâmetros de controle de qualidade da droga vegetal inteira ou fragmentada auxiliando a detecção de fraudes ou adulterações.

**Palavras-Chave.** *Polygonum persicaria* L., farmacognosia, anatomia, cromatografia

### ABSTRACT

*Polygonum persicaria* L. (Polygonaceae) is a plant largely used for treatment of various diseases in Brazilian popular medicine, such as anti-hemorrhoid, vermicide, and in gastric affections. Macroscopic and microscopic analyses of *Polygonum persicaria* L. leaves and stem were carried out. The presented pictures illustrate their descriptions. The plant extract chromatographic profile was established by means of thin layer chromatography comparing with standards substances. All these data might be used as parameters for performing the quality control of the whole crude or fragmented drug which provide the drugs adulteration detection. Analytical procedure employed in the present study provides the simplest and quickest method to assess the quality of the crude drug.

**Key Words.** *Polygonum persicaria* L., pharmacognosy, anatomy, chromatography

### INTRODUÇÃO

A família Polygonaceae Jussieu compreende cerca de 40 gêneros e aproximadamente 800 espécies distribuídas nas regiões tropicais, subtropicais e temperadas. Na flora brasileira, é representada por 7 gêneros e cerca de 57 espécies<sup>4,30</sup>.

O gênero *Polygonum* L. ocorre em áreas tropicais e subtropicais do mundo, sendo observadas em banhados e margens de córregos. Seu uso na terapêutica doméstica é antigo. No Brasil, a designação “erva-de-bicho” foi atribuída a algumas plantas do gênero *Polygonum* L. empregadas popularmente no tratamento de parasitoses<sup>24</sup>. Essa denominação foi relacionada à crença que os mamilos anais de pessoas com hemorróidas fossem causados por um parasita, pois frequentemente esses indivíduos eram afetados por helmintos como o tricocéfalos<sup>9,14</sup>. Indígenas das Guianas utilizam um gel preparado de seiva de *Polygonum hydropiperoides* Michaux para inflamações oftálmicas, sendo também considerada abortiva<sup>7</sup>. Internamente,

são utilizadas como diuréticas, estimulantes, antigonorreicas e no tratamento de diarreias, febres perniciosas, congestões cerebrais, parasitoses intestinais e astenia<sup>18,19</sup>. Externamente, *Polygonum hydropiperoides* Michaux., *P. acuminatum* Kunth. e *P. punctatum* Ell. são empregadas contra lesões dérmicas, erisipela, hemorróidas e dores reumáticas<sup>2</sup>. Na literatura etnofarmacológica recomenda-se chá para uso interno e externo.<sup>22</sup> Espécies desse gênero contêm componentes com atividades farmacológicas diversas: resveratrol com atividade anticâncer<sup>16</sup> e fitoestrogênica<sup>3</sup>; flavonóides antioxidantes<sup>23</sup> e fungitóxicos<sup>1</sup>; além de ácidos fenólicos antibacterianos e antiinflamatórios<sup>29</sup>.

*Polygonum persicaria* L., espécie originária da Europa, encontra-se amplamente distribuída no território brasileiro. Seu nome botânico deriva da palavra “Pérsia”, atual Irã. Erva anual, ocorre em ambientes úmidos, mas não encharcados, pois prefere solos arejados, ricos em matéria orgânica. Infesta lavouras, pomares e beira de canais, pela facilidade de dispersão de suas sementes<sup>14,19</sup>. Popularmente conhecida como erva-de-bicho,

persicária, ferradura, persicária-de-pé-vermelho, é empregada como adstringente, vulnerária, odontálgica e no tratamento de úlceras. Externamente é reputada como útil em casos de paralisia<sup>18</sup>. Embora atualmente ocorra como cosmopolita, poucos estudos foram realizados com *Polygonum* L. Scavone e Graeiro<sup>27</sup> realizaram estudo anatômico e fitoquímico de *Polygonum persicaria* L. var. *biforme* (Wahlenberg) Fries. Mitchell<sup>20</sup> comparou as estruturas foliares de algumas espécies aquáticas de *Polygonum* L. Kapoor et al<sup>12</sup> descreveram a venação em espécies de *Polygonum* L. da Índia. Lerstern e Curtis<sup>17</sup> destacaram a importância dos caracteres anatômicos na taxonomia do gênero. Silva-Brambilla e Mosqueta<sup>28</sup> estudaram a anatomia foliar de espécies pertencentes a gêneros incluídos na família Polygonaceae (*Polygonum* L., *Ruprechtia* C.A. Mey e *Triplaris* Loefl. ex L.) da planície de inundação do alto rio Paraná. Gattuso<sup>6</sup> realizou estudos de ultraestrutura de glândulas secretoras em *Polygonum* L.. Kawasaki et al.<sup>13</sup>, verificaram que na seção *Persicaria* predominam os flavonóis 3-O-glicosídicos, sendo que quercetina 3-O-ramnósido e quercetina 3-O-glicósido foram identificados por Isobe e Noda<sup>10</sup>. Na família Polygonaceae, a rutina foi inicialmente identificada em *Fagopyrum esculentum* Moench<sup>8</sup>. Yano<sup>31</sup>, estudando o extrato hidroetanólico liofilizado de órgãos aéreos de *Polygonum persicaria* L., verificou atividade antiinflamatória e sedativa em ratos.

O objetivo deste trabalho é a caracterização macro e microscópica da droga vegetal, constituída de folhas e de caules de *Polygonum persicaria* L., bem como a determinação do perfil cromatográfico de seu extrato, contribuindo para a identificação e controle de qualidade da droga vegetal preparada com os órgãos aéreos de uma espécie muito comum entre nós, e amplamente empregada na fitoterapia.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Material vegetal.** Indivíduos de *Polygonum persicaria* L. foram coletados em São Miguel Paulista, no município de São Paulo, em terrenos brejosos junto a córregos. Exsicata encontra-se depositada no Herbário do Instituto de Biociências, Departamento de Botânica da Universidade de São Paulo, sob a designação YANO H. 01 (SPF).

**Morfologia.** O estudo morfológico foi realizado com folhas e caules frescos ou transformados em droga vegetal. Caracteres macroscópicos foram observados a vista desarmada ou com auxílio de lupa estereoscópica Wild Heerbrugg 80149. As folhas foram seccionadas no terço mediano inferior<sup>21</sup>. Cortes transversais e longitudinais foram preparados conforme procedimentos usuais em microtécnica vegetal<sup>15</sup>. Nos testes histoquímicos foram empregados cortes histológicos de material fresco e sudam III<sup>26</sup>, floroglucina clorídrica,<sup>11</sup> azul de metileno 1%, lugol<sup>5</sup> na caracterização de lipídios, lignina, mucilagens e amiloplastos, respectivamente. As escalas nas fotos e desenhos foram projetadas nas mesmas condições óticas dos cortes. As fotomicrografias foram obtidas em fotomicroscópio Nikonã. Os termos empregados nas descrições seguiram os sugeridos por Rizzini<sup>25</sup>.

**Perfil cromatográfico do extrato.** O extrato da droga vegetal a 10% em solução hidroetanólica a 70% foi submetido à análise cromatográfica em camada delgada empregando-se o seguinte sistema: placa de sílica gel GF254 Merck, 0,2mm; eluente-*n*-butanol/ácido acético glacial/água (60:15:100, fase superior); revelador difenilborioxetilamina a 1% em metanol; visualização-UV 366 nm. Neoesperidina, naringina, diosmina, naringenina, quercetina e rutina, adquiridos da Sigma Chemical Company E.U.A., em solução a 0,1% em metanol, foram empregadas como substâncias de referência.

## RESULTADOS

### Caracterização macroscópica

As folhas são simples, alternas, de ápice acuminado, de nervura central com proeminência acentuada na face abaxial, e nervuras secundárias pouco aparentes, de margem inteira, ondulada, base simétrica, contorno lanceolado, medindo de 3,5 a 15 cm de comprimento por 0,8 a 3,0 cm de largura e curtamente pecioladas (Figura 1). Na região mediana da folha observa-se,



Figura 1. *Polygonum persicaria* L. Ramo florido.

algumas vezes, uma mancha castanho escura. As folhas transformadas em droga vegetal apresentam-se enrugadas e de coloração verde-escura; algumas adquirem coloração avermelhada. Nas bases dos pecíolos observam-se ócreas. Os caules são cilíndricos, fistulosos, medem de 0,4 a 0,8 cm de diâmetro e mostram tonalidade avermelhada e finas estrias no sentido longitudinal, que se acentuam na droga vegetal.

As folhas e os caules são fracamente aromáticos; o sabor é ligeiramente amargo e adstringente.

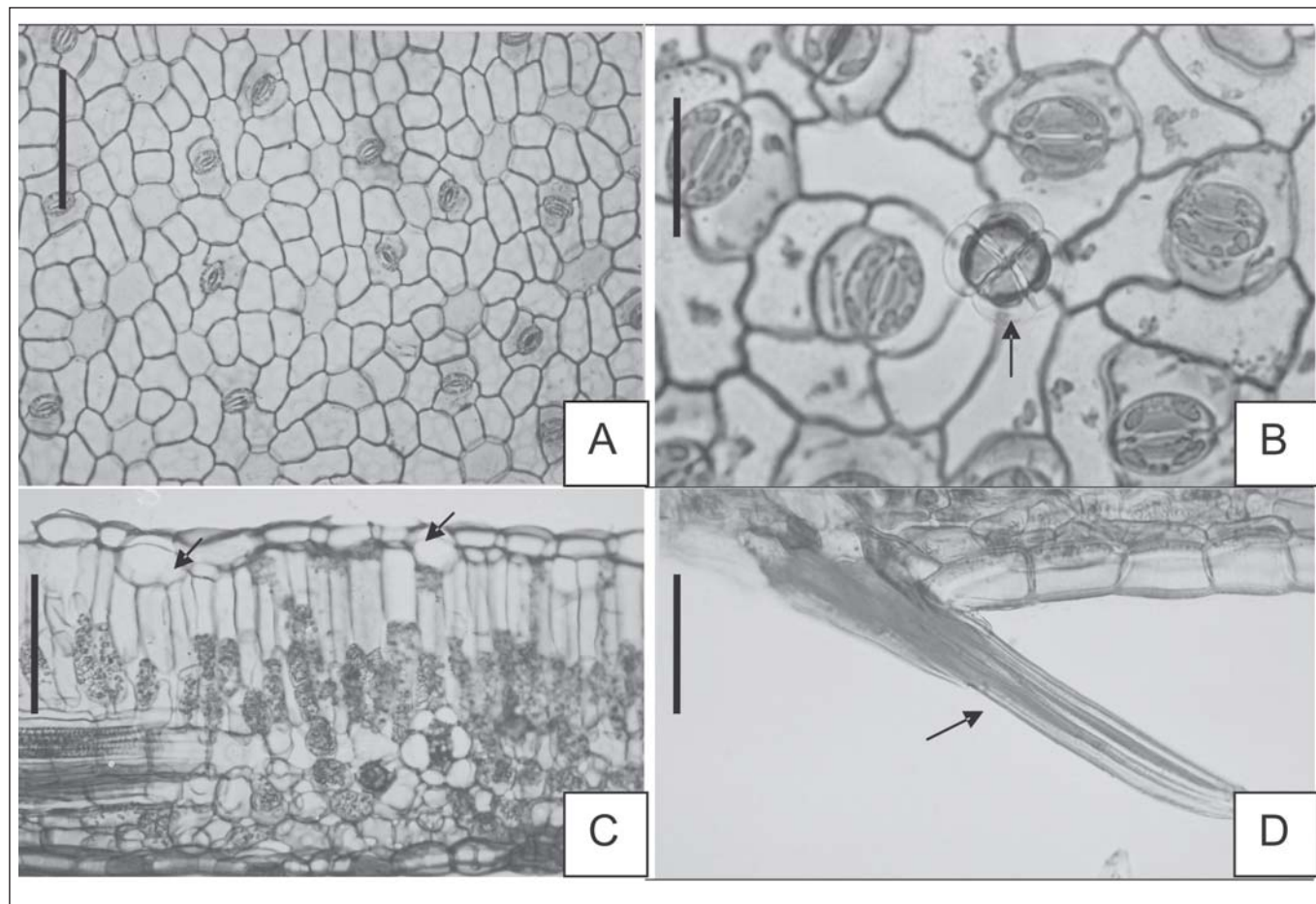
### Caracterização microscópica

#### Folha

A epiderme, em vista frontal, mostra células de paredes anticlinais retas ou levemente sinuosas, sendo a sinuosidade maior na face abaxial (Figura 2 – A e B). A folha é anfiestomática, predominando os estômatos na face abaxial (Figura 2 – A e B). Estômatos paracíticos prevalecem, ocorrendo ocasionalmente anisocíticos ou anomocíticos (Figura 2 – A e B). A secção transversal revela epiderme uniestratificada, constituída de células de forma e tamanho variado. Algumas células na face

adaxial destacam-se pelo formato globoso (Figura 2 – C). A cutícula é lisa e delgada. Tricomas tectores pluricelulares e glandulares estão presentes em ambas as faces da lâmina (Figura 2 – B e D). Os primeiros, situados especialmente nas nervuras de maior porte, tem seu corpo formado por 4 a 8 células de paredes espessadas por lignina; as células mais externas mostram-se menores (Figura 2 - D). O tricoma glandular é constituído de 4 a 8 células secretoras de paredes delgadas e de conteúdo denso, que adquire cor vermelho-alaranjada quando tratado com sudam III (Figura 2 – B). O conteúdo das células epidérmicas comuns adquiriu coloração com azul de metileno 1%. O mesofilo é dorsiventral (Figura 2 – C). Drusas de oxalato de cálcio são encontradas nessa região.

A nervura principal, em secção transversal, revela contorno biconvexo, sendo a proeminência mais acentuada na face abaxial. As células epidérmicas nesta região são proporcionalmente menores e providas de paredes anticlinais externas ligeiramente convexas. Sob a região epidérmica de ambas as faces, observam-se de 1 a 5 camadas de células colenquimáticas com espessamento nos ângulos. Os feixes



**Figura 2.** Vista frontal da face adaxial (A) e abaxial (B) e corte transversal da folha de *Polygonum persicaria* L. (C e D). As setas indicam tricoma glandular em B, células globosas em C e detalhe da epiderme, evidenciando tricoma tector em D. Escala de A: 100 µm, B: 25 µm, C: 100 µm e D: 50 µm.

vasculares, dispostos em círculo, são colaterais. Externo à região floemática encontra-se calota fibrosa. Os parênquimas, cortical e medular, evidenciam células arredondadas de paredes delgadas, delimitando meatos.

O pecíolo, em seção transversal, mostra contorno arredondado. Sob a epiderme unisseriada observam-se 5 a 6 estratos de colênquima angular. As células do parênquima fundamental, de paredes delgadas, delimitam espaços intercelulares de tamanhos variados; na região cortical predominam câmaras. Drusas de oxalato de cálcio são observadas com frequência. Bainha amilífera é encontrada junto aos feixes vasculares.

### Caule

O caule, em estrutura primária, apresenta contorno circular e distribuição eustélica. A epiderme uniestratificada é revestida por cutícula delgada. O colênquima angular, subepidérmico, é representado por 4 a 5 estratos celulares. O parênquima cortical reduzido mostra células de paredes delgadas. Entre estas células ocorrem espaços intercelulares de diferentes dimensões (Figura 3 - A). Na estrutura secundária, evidenciam-se calotas fibrosas

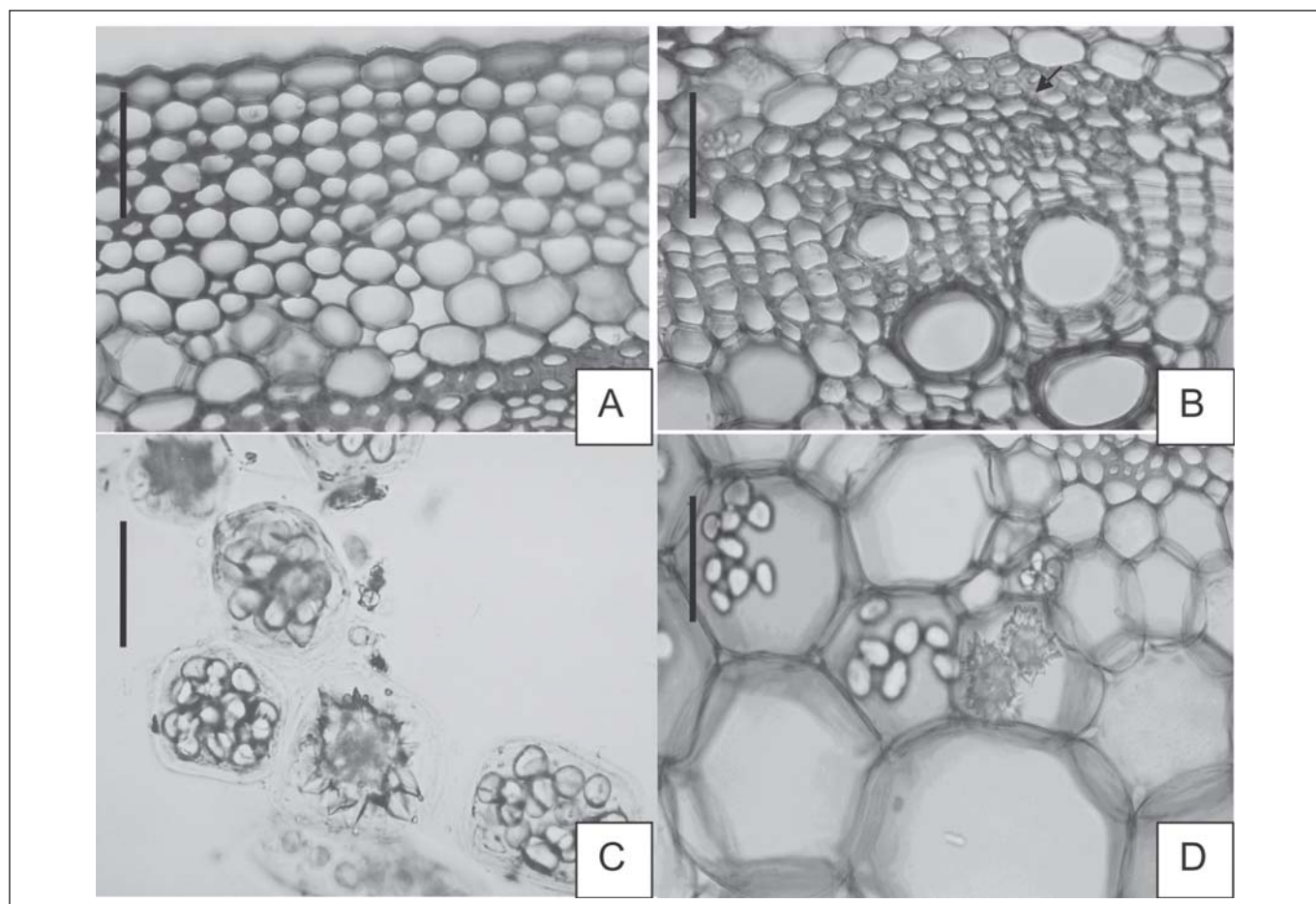
externas ao floema (Figura 3 - B). Drusas de oxalato de cálcio e amiloplastos são encontrados na região cortical e medular (Figura 3 - C e D).

### Perfil cromatográfico

O perfil cromatográfico do extrato hidroetanólico de *Polygonum persicaria* está representado na Figura 4. O extrato apresentou manchas com Rf e coloração coincidentes com rutina e quercetina, sugerindo sua presença no material em estudo.

## DISCUSSÃO

Erva-de-bicho é um nome comum atribuído a algumas espécies de *Polygonum* L., tais como, *Polygonum persicaria* L., *P. persicaria* L. var. *biforme* (Wahlenberg) Fries<sup>27</sup>, *Polygonum hydropiperoides* Michaux e *P. punctatum* Ell., conhecidas por seu uso principalmente no tratamento de hemorróidas<sup>19</sup>. *Polygonum persicaria* L. possui folhas simples, inteiras, penínervias e acuminadas. Estas características coincidem com informações descritas anteriormente para o gênero<sup>20</sup>. Algumas



**Figura 3.** Corte transversal do caule de *Polygonum persicaria* L. **A:** mostra seqüência de tecidos da região cortical. **B:** detalhe do sistema vascular. Seta indica calota fibrosa. **C e D:** detalhe de parênquima medular contendo amiloplastos e drusas. Escala de A e B: 50 µm, C e D: 25 µm.

vezes a nervação de espécies de *Polygonum* L. é classificada como uninérvea, observando-se nervura mediana proeminente e as nervuras secundárias pouco aparentes<sup>19</sup>. Mitchell<sup>20</sup> relata forma de folhas variando de linear a oval e ápice de emarginado a acuminado em algumas espécies aquáticas de *Polygonum* L. As folhas da espécie em estudo apresentaram-se lanceoladas e de ápice acuminado (Figura 1).

Células armazenadoras de água na face adaxial das folhas de *Polygonum persicaria* L. var. *biforme* (Wahlenberg) Fries, descritas por Scavone e Graeiro<sup>27</sup>, correspondem estruturalmente



**Figura 4.** Cromatograma em camada delgada do extrato a 10% em solução hidroetanólica a 70% de órgãos aéreos de *Polygonum persicaria* L. As aplicações da amostra e das substâncias de referência estão na seqüência da esquerda para a direita: 1= neoesperidina; 2= naringina; 3 e 4 = extrato; 5= diosmina; 6= naringenina; 7= quercetina; 8= rutina.

às células globosas observadas na mesma região, em nosso material de estudo (Figura 2 – C). Os testes histoquímicos empregados não permitiram determinar a natureza do conteúdo deste idioblasto. Tal estrutura é pouco freqüente no gênero<sup>17</sup>, não sendo observada em *Polygonum punctatum* Ell.<sup>20</sup>, o que a faz critério auxiliar na separação dessas espécies.

Diversas espécies de *Polygonum* L. apresentam-se anfiestomáticas, com estômatos freqüentemente paracíticos<sup>28</sup>. Em *Polygonum ferrugineum* Wedd e *P. meisnerianum* Cham. & Schldl. foram evidenciados apenas estômatos paracíticos e, em *P. hydropiperoides* Michaux e *P. punctatum* Ell., estômatos paracíticos acompanhados de raros anomocíticos. Scavone e Graeiro<sup>27</sup> relataram predomínio de estômatos paracíticos em *Polygonum persicaria* L. var. *biforme* (Wahlenberg) Fries, sem especificar os demais tipos encontrados. Em nosso estudo foram observados estômatos paracíticos, anisocíticos e anomocíticos, sendo mais numerosos os primeiros (Figura 2 – A).

Em folhas de *Polygonum persicaria* L. var. *biforme* (Wahlenberg) Fries foram observados tricomas glandulares capitados, constituídos de duas células secretoras centrais contornadas por oito células menores dispostas radialmente. No material em estudo foram encontrados tricomas glandulares pluricelulares providos de quatro a oito células secretoras (Figura 2 – B). A presença destes tricomas glandulares, associados aos tricomas tectores lignificados (Figura 2 – D) pode ser assumida como um caráter auxiliar na diferenciação da espécie.

O perfil cromatográfico em camada delgada do extrato hidroetanólico de *Polygonum persicaria* L. é importante parâmetro de identificação. Embora a cromatografia em camada delgada mostre-se técnica simples, rápida e muito útil na análise de fitoterápicos, na literatura não se encontra trabalho semelhante com espécies de *Polygonum* L. Em nosso estudo, optou-se empregar a fração flavonoídica, considerando a identificação de derivados de quercetina em *Polygonum persicaria* L.<sup>10</sup> A seqüência de manchas verificada no extrato hidroetanólico, bem como a coincidência com as substâncias de referência, rutina e quercetina, complementam a caracterização da droga vegetal constituída de órgãos aéreos da espécie.

Este estudo traz uma contribuição para o melhor conhecimento da droga vegetal sob o aspecto farmacognóstico. A descrição macroscópica e microscópica das folhas e do caule de *Polygonum persicaria* L., juntamente com o perfil cromatográfico em camada delgada fornecem parâmetros para o controle de qualidade da droga vegetal inteira ou fragmentada.

## REFERÊNCIAS

1. Almeida Alves, T.M. et al. Polygodial, the fungitoxic component from the Brazilian medicinal plant *Polygonum punctatum*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 96(6): 831-3, 2001.
2. Anderson, D.C., Siqueira-Batista, R., Quintas, L.E.M. 1998. Plantas Medicinais- do cultivo à terapêutica- 2ª edição, Editora Vozes, Petrópolis. *apud*: Lorenzi, H.; Matos, F.J.A. **Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. São Paulo: Instituto Plantarum, 2002. p.388-9.

3. Bagchi, D. et al. Benefits of resveratrol in women's health. **Drugs Exp. Clin. Res.**, 27(5-6): 233-48, 2001.
4. Barroso, G.M. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 1978. v.1, p.114-5.
5. Berlyn, G.P.; Miksche, J.P.; **Botanical microtechnique and cytochemistry**. Ames: Iowa State University Press, 1976. 326p.
6. Gattuso, S.J. Structure and ultrastructure of the secretory glands in the genus, *Polygonum* (L.), section *Persicaria* (Polygonaceae). **Biocell**, 25(3): 229-33, 2001.
7. Grenand, P., Moretti, C., Jacquemin, H. 1987. Pharmacopées Traditionnelles en Guyane: Créoles, Palikur, Wayâpi. Editorial 1-ORSTROM. Coll, Mem N°. 108. Paris, France. *apud*: Lorenzi, H.; Matos, F.J.A. **Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. São Paulo: Instituto Plantarum, 2002. p.388-9.
8. Harborne, J.B. **Phytochemical methods: a guide to modern techniques of plant analysis**. 2ed. New York: Chapman and Hall, 1984. p.75.
9. Hoehne, F.C. **Plantas e substâncias vegetais tóxicas e medicinais**. São Paulo: Departamento de Botânica do Estado, 1939. p.109.
10. Isobe, T.; Noda, Y.A. Chemotaxonomy study of flavonoids from Japanese *Polygonum* species. **Yakugaku Zasshi**, 107(12): 1001-04, 1987.
11. Johansen, D.A. **Plant microtechnique**. New York: Mc Graw-Hill, 1940. 523p.
12. Kapoor, S.I.; Sharna, P.C.; Kapoor, L.D. Epidermal and venation studies in the Indian species of *Polygonum* Linn (Polygonaceae)-I. **Bull. Bot. Surv. India**, 13(3-4): 244-59, 1971.
13. Kawasaki, M.; Kanomata, T.; Yoshitama, K. Flavonoids in the leaves of twenty-eight polygonaceous plant. **Bot. Mag.**, 99: 63-74, 1986.
14. Kismann, K.G.; Groth, D. **Plantas infestantes e nocivas**. São Paulo: BASF, 1991. v.3, p.311.
15. Kraus, J E; Arduin, M. **Manual Básico de Métodos em Morfologia vegetal**. Rio de Janeiro: Edur, 1997. 198p.
16. Latruffe, N. et al. Molecular analysis on the chemopreventive properties of resveratrol, a plant polyphenol microcomponent. **Int. J. Mol. Med.**, 10(6): 755-60, 2002.
17. Lerstern, N.R.; Curts, J.D. Foliar anatomy of *Polygonum* (Polygonaceae): survey of epidermal and selected internal structures. **Pl. Syst. Evol.**, 182: 71-106, 1992.
18. Lorenzi, H. **Plantas daninhas do Brasil**. 2º ed. Nova Ordessa: Plantarum, 1991. 444p.
19. Lorenzi, H.; Matos, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. São Paulo: Instituto Plantarum, 2002. p.388-9.
20. Mitchell, R.S. Comparative leaf structure of aquatic *Polygonum* species. **Amer. J. Bot.**, 58(4): 342-60, 1971.
21. Oliveira, F.; Akisue, G.; Akisue, M.K. **Farmacognosia**. São Paulo: Atheneu, 1998. p.35-8.
22. Panizza, S. **Plantas que curam: cheiro de mato**. São Paulo: IBRASA, 1998. 279p.
23. Peng, Z.F. et al. Antioxidant flavonoids from leaves of *Polygonum hydropiper* L. **Phytochemistry**, 62(2): 219-28, 2003.
24. Pio-Correa, M. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, 1969. v.4, p.51-3.
25. Rizzini, C.T. Sistematização terminológica da folha. **Rodriguesia**, 23(24): 193-212, 1960/61
26. Sass, J.E. **Botanical microtechnique**. 2 ed. Ames: Iowa State College Press, 1951. p.228.
27. Scavone O., Graeiro A., Contribuição ao estudo anatômico e fitoquímico do *Polygonum persicaria* L. var. *biforme* (Wahlenberg) Fries, Polygonaceae. **Rev. Farm. Bioquim. Univ. S. Paulo**, 8: 69-89, 1970.
28. Silva-Brambilla, M.G.; Mosqueta, I.S. Anatomia foliar de Polygonaceae (Angiospermae) da planície de inundação do alto rio Paraná. **Acta Scientiarum**, 23(2): 571-85, 2001.
29. Smolarz, H.D. Chromatographical analysis of phenolic acids in some species of *Polygonum* L. genus. Part 2. Quantitative determination of the major components by high performance liquid chromatography (HPLC). **Acta Soc. Bot. Pol.**, 69(1): 21-3, 2000.
30. Trease, G.E., Evans, W.C. **Pharmacognosy**. London: WB Saunders, 1996. 612p.
31. Yano, H. **Estudo Farmacognóstico e Farmacológico de *Polygonum persicaria* L**. São Paulo, 1999. [Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo].

# Validação de metodologia por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para análise de ácido fólico adicionado em farinhas de trigo e milho

## Determination of folic acid in enriched wheat and corn flour by means of high performance liquid chromatography

RIALA6/990

Juliana. A. LIMA<sup>2</sup>, Rodrigo R. CATHARINO<sup>1</sup>, Helena T. GODOY<sup>1\*</sup>

\* Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Caixa Postal 6121, 13083-970, Campinas, SP, Brasil  
e-mail: helena@fea.unicamp.br

<sup>2</sup> Centro de Ciências Exatas, Ambientais e de Tecnologias, Faculdade de Química, Pontifícia Universidade Católica de Campinas, Rod. D. Pedro I, Km 136, Parque das Universidades, Campinas, CEP 13086-900, SP, Brasil.

Recebido: 18/08/2003 – Aceito para publicação: 06/10/2004

### RESUMO

O enriquecimento de alimentos com ácido fólico tem se tornado uma prática comum em todo o mundo. Recentemente, no Brasil, a ANVISA publicou uma resolução (Resolução N°344) que obriga o enriquecimento de farinha de trigo e milho com essa vitamina. Dessa forma, metodologias analíticas capazes de avaliar ácido fólico nesses alimentos, tornam-se necessárias. O objetivo do trabalho foi a validação de uma metodologia para análise de ácido fólico em farinhas de trigo e milho enriquecidas, utilizando-se a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência. O ácido fólico foi extraído das farinhas com solução de hidróxido de potássio e acetonitrila. Seguiu-se a etapa de purificação com ácido tricloroacético. Para a etapa cromatográfica utilizou-se como fase móvel um sistema gradiente composto por solução acidificada/acetonitrila e coluna de C<sub>18</sub> para separação e eluição da vitamina. A detecção foi feita a 290nm e a quantificação por padronização externa. A metodologia mostrou-se eficiente com taxas de recuperação entre 92 e 98%, boa repetibilidade (CV 0,60 a 0,98%) e limites de detecção e quantificação de 1,3ng/g e 2,6ng/g, respectivamente.

**Palavras-Chave.** ácido fólico, cromatografia líquida de alta eficiência, farinha de trigo, farinha de milho.

### ABSTRACT

Enrichment of foods with folic acid has turned out to be a common practice around the world. Recently, in Brazil, the National Agency for Sanitary Surveillance (ANVISA) has brought into public notice a resolution on mandatory enrichment of wheat and corn flour with folic acid. In the face of this, reliable analytical methodologies for to determinate folic acid in flours have to be established and standardized. The aim of the present study was to validate a methodology for folic acid analyses in enriched wheat and corn flour carried out by High Performance Liquid Chromatography. Folic acid was extracted from the flours using potassium hydroxide solution and acetonitrile. The extract was purified with trichloroacetic acid. For chromatographic separation a gradient system composed by acid solution/acetonitrile was used as mobile phase, and a C<sub>18</sub> column was employed for vitamin separation and elution. Folic acid detection was made at 290nm and its quantification was performed by external standardization. The evaluated method was efficient being the recovery rates between 92 and 98%; the method presented good repeatability (CV 0.60 to 0.98%), and detection and quantification limits were 1.3ng/g and 1.6ng/g, respectively.

**Key Words.** folic acid, high performance liquid chromatography, wheat flour, corn flour

## INTRODUÇÃO

Os cientistas, hoje, estão convencidos que o ácido fólico é indispensável à dieta humana e animal, sendo considerado como a “vitamina do futuro”. O ácido fólico está amplamente distribuído nos alimentos, principalmente em verduras frescas, fígado, leveduras e algumas frutas<sup>15,16</sup>, no entanto, nos dias atuais, a ingestão de uma dieta insuficiente em folatos tem levado à deficiência dessa vitamina<sup>28</sup>.

Um dos possíveis efeitos diretamente ligados a dietas carentes de ácido fólico, e que tem surtido repercussão mundial, são as malformações congênitas com destaque para os defeitos no tubo neural de fetos, como a espinha bífida e a mielomeningocele, por exemplo<sup>10,11,19</sup>. A preocupação com a carência de ácido fólico na alimentação de gestantes é tão grande nos EUA, que em 1998 foi criada uma campanha nacional de incentivo à ingestão de ácido fólico, cujo principal objetivo é a redução das malformações congênitas<sup>26</sup>. Com esse mesmo propósito, um grande estudo epidemiológico está sendo realizado no Chile, onde a vitamina está sendo adicionada à farinha de trigo destinada à fabricação de pães (220µg/100g) e o consumo desse alimento enriquecido está sendo relacionado com a incidência de malformações congênitas daquele país<sup>5,8,18</sup>.

Além disso, muitos estudos sugerem que o ácido fólico atua na prevenção de diversos tipos de câncer, anemia e doenças cardíacas<sup>2,9,10,12, 20,24,28,29,32</sup>.

A indústria brasileira vem promovendo um grande aumento do emprego de vitaminas para o enriquecimento de vários alimentos<sup>4</sup>, entre elas, o ácido fólico. Sem dúvida, o processo de enriquecimento aumenta a qualidade dos alimentos e pode vir a ser uma das soluções empregadas para resolver o problema da ingestão insuficiente de ácido fólico<sup>7,14,25,28,31</sup>. São escolhidos preferencialmente os alimentos destinados ao público infantil e gestantes para o enriquecimento com esta vitamina. A ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária)<sup>1</sup> divulgou uma resolução (Resolução 344 de 13 de dezembro de 2002) que determina que as indústrias de farinhas de trigo e de milho devem adicionar aos seus produtos 150µg de ácido fólico a cada 100g de farinha.

Em vários países está sendo realizado o enriquecimento de farinhas, entretanto os níveis de enriquecimento são um pouco diferentes. Estados Unidos, Canadá, Bolívia e Colômbia, por exemplo, utilizam 150µg de ácido fólico a cada 100g de farinha, já o Paraguai e o Equador adicionam 300µg e 60µg de ácido fólico a cada 100g de farinha, respectivamente<sup>13</sup>.

Embora cada vez mais aumente o número de alimentos que estão sendo enriquecidos com ácido fólico, o controle desses produtos é bastante dificultado pela ausência de metodologias rápidas, eficientes e adequadas. O método oficial<sup>10</sup> para a determinação de ácido fólico e folatos em alimentos é um método microbiológico, utilizando *Lactobacillus casei*, que apresenta muitos inconvenientes, como baixa precisão, lentidão na análise e exatidão questionável<sup>16,17</sup>. Recentemente, a literatura vem apresentando avanços nos métodos para a determinação

dessa vitamina, através de técnicas como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em função de sua rapidez, alta sensibilidade, precisão e exatidão<sup>16,17,27,30</sup>. A aplicação de CLAE na determinação de ácido fólico em alimentos ocorre de forma rápida, geralmente dependendo da otimização da extração da amostra, da purificação e dos métodos de detecção para cada tipo de análise requerida. Entretanto, a grande maioria dos métodos por CLAE encontrados na literatura internacional, incluem a etapa de extração complexa e demorada<sup>16,17</sup>.

Métodos de extração em fase sólida utilizando colunas de troca iônica compostas por amina quaternária (SAX) foram largamente utilizados nos últimos anos, tanto para purificação como concentração de folatos e ácido fólico, além de etapas prévias de hidrólise enzimática<sup>22,27</sup>.

Para a etapa cromatográfica fases móveis tamponadas, principalmente tampão fosfato, com ou sem modificador orgânico, foram utilizadas por Konnings<sup>22</sup> e Osseyi et al<sup>27</sup>. As colunas mais utilizadas para a separação de ácido fólico foram as de fase reversa de octadecilsilano (C<sub>18</sub>)<sup>22,30</sup>. O perfil do espectro de absorção obtido no detector de arranjo de diodos (DAD), além do tempo de retenção e da co-cromatografia, foram utilizados por Konnings<sup>22</sup>, para identificação dos folatos. Osseyi et al.<sup>27</sup> e Konnings<sup>22</sup> fizeram a quantificação através da construção de curvas analíticas por padronização externa, utilizando a área ou a altura dos picos.

No caso especial de farinhas poucos trabalhos foram encontrados na literatura. Estudos realizados por Keagy et al.<sup>21</sup> com o objetivo de avaliar o comportamento de folatos e ácido fólico durante o período de armazenamento da farinha de trigo, conduzido com a aplicação de método microbiológico, utilizando temperaturas entre 26 e 50°C e ausência de luz, indicaram perdas de 40% no teor de folatos após 12 semanas de estocagem, valor que permaneceu inalterado após 52 semanas. Os mesmos autores verificaram que farinhas fortificadas com ácido fólico (100 a 500µg/100g), tiveram altas taxas de retenção da vitamina, com baixas perdas, nas mesmas condições. Essas diferenças podem ser atribuídas, segundo ao autores, a maior instabilidade de folatos naturalmente presentes em alimentos, quando comparados ao ácido fólico adicionado. Lima et al.<sup>23</sup> avaliaram o efeito do processo de assamento de pães confeccionados com farinha de trigo enriquecida e determinaram 10% de perdas, utilizando método por CLAE. Para farinha de milho nenhum dado foi encontrado na literatura.

Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi a validação da metodologia por cromatografia líquida de alta eficiência, desenvolvida por Catharino et al.<sup>6</sup>, para a determinação de ácido fólico em farinhas de trigo e milho enriquecidas.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material

Para a determinação da recuperação, repetibilidade e limites de detecção e quantificação, as farinhas de trigo e milho



comuns foram adquiridas em estabelecimentos comerciais de Campinas, já que o produto enriquecido ainda não estava disponível no mercado na época da realização deste estudo. Para o enriquecimento, em laboratório, foi escolhida uma marca apenas, para cada tipo de farinha. As farinhas foram analisadas para comprovar a ausência de ácido fólico e interferentes, antes do processo de enriquecimento.

As determinações foram realizadas em duplicatas, sendo o resultado final a média de 4 valores, já que as injeções de cada extrato no cromatógrafo também foram feitas em duplicatas.

### Reagentes

O padrão de ácido fólico foi gentilmente cedido pela MCassab Comércio e Indústria Ltda -SP (Sigma cód. F-7876, lote 40H321). Os demais reagentes foram de grau analítico. A água utilizada para o preparo das fases móveis foi purificada no sistema Milli-Q (Millipore). As fases móveis, antes de serem utilizadas, foram filtradas em filtros Millipore (HAWP e HVLP 04700), com poros de 0,45µm de diâmetro.

### Equipamento

Utilizou-se um cromatógrafo Hewlett Packard (HP) série 1100, com injetor automático com capacidade de 1 a 100µL, desgaseificador, bomba quaternária, equipado com detector de arranjo de diodos. O sistema foi controlado pelo software HP-Chemstation, que permitiu análise da pureza do pico de interesse e o melhor tratamento dos dados. As colunas Microsorb-MV, ODS-2, 5µm, 150X4,6mm d.i. (Raimin Instrument Company) e Nova Pak, ODS-2, 4µm, 150X2mm (Waters) foram utilizadas para o processo de separação cromatográfica, nas determinações de ácido fólico em farinha de trigo e farinha de milho, respectivamente, protegidas por uma coluna de guarda Bondesil C<sub>18</sub>, 5µm, 10X4,6mm d.i (Varian).

### Determinação do ácido fólico

Para a análise do ácido fólico nas farinhas de trigo e milho enriquecidas utilizou-se a metodologia desenvolvida por Catharino et al.<sup>6</sup>, adaptada para as matrizes analisadas nesse trabalho. O ácido fólico foi extraído, de 1,0g de farinha previamente homogeneizada, com 3,0mL de hidróxido de potássio (0,1mol/L) e 1,0mL de acetonitrila, por 10 minutos em banho de ultra-som. No método original, a etapa de extração, para essa mesma determinação em leites, é feita apenas com hidróxido de potássio, os demais processos envolvidos na análise são exatamente os mesmos, conforme descrito a seguir. O extrato foi transferido quantitativamente para um balão volumétrico de 10mL, adicionando-se 2,0mL de ácido fosfórico (0,1mol/L), 3,0mL de tampão fosfato, composto por Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,25mol/L)/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,37mol/L), a pH neutro, e 500µL de ácido tricloroacético (TCA) (90%), aferindo-se o volume final com tampão fosfato. Seguiram-se então as etapas de filtração, a primeira em papel de filtro comum e a outra em membrana Durapore (HAWP01300 Millipore), com poros de 0,45µm. O filtrado foi injetado, imediatamente, no cromatógrafo a líquido (100µL).

O ácido fólico foi separado em sistema de eluição por gradiente, com 90% de solução acidificada (SA: 0,166mol/L de ácido acético e 0,01mol/L de hidróxido de potássio, a pH 2,8), e 10% de acetonitrila (ACN)(v/v) no início da corrida, chegando em 8,5 minutos a 76% de SA e 24% de ACN a uma vazão de 0,5ml/min. As condições iniciais foram retomadas e a coluna re-equilibrada durante 10 minutos, antes da próxima injeção. A detecção foi feita em detector de arranjo de diodos (DAD), utilizando-se o comprimento de onda de leitura a 290nm. A identificação da vitamina foi feita por comparação dos tempos de retenção, obtidos com padrão de ácido fólico analisado nas mesmas condições, co-cromatografia e pela comparação dos espectros de absorção obtidos no DAD. A pureza do pico foi determinada pelo sistema ploter disponível no software HP-Chemstation. A quantificação do ácido fólico foi feita por padronização externa, através da curva analítica construída com 7 níveis de concentração do padrão dissolvido diretamente em tampão fosfato (0,01; 0,05; 0,10; 0,15; 0,30; 0,50; 1µg/mL), sendo cada ponto representado pela média de três determinações.

### Validação da metodologia

Para a validação da metodologia foram realizados testes de recuperação e repetibilidade, além do estabelecimento dos limites de detecção e quantificação para as matrizes analisadas nesse trabalho, já que a metodologia foi aplicada à matrizes diferentes e, portanto, sofreu algumas modificações em relação ao método original desenvolvido para leites.

### Recuperação de Padrões

Para a avaliação da exatidão do método, realizou-se testes de recuperação de padrões adicionados às farinhas de trigo e milho, não enriquecidas, em dois níveis diferentes de concentração 170 e 250µg/100g. Os teores foram baseados no projeto que está sendo desenvolvido no Chile, 220µg de ácido fólico para cada 100g de farinha de trigo<sup>5, 8, 18</sup> Para as análises foi utilizado 1,0g das farinhas de trigo e milho.

### Repetibilidade

A avaliação desse parâmetro foi realizada através de cinco determinações, em dois níveis de concentração de ácido fólico adicionado às matrizes. A repetibilidade foi calculada de acordo com Caulcutt e Boddy<sup>3</sup> através da equação:

$$r = t\sqrt{2.sr} \quad r = \text{repetibilidade}$$

sr = estimativa do desvio padrão  
t = t de Student

### Limites de Detecção e Quantificação

Os limites de detecção foram estimados pela adição de quantidades conhecidas de padrão às amostras. Foi considerado o limite de detecção a menor quantidade detectável na matriz que produziu um sinal com uma amplitude três vezes maior que

a do ruído (3S/R). O limite de quantificação foi considerado como sendo duas vezes o limite de detecção<sup>15</sup>.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os cromatogramas referentes a determinação de ácido fólico em amostras de farinha de trigo e milho estão apresentados na Figura 1. Neles, o pico do ácido fólico aparece isolado, com tempo de retenção de 7,9 minutos para a determinação em farinha de trigo e 8,3 minutos em farinha de milho, já que foram utilizadas colunas diferentes. A pureza dos picos foi verificada através dos parâmetros de pureza, fornecidos pelo software HP-Chemstation, que confirmou a eficiência do sistema cromatográfico.

O teor de ácido fólico foi avaliado por padronização externa, tendo a curva analítica apresentado boa linearidade nas faixas de concentração pré-estabelecidas, com coeficiente de correlação de 0,9997 (Figura 2).

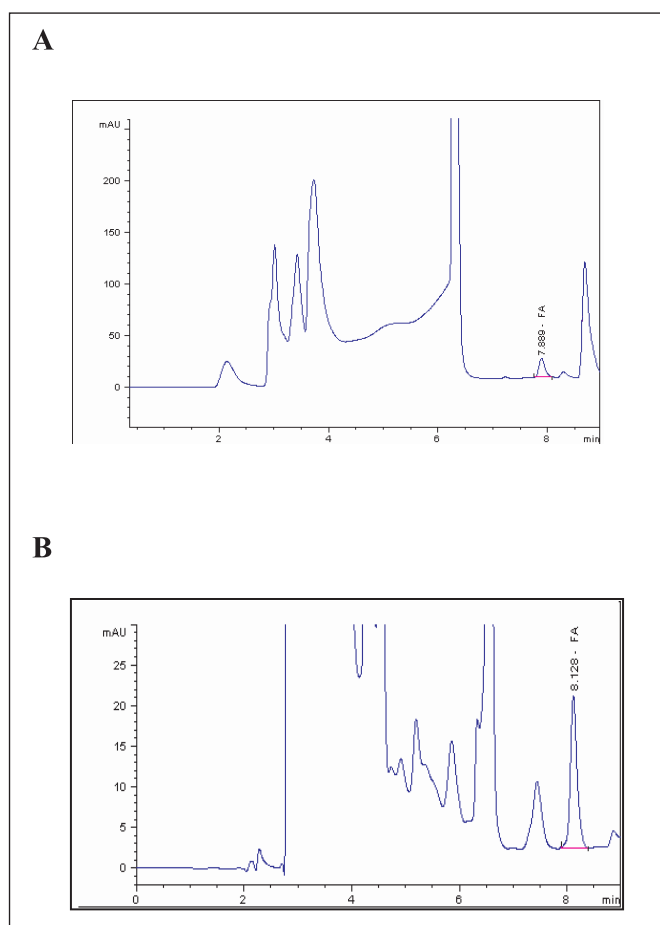
As taxas de recuperação obtidas estão apresentadas na Tabela 1. Os valores variaram entre 95 e 97% nos dois níveis de enriquecimento. As taxas de recuperação obtidas neste trabalho são superiores ao valor relatado por Konings<sup>22</sup> que obteve níveis de recuperação de folatos de 90% para farinha e Osseyi et al<sup>27</sup> que relataram taxas de recuperação de 93 a 96% para a determinação de ácido fólico em cereais matinais. Esses valores indicam uma boa taxa de recuperação para os níveis vitamínicos presentes no produto enriquecido analisado.

A Tabela 2 apresenta as faixas de repetibilidade esperadas entre cinco determinações, em duplicata, em dois diferentes níveis de concentração de ácido fólico, para os dois tipos de farinhas. Desta forma, espera-se que valores fornecidos por determinações em duplicata difiram dentro dos limites fornecidos pela repetibilidade, com a confiança indicada. Observou-se que a maior diferença entre os valores obtidos nas 5 determinações, nos dois níveis de enriquecimento, é menor que o valor de “r” calculado, comprovando a boa repetibilidade do método, quando aplicado às matrizes estudadas neste trabalho.

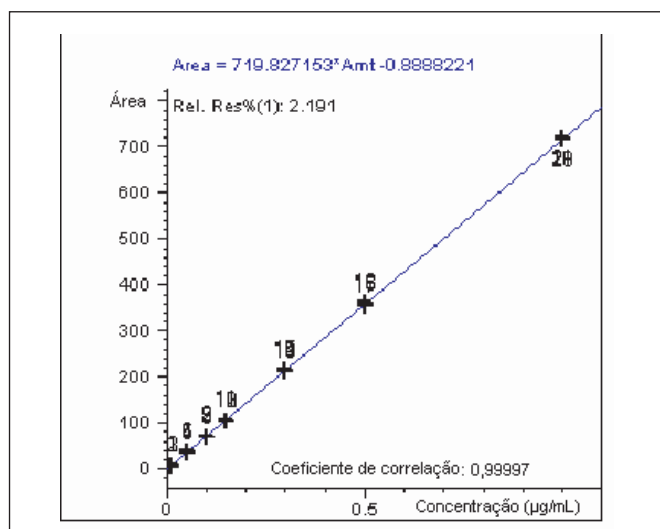
O limite de detecção para ácido fólico em farinhas de trigo e milho foi 1,3ng/g, e, portanto, o limite de quantificação foi 2,6ng/g. Os valores foram os mesmos obtidos por Catharino et al.<sup>6</sup> que determinaram esses parâmetros em leite enriquecido e Konings<sup>22</sup> que avaliou folatos em vegetais, leite enriquecido, fígado e farinha.

## CONCLUSÕES

Pôde-se concluir que a metodologia por cromatografia líquida de alta eficiência aplicada neste trabalho, se mostrou bastante satisfatória e pode ser utilizada para análises de rotina de determinação de ácido fólico em farinhas de trigo e milho enriquecidas.



**Figura 1.** Perfil cromatográfico do extrato de farinha de trigo (A) e milho (B) enriquecidas com ácido fólico. Coluna Microsorb-MV, ODS-2, 5µm, 150X4,6mm (A) e Nova pak, ODS-2, 4µm, 150X2mm (B). Fase móvel: 10% de acetonitrila e 90% de solução acidificada (0,166mol/L) no início da corrida, chegando em 8,5 minutos a 24% de acetonitrila e 76% de solução acidificada (0,166mol/L) (v/v), mantendo-se as condições até 9,0 minutos. Vazão de 0,5mL/minuto. Detecção a 290nm.



**Figura 2.** Curva analítica do ácido fólico obtida por padronização externa, traçada com média de triplicatas.

**Tabela 1.** Taxas de recuperação do padrão de ácido fólico adicionado em dois diferentes níveis de concentração às farinhas de trigo e milho

| Produto          | Nível I (µg/g) | Recuperação (%) | Nível II (µg/g) | Recuperação (%) |
|------------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Farinha de milho | 1,7            | 96 ± 1          | 2,5             | 97 ± 1          |
| Farinha de trigo | 1,7            | 95 ± 1          | 2,5             | 97 ± 1          |

Os resultados são médias de 10 determinações.

**Tabela 2.** Repetibilidade do ácido fólico adicionado às farinhas de trigo e milho em 2 diferentes níveis de concentração

| Alimento            | Concentração Nível I (µg/g) | Repetibilidade (r) | Concentração Nível II (µg/g) | Repetibilidade (r) |
|---------------------|-----------------------------|--------------------|------------------------------|--------------------|
| Farinha de trigo    | 2,027                       | 0,60               | 1,691                        | 0,47               |
|                     | 2,046                       |                    | 1,691                        |                    |
|                     | 2,081                       |                    | 1,658                        |                    |
|                     | 2,049                       |                    | 1,672                        |                    |
|                     | 2,021                       |                    | 1,682                        |                    |
| *Média dos valores  | 2,05 ± 0,02                 |                    | 1,68 ± 0,01                  | 0,60%              |
| Farinha de milho    | 8,045                       | 2,64               | 6,543                        | 0,88               |
|                     | 8,037                       |                    | 6,535                        |                    |
|                     | 8,087                       |                    | 6,565                        |                    |
|                     | 8,046                       |                    | 6,589                        |                    |
|                     | 8,068                       |                    | 6,567                        |                    |
| * Média dos valores | 7,86 ± 0,45                 |                    | 6,58 ± 0,05                  | 0,76%              |

Limite de confiança de 95% (t=2,78)

\* Média dos valores: valor médio, estimativa do desvio padrão, coeficiente de variação (%).

Sugere-se que sejam realizados estudos que avaliem o comportamento da vitamina durante o período de estocagem de farinhas enriquecidas, já que esses produtos apresentam um grande prazo de validade, além de trabalhos que avaliem a estabilidade da vitamina adicionada a esses produtos após a fabricação de pães, mingaus, bolos, entre outros, já que essas farinhas são consumidas após processamento doméstico e/ou industrial.

## REFERÊNCIAS

1. Anvisa - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. [www.anvisa.org.br](http://www.anvisa.org.br). Consulta em 20/04/2004.
2. Brody, T. Folic acid In: Machlin, L. J. **Handbook of vitamins**. 2ed. Revised and Expanded. New York: Marcel Dekker Inc.; 1994. 595 p.
3. Caulcutt, R.; Brody, R. **Statistic for Analytical Chemists**. 1st. Chapman and Hall, Londres; 1983. 253p.
4. Carvalho, P. R. N. **Enriquecimento de Alimentos**. Primeiro seminário brasileiro de alimentos enriquecidos. Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 1994. p. 1-7.
5. Castilla, E. E. et al. ECLAMC Informs. **Frontiers in Fetal Health** 2(7):4-23, 2000. [www.sickkids.on.ca/ FrontiersinFetalHealth/ FFHJanuary2001.asp#Pastuszak](http://www.sickkids.on.ca/FrontiersinFetalHealth/FFHJanuary2001.asp#Pastuszak). Consulta em 10/03/2004.
6. Catharino, R. R.; Godoy, H. T. Avaliação das condições experimentais de CLAE na determinação de ácido fólico em leites enriquecidos. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, 23(3):389-95, 2003.
7. Cort, W. M. et al. Nutrient stability of fortified cereal products. **Food Techn.** 30: 52-62, 1976.
8. Cortes, F. et al. Impact of wheat flour fortification with folic acid on preservation of neural tube defects (NTD) in Chile. 2001.<http://mail.medacad.or/www.ichg2001.org/abstracts/services.htm>. Consulta em 10/03/2004.
9. Crane, N. T. et al. Evaluating food fortification options: general principles revisited with folic acid. **Am. J. Pub. Health** 85(5): 660-6, 1995.
10. Cunniff, P. (Ed) **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 17 ed. AOAC International, Gaithersburg, Maryland; 1997. p. 45.1 – 45.69.
11. Daly, S. et al. Minimum effective dose of folic acid for food fortification to prevent neural-tube defects. **Lancet**, 350(9092): 1666-9, 1997.
12. Devlin, T. M. **Manual de Bioquímica com correlações clínicas**. 1ed. Ed. Edgard Blücher; 1997. 1007p.
13. Flour Fortification. [www.emro.who.int/nfs/FlourFortification.htm](http://www.emro.who.int/nfs/FlourFortification.htm). Consulta em 10/02/2004.
14. Gassin, A. L. Aspects réglementaires de l'enrichissement en France et en Europe. **Cah. Nutrition diétics**, 26(1): 85-8, 1991.
15. Green, J.M. A practical Guide to Analytical Method Validation. **Anal. Chem.** 68: 1197-1203, 1996.
16. Gregory III, J. F. Chemical and nutritional aspects of folate research: analytical procedures, methods of folate synthesis, stability, and bioavailability of dietary folates. **Adv. Food Nutr. Res.**, 33: 1-101, 1989.
17. Hawkes, J. G.; Villota, R. Foliates in Foods: reactivity, stability during processing, and nutritional implications. **Food Sci. Nutr.**, 28(6): 439-538, 1989.

18. Hirsch, S. et al. The Chilean Flour Folic Acid Fortification Program Reduces Serum Homocysteine Levels and Masks Vitamin B<sub>12</sub> Deficiency in Elderly People. **J. Nutr.**, 132: 289-91, 2002.
19. Iwatani, Y.; Arcot, J.; Shrestha, A. K., Determination of folate contents in some Australian vegetables. **J. Food Comp. Anal.**, 16: 37-48, 2003.
20. Katzung, B. G. **Farmacologia básica e clínica**. 5ed. São Paulo: Guanabara Koogans; 1994. 755p.
21. Keagy, P. M.; Stokstad, L. R.; Fellers, D. A. Folacin stability during bread processing and family flour storage. **Cereal Chem.**, 52: 348-56, 1975.
22. Konings, E. J. M. A validated liquid chromatographic method for determining folates in vegetables, milk powder, liver and flour. **J. AOAC Int.**, 82(1): 119-27, 1999.
23. Lima, J.A.; Catharino, R.R.; Godoy, H.T. HPLC methodology for folic acid determination in enriched wheat flour and bread. **Tec. Molitoria Intern.**, 55: 151-8, 2004.
24. Malinow, M. R. et al. Reduction of plasma homocyst(e)ine levels by breakfast cereal fortified with folic acid in patients with coronary disease. **New Engl. J. Med.**, 338(15): 1009-15, 1998.
25. Maxwell, D. P. E. Cost-control implications of nutrients fortification. **Prep. Food** 87-8, 1990.
26. Moshfegh, A. J. et al. **Folate intakes**. Food Surv. Res. Group. BHNRC, ARS, USDA, Riverdale, MD, USA. 1998.
27. Osseyi, E.S.; Wehling, R.L.; Albrecht, J.A. Liquid Chromatographic Method for Determining Added Folic Acid in Fortified Cereal Products. **J. Chromatogr. A**, 826(2): 235-40, 1998.
28. Ranum, P. Cereal enrichment. In: **Handbook of Cereals Science and Technology**. Ed. Lowrenz, New York, 1991, p.882.
29. Tsai, M. Y. et al. Genetic cause of mild hiperhomocysteinemia in patients with premature occlusive coronary artery disease. **Atherosc.** 143: 163-165, 1999.
30. Vahteristo, L.T.; Ollilainen, V.; Varo, P. Liquid chromatographic determination of folate monoglutamates in fish, meat, egg and dairy products consumed in Finland. **J. AOAC Int.**, 80 (2), 373-8, 1997.
31. Walter, P. Vitamin requirements and enrichment of foods. **Food Chem.** 49: 113-117, 1994.
32. Willcox, J.K.; Catignani, G.L.; Lazarus, S. Tomatoes and cardiovascular health. *Critical Reviews in Food Sci. Nutr.*, 43(1): 1-18, 2003.

# Teor de vitamina A em leites tipo C fortificados na cidade de São Paulo

## Determination of vitamin A concentration in enriched type C milk in São Paulo city/Brazil

RIALA6/991

Leda C. A. LAMARDO; Monica STOFER; Sandra A. NAVAS; Emiko I. INOMATA; Fernando S. FONSECA; Rosana Lisboa SANTANA, Janete ALABURDA; Myrna SABINO

\* Endereço para correspondência: Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr. Arnaldo, 355 - São Paulo- SP, Brasil. CEP 01246-902 - Seção de Química Biológica, Divisão de Bromatologia e Química

### RESUMO

A ausência de vitamina A na alimentação provoca cegueira noturna, baixo crescimento, atrofia dos tecidos dos olhos e epiteliais. Por outro lado, o excesso dessa vitamina tem efeito tóxico. Nos países industrializados a adição de vitaminas e minerais aos produtos alimentícios é prática comum para evitar a deficiência desses micronutrientes. O objetivo deste trabalho foi determinar o teor de vitamina A em leite tipo C fortificado e consumido pela população infantil de comunidades carentes da cidade de São Paulo, para verificar o cumprimento do valor declarado no rótulo das embalagens. Foram analisadas 676 amostras enviadas para análise no Instituto Adolfo Lutz, no período de fevereiro de 2001 a junho de 2004, utilizando a técnica espectrofotométrica. Os teores de vitamina A estavam abaixo do declarado em apenas 20 amostras (3%), de acordo com o declarado em 325 (48%) e acima do declarado em 331 (49%).

**Palavras-Chave.** vitamina A; leite pasteurizado; retinol; hipovitaminose A; espectrofotometria.

### ABSTRACT

Vitamin A deficiency may cause night blindness, development and growth retardation, atrophy of eye tissues and of skin epithelial cells. On the other hand, the excess of vitamin A may produce toxicity symptoms. In the developed countries the supplementation of foods with vitamins and minerals has been a usual practice to avoid the deficit of these nutrients. The aim of the present investigation was to evaluate the vitamin A concentrations in milk samples sold in São Paulo city, SP-Brazil, and to verify whether the obtained results were in accordance with the values described in the label of respective products container. Vitamin A was analyzed in milk samples by means spectrophotometry method. Of 676 analyzed samples, 3% (20 samples) had vitamin A concentration in below level comparing to the value indicated in the label., 48% (325 samples) were in accordance with, and 49% (331 samples) presented higher level.

**Key Words.** vitamin A; milk; fortified milk; vitamin supplementation; spectrophotometry method.

### INTRODUÇÃO

A vitamina A, uma vitamina lipossolúvel também conhecida como retinol, participa de uma série de funções biológicas e que, por não ser sintetizada no organismo, deve ser fornecida pela dieta<sup>1,3</sup>. Desempenha importante papel em diversos processos vitais, atuando na manutenção da visão, na integridade do sistema imunológico, na formação e manutenção do tecido epitelial e das estruturas ósseas e dentes, na diferenciação e proliferação celular, na reprodução e no

crescimento<sup>7</sup>. Ainda, alguns estudos sugerem que a vitamina A é também essencial para a eritropoiese<sup>5,9</sup> e que ela tem efeito antioxidante<sup>7</sup>. A ingestão insuficiente de vitamina A ou de seus precursores, durante um período expressivo, pode originar diversas anormalidades. Por outro lado, o uso prolongado de grandes doses de vitamina A pode ser prejudicial ao organismo, causando lesões hepáticas, anomalias ósseas, alopecia, diplopia, náuseas, vômitos, diarreia, tonturas e cefaléia<sup>10</sup>.

A deficiência de vitamina A é um dos problemas nutricionais mais frequentes no mundo, atingindo 60 países na Ásia, Oriente

Médio, África e América Central e do Sul. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que mais de 250 milhões de crianças em todo o planeta tem suas reservas diminuídas de vitamina A<sup>6</sup>. Prevalência elevada desta carência é encontrada em crianças pré-escolares e em mulheres grávidas e lactantes. As estimativas mundiais indicam que 5 a 6 milhões de crianças apresentam manifestações visíveis (clínicas, fisiológicas ou funcionais) de deficiência de vitamina A. Ainda, estima-se que 1,5 a 2,5 milhões de mortes poderiam ser evitadas a cada ano no grupo de pessoas que têm reservas inadequadas desta vitamina<sup>4,5</sup>.

No Brasil a deficiência de vitamina A é um problema endêmico em grandes áreas das regiões Norte, Nordeste e Sudeste<sup>7</sup>. O Brasil está incluído entre os países onde a hipovitaminose A é considerada como grave, sendo classificado pela (OMS) e pela Organização Panamericana de Saúde (OPAS) como área de carência subclínica grave<sup>12</sup>. No Brasil a deficiência desta vitamina está relacionada com muitas mortes por diarreia<sup>11</sup>.

A erradicação ou mesmo a diminuição das taxas de carência de vitamina A tem grande impacto social e econômico, já que o custo do problema é maior do que o gasto com programas de intervenção. Alimentos fortificados com vitaminas e micronutrientes essenciais são de grande utilidade para combater as deficiências nutricionais que padecem um elevado percentual da população mundial, porém é importante um controle destes produtos, pois tanto a ingestão deficiente quanto a superdosagem na fortificação são malélicas ao ser humano.

O presente trabalho teve como objetivos avaliar o teor de vitamina A em amostras de leite pasteurizado tipo C fortificados, consumidos pela população da cidade de São Paulo e fornecer subsídios para os programas que fornecem leite para a população carente poderem controlar o teor de vitamina A adicionada.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material

Foram analisadas 676 amostras de leite pasteurizado enriquecidos, tipo C, coletadas em embalagem original de 1 litro, de dezoito cooperativas produtoras, consumidos na cidade de São Paulo, no período de fevereiro de 2001 a junho de 2004. As amostras foram mantidas sob refrigeração até o momento da análise.

### Metodologia

As amostras de leite foram mantidas à temperatura ambiente até atingirem o equilíbrio térmico e homogeneizadas na própria embalagem. Utilizando uma pipeta volumétrica, foram coletados 20 mL de leite, os quais foram saponificados com KOH etanólico a 80°C e a vitamina A foi extraída por partição com éter de petróleo<sup>8</sup>. A quantificação foi realizada segundo o método oficial da Association of Official Analytical Chemists (AOAC)<sup>2</sup>, utilizando espectrofotometria na região do visível (620 nm), como solvente clorofórmio e reagente Carr Price (tricloreto de antimônio em clorofórmio).

## RESULTADOS

Os resultados dos teores de vitamina A das 676 amostras analisadas estão apresentados na Figura 1. Os resultados foram agrupados em de acordo, abaixo e acima do valor declarado. Os resultados considerados de acordo correspondem ao intervalo de 80 a 120% do valor declarado no rótulo das embalagens, que é 120 µg de RE/200mL (ou 400 UI/200 mL). Os valores denominados abaixo e acima correspondem as faixas inferior a 80% e superior a 120% do valor declarado, respectivamente.

As amostras analisadas foram provenientes de dezoito cooperativas produtoras. Na Figura 2 está representada a porcentagem de amostras analisadas segundo a sua procedência, sendo que a denominação outros corresponde ao

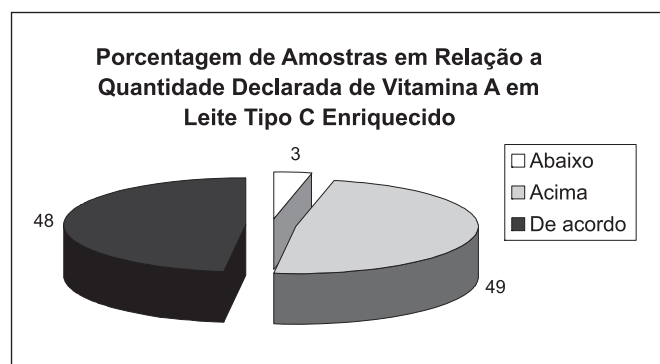


Figura 1. Teores de vitamina A nas amostras de leite pasteurizado enriquecido, tipo C.

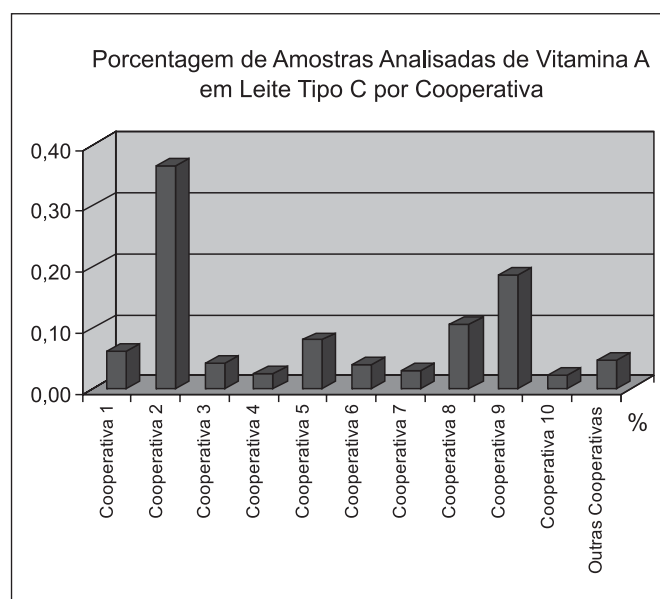


Figura 2. Porcentagem de amostras analisadas segundo a cooperativa produtora.

grupo de 8 cooperativas que tiveram de uma a oito amostras de leite analisadas.

Os valores médio e seus respectivos desvios padrão para os teores de vitamina A observados nas amostras de leite analisadas das diferentes cooperativas produtoras estão apresentados na Tabela 1, onde os resultados obtidos para os teores de vitamina A estão agrupados em de acordo, abaixo e acima do ideal, para as amostras de leite analisadas segundo a cooperativa produtora.

## DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

O método colorimétrico utilizado neste trabalho foi o método da AOAC<sup>2</sup>, o qual é aplicado para a análise de rações e de alguns tipos de alimentos como margarina e manteiga, não sendo recomendado para produtos que contenham pró-vitamina A (carotenos) como principal fonte de vitamina A e tão pouco para concentrados vitamínicos. Este método se baseia na determinação da intensidade da cor azul resultante da reação de vitamina A com o tricloreto de antimônio (Reagente de Carr Price). As absorvâncias<sup>11</sup> do trans retinil, dos isômeros cis de retinol e dos estéres de retinila são medidas a 620 nm. Outros compostos, como retinaldeído, desidroretinol e similares, absorvem em comprimento de onda maior, enquanto que os carotenóides, que reagem com o cloreto de antimônio com menor velocidade, absorvem em comprimento de onda menor<sup>13</sup>.

Apesar das desvantagens no uso do reagente de Carr Price, tais como reagente perigoso, instabilidade do complexo formado (vitamina A/SbCl<sub>3</sub>), os resultados obtidos em nosso laboratório em testes de proficiência (Food Analysis Performance Assesment Scheme(CSL/UK)/FAPAS, Tabela de Composição de Alimentos/TACO) têm sido satisfatórios.

Foram analisadas 676 amostras de leite pasteurizado enriquecidos, tipo C, provenientes de dezoito cooperativas

produtoras, sendo que somente duas cooperativas contribuíram com cerca de 50% das amostras (Figura 2). Desta forma, foi possível uma avaliação geral dos leites produzidos pelas várias cooperativas produtoras de leite que abastecem a Região Metropolitana da Grande São Paulo.

Analisando a Figura 1, pode-se verificar uma baixa porcentagem de amostras (3%) que apresentaram teores de vitamina A abaixo de 80% do declarado no rótulo, isto é, 20 amostras com valores inferiores a 96µgRE/200mL. Porém, este resultado não é preocupante, uma vez que os valores médios de concentração de vitamina A encontrada nas amostras analisadas nunca foi inferior ao valor ideal de fortificação, 120µgRE/200mL, como pode ser verificado a partir dos valores apresentados na Tabela 1.

A partir da Figura 1, pode-se notar que a maioria das amostras analisadas estavam de acordo com o valor declarado (120µgRE/200mL) ou acima deste valor (<144µgRE/200mL), mesmo considerando a variação no teor de vitamina A representada pelo coeficiente de variação (Tabela 1), de forma que estas amostras de leite garantiram a suplementação nos valores recomendados de vitamina A.

O número de amostras com teores acima do declarado foi praticamente igual ao número de amostras com valores de acordo com a rotulagem. Esta ocorrência elevada de amostras com teores acima pode se justificar pelo fato da vitamina A ser bastante instável, de forma que o excesso compensaria as possíveis perdas até o momento do consumo. Ressalta-se, que estes valores acima não podem ser considerados como um risco para a saúde, uma vez que contribuem com uma porcentagem da ingestão diária recomendada.

As amostras provenientes de uma mesma cooperativa apresentaram variações no conteúdo de vitamina A (Tabela 1), provavelmente devido a dificuldade de homogeneização durante o processo de fortificação do leite, sendo que os valores do coeficiente de variação ficaram na faixa de 11 a 35%. Ainda,

**Tabela 1.** Valores médio e respectivos desvios padrão para os teores de vitamina A nas amostras de leite pasteurizado segundo a cooperativa produtora.

| Cooperativa | Amostras analisadas | Teor médio de vitamina A (µg/L) | Desvio padrão | Coefficiente de variação (%) |
|-------------|---------------------|---------------------------------|---------------|------------------------------|
| 01          | 41                  | 121,3                           | 35,1          | 28,9                         |
| 02          | 247                 | 152,0                           | 29,4          | 19,3                         |
| 03          | 28                  | 133,5                           | 30,0          | 22,5                         |
| 04          | 17                  | 128,6                           | 15,5          | 12,1                         |
| 05          | 54                  | 155,3                           | 40,2          | 25,9                         |
| 06          | 26                  | 158,7                           | 22,0          | 13,7                         |
| 07          | 20                  | 133,8                           | 24,3          | 18,2                         |
| 08          | 71                  | 125,1                           | 25,0          | 20,0                         |
| 09          | 121                 | 161,8                           | 42,5          | 26,3                         |
| 10          | 15                  | 159,8                           | 17,8          | 11,1                         |
| 11          | 31                  | 168,5                           | 58,6          | 34,8                         |

como o período de amostragem foi bastante longo (40 meses), pode ter ocorrido variações nas procedências dos premixes e qualidade dos mesmos, bem como, alterações nos processos de homogeneização.

A fiscalização contínua de alimentos adicionados é importante, principalmente para que as empresas controlem o método ou a quantidade adicionada da vitamina A. Os valores recomendados de vitamina A podem ser alcançados com o consumo desses leites adicionados, de forma que os programas que os fornecem à população tendem a contribuir com a diminuição da carência dessa vitamina.

### REFERÊNCIAS

1. Almeida-Muradian, L.B.; Penteadó, M.V.C. Vitamina A. In: Penteadó, M.V.C. **Vitaminas: aspectos nutricionais, bioquímicos, clínicos e analíticos**. São Paulo: Manole, 2003. p: 53-742.
2. AOAC, **Official Methods of Analysis of Association of Official Analytical Chemists**, 14<sup>a</sup> ed., cap. 43, 1984.
3. Chagas, M.H.C. et al. Teratogenia da vitamina A, **Rev. Bras. Saúde Matern. Infant.**, 3(3): 247-52, 2003.
4. Flores, H.; Campos, F.A.C.S.; Silva, M.B.M. Enriquecimento de alimentos: presente e futuro. **Bol. Soc. Bras. Ciênc. Tecnol. Alim.**, 30(1): 49-55, 1996.
5. Garcia-Casal, M.N.; Layrisse, M.; Solano, L. Vitamin A and b-caroteno can improve nonheme iron absorption from rice, wheat, corn by humans. **J. Nutrition**, 128(3): 646-50, 1998.
6. Geraldo, R.R.C. et al. Distribuição da hipovitaminose A no Brasil nas últimas quatro décadas: ingestão alimentar, sinais clínicos e dados bioquímicos, **Rev. Nutr.**, 16(4): 443-60, 2003.
7. Germano, R.M.A. **Disponibilidade do ferro na presença do b-caroteno e o efeito dos interferentes em combinações de alimentos**. Piracicaba, 2002, 95p. [Dissertação de Mestrado - Faculdade Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo].
8. Instituto Adolfo Lutz. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**, 3<sup>a</sup> ed., v.1, p. 288-90, 1985.
9. Layrisse, M.; Garcia-Casal, M.N.; Solano, L. The role of vitamin A on inhibitors of nonheme iron absorption: preliminary results. **J. Nutr. Biochem.**, 8(2): 61-7, 1997.
10. Martini, F.C.C. **Comparação entre a disponibilidade ferro na presença de vitamina e beta-caroteno em alimentos e medicamentos**. Piracicaba, 2003, 98p. [Dissertação de Mestrado - Faculdade Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo].
11. Parrish, D.B. – Determination of vitamin A in foods – a review, **CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, 9: 375-91, 1977.
12. Ramalho, R.A.; Flores, H.; Saunders, C. Hipovitaminose A no Brasil: um problema de saúde pública. **Rev. Panam. Salud. Publica**, 12(2):117-122, 2002.
13. Subramanvam, G.B.; Parrish, D.B. Colorimetric reagents for determining vitamin A in feeds and foods. **J. Assoc. Off. Anal. Chem**, 59: 1125-30, 1976.



# Teor de gordura e composição de ácidos graxos em polpa de frutos de coqueiro anão em diferentes idades de maturação

## Variability of fat content and fatty acid composition in oil of dwarf coconut palm at its maturation time

RIALA6/992

Wilson Menezes Aragão<sup>1</sup>, Elizangela Mércia de Oliveira Cruz<sup>2</sup>, Mário Tavares<sup>3</sup>, Francisco Elias Ribeiro<sup>1</sup>, Evandro de Almeida Tupinambá<sup>1</sup>, Sabria Aued Pimentel<sup>3</sup>, Emy Takemoto<sup>3</sup>

\* Endereço para correspondência: <sup>1</sup> Pesquisador, Embrapa Tabuleiros Costeiros - Av. Beira Mar, 3250, Aracaju/SE, CEP 49025-040.

e-mail: aragaowm@cpac.embrapa.br

<sup>2</sup> Eng. Agrônomo, Bolsista CNPq.

<sup>3</sup> Pesquisador Científico - Instituto Adolfo Lutz - Av. Dr. Arnaldo, 355, São Paulo/SP, CEP 01246-902.

Recebido: 03/06/2003 - Aceito para publicação: 08/11/2004

### RESUMO

O coqueiro é descrito como a “árvore da vida”, já que dele podem ser obtidos vários produtos, especialmente de seus frutos. Neste trabalho foram determinados o teor de gordura e a composição em ácidos graxos da polpa de seis cultivares de coco-anão, com idades de 6 a 12 meses, cultivados no Campo Experimental do Betume, da EMBRAPA, no município de Neópolis/SE. O teor de gordura foi avaliado pelo método de Soxhlet e, a composição em ácidos graxos, por meio de cromatografia em fase gasosa. Todas as amostras apresentaram baixos teores de gordura, aumentando com a idade até os 11 meses (25,4 g/100 g). A polpa dos cocos anões vermelhos de Camarões e da Malásia revelou um elevado conteúdo de ácido láurico (38,1 a 49,6 g/100 g de gordura), favorecendo o seu uso nas indústrias de sabões e de detergentes.

**Palavras-Chave.** coco, coco-anão, *Cocos nucifera* L., polpa, gordura, ácidos graxos

### ABSTRACT

Coconut palm has been considered “the tree of life” since several products have been feasible to be obtained, especially from its fruits. In the present study, the fat content and the fatty acid composition were determined in the pulp of dwarf coconut (six cultivars, aged from 6 to 12 months), cultivated in Campo Experimental do Betume, EMBRAPA, Neopolis City, Sergipe State, Brazil. Fat content was evaluated by Soxhlet technique, and fatty acid profile was determined by means of gas-chromatographic technique. All of the samples presented low amounts of fat, increasing the fat level in proportion to the age until 11 months (25.4 g/100 g). Red dwarf coconut pulps from Cameroon and Malaysia revealed high content of lauric acid (from 38.1 to 49.6 g/100 g of oil), providing its use for soap manufacturing and detergent industries.

**Key Words.** coconut, dwarf coconut, *Cocos nucifera* L., pulp, fat, fatty acids.

### INTRODUÇÃO

O coqueiro (*Cocos nucifera* L.) é bastante cultivado na faixa litorânea das regiões tropicais. Originária do Sudeste asiático, tendo a Indonésia como seu maior produtor mundial<sup>13</sup>, essa planta foi introduzida no Brasil em 1553 onde se apresenta naturalizada em longas áreas da costa nordestina, proporcionando abundante matéria-prima tanto para as agroindústrias regionais, quanto para uso alimentício<sup>6,14</sup>. É

descrito como a “árvore da vida” pois, a partir do coqueiro podem-se obter vários produtos, derivados de toda planta e especialmente do fruto, tais como: tapetes, cerdas, estofamento de carros, pó de casca, carvão ativado, óleo, coco ralado, leite de coco, ração animal, sabões, detergentes, cosméticos e, mais atualmente, a água de coco<sup>5,9</sup>.

A polpa é rica em proteína, sacarose e lipídeos. É usada tanto para consumo *in natura* na culinária, quanto na indústria, onde se obtém copra (polpa desidratada a 6% de umidade) e

óleo. A copra é o produto mais importante do coqueiro, sendo o mais usado internacionalmente; dela se extrai o óleo, que é a matéria-prima para diversos produtos<sup>11</sup>. Em média são necessários cinco frutos para produzir um kg de copra<sup>12</sup>. Da copra pode-se obter óleo combustível, fluidos para freios, resinas sintéticas e agente plastificador de vidros de segurança.

O conteúdo de óleo na copra é superior a 60%, o que equivale a uma produção de 500 a 3.000 kg de óleo/ha<sup>10</sup>. Tavares et al.<sup>16</sup> encontraram nos coqueiros gigante e híbrido, 72,6 e 66,7% de óleo, respectivamente.

Os ácidos graxos naturais são em geral compostos alifáticos, que diferem pelo número de carbono e duplas ligações. Podem ser saturados (sem dupla ligação) e insaturados (com duplas ligações). Embora exista um número considerável de ácidos graxos, os lipídeos alimentares compreendem, essencialmente: ácidos palmítico e esteárico (ácidos graxos saturados), oléico e linoléico (ácidos graxos insaturados)<sup>2</sup>. Já o ácido láurico, é usado em indústria de cosméticos e sabões, pelo seu alto poder espumante, bactericida e biodegradável, e na fabricação de álcool. O endosperma do fruto do coqueiro é a principal fonte mundial deste último ácido graxo<sup>4,10</sup>.

Além de fornecerem energia, os ácidos graxos orientam a formação das gorduras de reserva, as quais são necessárias ao organismo para absorção de vitaminas lipossolúveis A, D, E e K, e a formação dos esteróides, como o colesterol, que transporta as gorduras, mantém a permeabilidade das membranas celulares, a neutralização de substâncias citotóxicas e a síntese de numerosos hormônios. Existem ácidos graxos que o organismo animal não pode sintetizar e que são indispensáveis ao mesmo, portanto devem estar contidos nos alimentos. Esses são encontrados nas sementes de oleaginosas, gema de ovo e vegetais verdes<sup>2</sup>.

Em geral, a família das palmáceas tem os ácidos graxos insaturados em quantidades reduzidas, prevalecendo o ácido oléico (5 a 30%) e linoléico (máximo 10%). Já os ácidos graxos saturados predominantes são o láurico (40 a 50%) e o mirístico (aproximadamente 20%)<sup>9,10,11</sup>. Tavares et al.<sup>16</sup> encontraram uma variação de ácido láurico de 48,4%, no híbrido PB121 a 54,1%, no gigante de Rotuma.

Este trabalho objetivou determinar o teor de gordura e a composição de ácidos graxos em polpa de frutos de coqueiro anão, em diferentes idades de maturação para subsidiar os produtores e agroindústria de coco e, principalmente, os trabalhos de melhoramento com essa variedade.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram empregados os coqueiros anões Verde do Brasil de Jiqui (AVeBrJ), Amarelo do Brasil de Gramame (AABrG), Amarelo da Malásia (AAM), Vermelho de Camarões (AVC), Vermelho do Brasil de Gramame (AVBrG) e o Vermelho da Malásia (AVM), existentes no Banco Ativo de Germoplasma de coco (BAG de coco), situado no Campo Experimental do Betume,

Município de Neópolis/SE, pertencente à Embrapa Tabuleiros Costeiros. O solo é do tipo podzol, com baixa fertilidade natural e clima do tipo A's segundo a classificação de Koopen. A precipitação média anual normal é de 1.300 mm, ocorrendo 80 e 20% nas épocas chuvosas (abril a setembro) e seca (outubro a março), respectivamente.

O BAG de coco é irrigado normalmente com 150 L/planta/dia no período seco, capinas sempre que necessário, e adubações de acordo com análise foliar.

As análises do teor de gordura e composição de ácidos graxos da mistura da polpa de 3 frutos/planta de cada coqueiro anão, colhidos nas idades de 6 (frutos verdes) a 12 meses (frutos secos), foram feitas no Instituto Adolfo Lutz, em São Paulo, através do método de Soxhlet<sup>8</sup> e de cromatografia em fase gasosa<sup>1</sup>, respectivamente. Os ácidos graxos das gorduras foram transformados em ésteres metílicos de ácidos graxos segundo metodologia descrita nas "Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz"<sup>7,8</sup>. Os ésteres metílicos de ácidos graxos foram analisados em cromatógrafo a gás marca Shimadzu, modelo GC-17 A, com detector de ionização de chama. Os compostos foram separados em coluna capilar de sílica fundida CP-Sil 88 de 50 m com diâmetro interno de 0,25 cm e espessura do filme de 0,20 µm. Foram obedecidas as seguintes condições de operação: temperatura programada da coluna de 60°C (2 min) a 135°C (15°C/min), 135°C (1 min) 3°C/min até 215°C (5 min); Temperatura do injetor: 220°C; Temperatura do detector: 220°C; gás de arraste: hidrogênio, velocidade linear 22 mL/min; razão de divisão da amostra 1:50. Os ácidos graxos foram identificados através da comparação dos tempos de retenção de padrões puros de ésteres metílicos de ácidos graxos com os componentes separados das amostras. A quantificação foi feita por normalização de área com fatores de correção para o detector de ionização de chama calculado com relação ao ácido esteárico (C18:0)<sup>1,3</sup>. A gordura do coco apresenta uma grande proporção de ácidos graxos com número inferior a 12 átomos de carbono na molécula, sendo assim, necessário transformar a porcentagem em área, determinada pelo método de normalização, em porcentagem em massa através do cálculo dos fatores de correção, que está descrito no método AOCS Ce 1d-91<sup>1</sup>.

As análises estatísticas do teor e composição de gordura consistiram nas estimativas de média, desvio-padrão, função de regressão e coeficiente de determinação (R<sup>2</sup>)<sup>14</sup> para cada coco anão e correlações fenotípicas (rf) entre os pares de ácidos graxos<sup>7,15</sup>.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os teores de gordura (g/100g) da polpa dos frutos de coqueiro anão aumentaram com a idade até 11 meses e decresceram na idade de 12 meses, independente da cultivar. Foram estabelecidas equações que melhor descrevessem a interdependência das variáveis e calculados os coeficientes de determinação (R<sup>2</sup>). Para as cultivares AAM e AVeBrJ, a relação

linear entre teor de gordura e idade ficou bem evidenciada pelos valores de  $R^2$ , que foram significativos pelo teste T a 5% de probabilidade (Tabela 1).

Esses dados estão de acordo com Tavares et al.<sup>16</sup>, que evidenciaram não só a variação significativa na composição centesimal da polpa de seis cultivares de coqueiro anão em função da idade dos frutos, mas também que os maiores valores de gordura ocorreram aos 11 meses de idade dos frutos, principalmente no AVC. Mesmo aos 11 meses, os teores de gordura na polpa dos cocos anões são muito baixos (Tabela 1 - teores mais altos AVeBrJ, 25,79%, AVC, 26,55%, e AVM, 32,13%) quando comparados aos gigantes e híbridos intervarietais, cujos valores variaram de 63,05% (GRL) a 72,66% (GTG) e 65,24% (PB 121) a 66,78% (PB 111), conforme Tavares et al.<sup>16</sup>, respectivamente. Esses resultados indicam que a polpa do anão deve ser preferida como matéria-prima para a confecção agroindustrial de alimentos "light" à base de coco, e ao uso culinário na preparação de alimentos com baixos teores de gordura. Apesar disto, o coqueiro anão tem sido rejeitado pelas agroindústrias de alimentos devido à sua baixa produção de polpa; entretanto, essa variedade apresenta variabilidade genética para essa característica, com plantas produzindo acima de 400g de polpa/fruto, igualando-se, portanto, às produções médias dos coqueiros híbridos e gigantes.

No início da formação da polpa na idade de seis meses até o momento em que a polpa está praticamente solidificada, com oito meses, os teores de gordura são baixos (variam em média de 4,5 a 7,3 g/100g). Esses teores aumentam significativamente com nove meses e na idade de onze meses representam até três vezes mais gordura que nas idades iniciais (Tabela 1).

A polpa de coco do coqueiro anão contém os ácidos graxos saturados cáprico, caprílico, cáproico, laúrico, mirístico,

palmítico e esteárico; e os insaturados oléico e linoléico (Tabelas 2 a 5). Os ácidos laúrico, mirístico e palmítico, dentre os saturados, e o oléico, dentre os insaturados predominaram sobre os demais. Apesar disto, apenas os teores do ácido laúrico são mais elevados, chegando em média a 38,1% aos 6 meses e 49,6% aos 12 meses. Este último valor está muito próximo do teor médio de ácido láurico referido para a gordura de coco das Filipinas, de diferentes cultivares e híbridos<sup>10</sup>. Os teores dos demais ácidos são baixos independentemente da cultivar e da idade dos frutos.

Também a variação dos teores dos ácidos graxos saturados caprílico (0,2%, AABrG a 0,9%, AVM - Tabela 2), caprílico (2,4%, AABrG a 10,0 - Tabela 2), cáprico (2,2%, AABrG a 6,8%, AVM - Tabela 2), laúrico (32,4%, AABrG a 54,6%, AVM - Tabela 3), mirístico (18,3%, AVBrG a 23,7%, AABrG - Tabela 3), palmítico (7,8%, AVM a 18,3%, AABrG - Tabela 4), esteárico (2,3%, AAM a 4,2%, AABrG e AVC - Tabela 4) e insaturados oléico (4,4%, AVM a 20,7%, AVeBrJ - Tabela 5) e linoléico (0,5% AVC, AVM e AVeBrJ a 5,0%, AVeBrJ - Tabela 5), é relativamente baixa.

Independente da cultivar de coqueiro anão, os teores dos ácidos caprílico, cáprico, esteárico e, principalmente, laúrico aumentaram com a idade dos frutos entre 6 a 12 meses (Tabelas 2, 3, 4); os dos ácidos palmítico, oléico e linoléico decresceram. Valores altos de dispersão (%CV) evidenciam a variação dos teores daqueles ácidos graxos com a idade dos frutos (Tabelas 4 e 5). Por outro lado, os teores de ácido mirístico para todos os cultivares mantiveram-se praticamente constante com a idade (%CV < 6,3) (Tabela 3). Os valores de  $R^2$  nem sempre foram altos para explicar as equações de regressão linear de uma determinada cultivar de coqueiro anão para um dado ácido graxo.

Normalmente para os pares de ácidos graxos que aumentaram ou diminuíram com a idade, as correlações (rf)

**Tabela 1.** Teor de gordura da polpa de frutos de coqueiro anão (g/100g), em diferentes idades

| Idade (meses)        | Cultivares         |                    |                    |                    |                    |                   |       |
|----------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------------------|-------|
|                      | AABrG              | AAM                | AVC                | AVBrG              | AVM                | AVeBrJ            | Média |
| 6                    | 3,59               | 3,68               | 2,83               | 8,17               | 3,99               | 4,49              | 4,5   |
| 7                    | 4,16               | 2,67               | 12,43              | 5,06               | 8,49               | 7,13              | 6,7   |
| 8                    | 4,64               | 4,52               | 17,10              | 6,80               | 3,44               | 7,33              | 7,3   |
| 9                    | 12,80              | 14,74              | 15,76              | 18,99              | 9,26               | 20,16             | 15,3  |
| 10                   | 11,08              | 12,40              | 26,05              | 13,62              | 13,70              | 12,97             | 15,0  |
| 11                   | 24,09              | 19,84              | 26,55              | 24,11              | 32,13              | 25,79             | 25,4  |
| 12                   | 10,83              | 18,38              | 11,90              | 14,59              | 14,32              | 24,98             | 15,8  |
| <b>Média</b>         | 10,2               | 10,9               | 16,1               | 13,0               | 12,2               | 14,7              | 12,9  |
| <b>DP</b>            | 7,2                | 7,2                | 8,3                | 6,9                | 9,8                | 8,9               | 7,2   |
| <b>CV%</b>           | 70,9               | 66,4               | 51,8               | 53,0               | 80,0               | 60,7              | 56,4  |
| <b>Equação Y=</b>    | 2,4x+0,4           | 3,1x-1,4           | 2,3x+6,9           | 2,3x+3,9           | 3,2x-0,4           | 3,7x-0,2          |       |
| <b>R<sup>2</sup></b> | 0,53 <sup>NS</sup> | 0,85 <sup>**</sup> | 0,36 <sup>NS</sup> | 0,51 <sup>NS</sup> | 0,49 <sup>NS</sup> | 0,72 <sup>*</sup> |       |

DP Desvio-padrão; CV% Coeficiente de variação em porcentagem; NS Não significativa pelo teste T; \* Significativa pelo teste T a 5% de probabilidade; \*\* Significativo pelo teste T a 5% de probabilidade

**Tabela 2.** Teores dos ácidos graxos saturados capríco, caprílico e cáprico em polpa de frutos de diferentes idades em cultivares de coqueiro anão.

| Idade          | Capríco                  |                             |                          |                           |                            |                          | Caprílico          |                    |                    |                    |                    |                    | Cáprico            |                    |                    |                    |                    |                    |
|----------------|--------------------------|-----------------------------|--------------------------|---------------------------|----------------------------|--------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
|                | AABrG                    | AAM                         | AVC                      | AVBrG                     | AVM                        | AVeBrJ                   | AABrG              | AAM                | AVC                | AVBrG              | AVM                | AVeBrJ             | AABrG              | AAM                | AVC                | AVBrG              | AVM                | AVeBrJ             |
| 6              | 0,3                      | 0,4                         | 0,3                      | 0,3                       | 0,3                        | 0,2                      | 3,3                | 4,7                | 4,4                | 4,3                | 3,1                | 3,3                | 2,5                | 3,3                | 3,9                | 3,5                | 2,6                | 2,8                |
| 7              | 0,3                      | 0,3                         | 0,3                      | 0,3                       | 0,3                        | 0,4                      | 4,3                | 3,6                | 4,5                | 5,4                | 5,0                | 5,1                | 3,5                | 3,6                | 4,3                | 4,8                | 4,6                | 4,8                |
| 8              | 0,2                      | 0,7                         | 0,3                      | 0,5                       | 0,2                        | 0,4                      | 2,4                | 4,9                | 4,9                | 4,7                | 2,7                | 5,1                | 2,2                | 3,2                | 4,8                | 3,4                | 2,4                | 3,8                |
| 9              | 0,2                      | 0,3                         | 0,2                      | 0,2                       | 0,3                        | 0,3                      | 4,9                | 5,8                | 5,2                | 5,7                | 5,3                | 5,9                | 4,2                | 4,7                | 4,1                | 4,5                | 5,0                | 5,2                |
| 10             | 0,4                      | 0,5                         | 0,4                      | 0,4                       | 0,4                        | 0,4                      | 4,9                | 5,8                | 5,2                | 5,7                | 5,3                | 5,9                | 4,5                | 4,9                | 5,0                | 5,7                | 5,0                | 5,6                |
| 11             | 0,4                      | 0,4                         | 0,3                      | 0,4                       | 0,4                        | 0,4                      | 4,8                | 5,0                | 4,8                | 5,6                | 5,4                | 5,6                | 4,4                | 4,5                | 4,8                | 4,7                | 4,3                | 5,0                |
| 12             | 0,4                      | 0,5                         | 0,4                      | 0,3                       | 0,9                        | 0,3                      | 4,5                | 6,6                | 5,1                | 5,2                | 10,0               | 4,5                | 3,8                | 5,4                | 4,7                | 4,6                | 6,8                | 4,4                |
| Média          | 0,31                     | 0,44                        | 0,31                     | 0,34                      | 0,40                       | 0,34                     | 4,16               | 5,20               | 4,87               | 5,23               | 5,26               | 5,06               | 3,59               | 4,23               | 4,51               | 4,46               | 4,39               | 4,51               |
| DP             | 0,09                     | 0,14                        | 0,07                     | 0,10                      | 0,23                       | 0,08                     | 0,96               | 0,97               | 0,33               | 0,54               | 2,37               | 0,92               | 0,92               | 0,86               | 0,41               | 0,79               | 1,51               | 0,95               |
| CV%            | 28,63                    | 31,55                       | 21,96                    | 28,46                     | 57,74                      | 22,95                    | 22,98              | 18,61              | 6,67               | 10,34              | 45,13              | 18,26              | 25,53              | 20,33              | 9,17               | 17,80              | 34,54              | 21,07              |
| Equação<br>Y=  | $0,01x^2 - 0,06x + 0,34$ | $0,0003x^2 - 0,038x + 0,36$ | $0,01x^2 - 0,04x + 0,34$ | $0,03x^2 - 0,058x + 0,26$ | $0,048x^2 - 0,218x + 0,51$ | $0,01x^2 - 0,12x + 0,14$ | $0,25x^2 + 2,01$   | $0,22x^2 + 2,83$   | $0,10x^2 + 4,2$    | $0,14x^2 + 4,4$    | $0,35x^2 + 1,12$   | $0,12x^2 + 4,1$    | $0,28x^2 + 2,44$   | $0,35x^2 + 2,82$   | $0,12x^2 + 4,0$    | $0,12x^2 + 3,68$   | $0,52x^2 + 2,3$    | $0,25x^2 + 3,51$   |
| R <sup>2</sup> | 0,6*                     | 0,04 <sup>NS</sup>          | 0,35 <sup>NS</sup>       | 0,10 <sup>NS</sup>        | 0,87 <sup>**</sup>         | 0,47 <sup>NS</sup>       | 0,21 <sup>NS</sup> | 0,53 <sup>NS</sup> | 0,20 <sup>NS</sup> | 0,22 <sup>NS</sup> | 0,50 <sup>NS</sup> | 0,29 <sup>NS</sup> | 0,45 <sup>NS</sup> | 0,77 <sup>**</sup> | 0,45 <sup>NS</sup> | 0,27 <sup>NS</sup> | 0,55 <sup>NS</sup> | 0,32 <sup>NS</sup> |

DP Desvio-padrão; CV% Coeficiente de variação em porcentagem; NS Não significativa pelo teste T; \* Significativa pelo teste T a 5% de probabilidade; \*\* Significativo pelo teste T a 5% de probabilidade

**Tabela 3.** Teores dos ácidos graxos saturados láurico e mirístico em polpa de frutos de diferentes idades em cultivares de coqueiro anão.

| Idade          | Láurico            |                    |            |                    |                    |                    | Mirístico          |                    |                    |                    |                    |                    |
|----------------|--------------------|--------------------|------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
|                | AABrG              | AAM                | AVC        | AVBrG              | AVM                | AVeBrJ             | AABrG              | AAM                | AVC                | AVBrG              | AVM                | AVeBrJ             |
| 6              | 32,4               | 37,7               | 46,5       | 42,1               | 36,4               | 33,2               | 20,9               | 20,5               | 20,6               | 21,6               | 21,8               | 18,7               |
| 7              | 39,0               | 38,6               | 46,8       | 47,4               | 48,4               | 46,3               | 22,1               | 22,7               | 20,1               | 19,8               | 19,6               | 20,7               |
| 8              | 33,4               | 33,3               | 48,7       | 34,5               | 35,0               | 43,4               | 23,7               | 22,2               | 19,6               | 20,6               | 22,1               | 21,9               |
| 9              | 47,7               | 47,9               | 49,0       | 50,2               | 51,6               | 49,6               | 21,8               | 21,2               | 22,1               | 19,6               | 19,6               | 20,1               |
| 10             | 44,7               | 43,3               | 48,7       | 52,2               | 49,5               | 49,6               | 20,5               | 21,6               | 19,9               | 18,3               | 19,4               | 19,0               |
| 11             | 45,4               | 46,7               | 49,0       | 48,3               | 50,8               | 48,7               | 21,6               | 20,8               | 19,5               | 20,5               | 19,9               | 21,2               |
| 12             | 42,9               | 48,3               | 54,2       | 49,8               | 54,6               | 48,0               | 23,3               | 20,1               | 20,6               | 20,3               | 18,8               | 21,1               |
| Média          | 40,8               | 42,3               | 49,0       | 46,4               | 46,6               | 45,5               | 22,0               | 21,3               | 20,3               | 20,1               | 20,2               | 20,4               |
| DP             | 6,0                | 5,8                | 2,5        | 6,1                | 7,7                | 5,9                | 1,2                | 0,9                | 0,9                | 1,0                | 1,3                | 1,2                |
| CV%            | 14,7               | 13,8               | 5,2        | 13,2               | 16,5               | 12,9               | 5,3                | 4,4                | 4,4                | 5,1                | 6,3                | 5,8                |
| Equação<br>Y=  | 1,08x-32,8         | 2,07x+33,1         | 0,08x-45,0 | 1,52x-40,3         | 2,63x-36,0         | 1,07x-37,6         | 0,10x+21,5         | -0,2x+22,1         | -0,03x+20,47       | 0,18x+19,6         | -0,39x+21,7        | 0,18x+19,6         |
| R <sup>2</sup> | 0,51 <sup>NS</sup> | 0,50 <sup>NS</sup> | 0,70*      | 0,29 <sup>NS</sup> | 0,54 <sup>NS</sup> | 0,53 <sup>NS</sup> | 0,04 <sup>NS</sup> | 0,21 <sup>NS</sup> | 0,01 <sup>NS</sup> | 0,12 <sup>NS</sup> | 0,46 <sup>NS</sup> | 0,12 <sup>NS</sup> |

DP Desvio-padrão; CV% Coeficiente de variação em porcentagem; NS Não significativa pelo teste T; \* Significativa pelo teste T a 5% de probabilidade; \*\* Significativo pelo teste T a 5% de probabilidade

**Tabela 4.** Teores dos ácidos graxos saturados palmítico e esteárico em polpa de frutos de diferentes idades em cultivares de coqueiro anão.

| Idade                | Palmítico          |                    |                    |                    |                    |                    | Esteárico          |                    |                    |            |                    |                    |
|----------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|------------|--------------------|--------------------|
|                      | AABrG              | AAM                | AVC                | AVBrG              | AVM                | AVEBrJ             | AABrG              | AAM                | AVC                | AVBrG      | AVM                | AVEBrJ             |
| 6                    | 16,6               | 14,7               | 10,7               | 13,3               | 15,6               | 16,7               | 2,6                | 2,4                | 2,9                | 3,0        | 2,8                | 2,7                |
| 7                    | 14,0               | 14,6               | 10,5               | 10,2               | 9,9                | 10,9               | 4,1                | 4,0                | 3,7                | 2,8        | 2,9                | 3,5                |
| 8                    | 18,3               | 16,8               | 9,8                | 15,2               | 17,0               | 13,3               | 3,4                | 2,3                | 3,6                | 2,8        | 2,9                | 2,4                |
| 9                    | 11,3               | 11,0               | 11,0               | 9,5                | 9,2                | 9,5                | 3,5                | 3,5                | 3,9                | 3,0        | 2,6                | 3,4                |
| 10                   | 11,9               | 11,5               | 9,6                | 8,1                | 9,2                | 9,2                | 3,8                | 3,9                | 4,0                | 3,2        | 3,4                | 3,5                |
| 11                   | 11,2               | 10,8               | 9,7                | 10,0               | 8,7                | 9,6                | 3,8                | 3,9                | 3,4                | 3,7        | 2,9                | 3,2                |
| 12                   | 12,5               | 9,6                | 9,4                | 9,4                | 7,8                | 10,5               | 4,2                | 3,7                | 4,2                | 3,7        | 3,0                | 3,5                |
| <b>Média</b>         | 13,7               | 12,7               | 10,1               | 10,8               | 11,1               | 11,4               | 3,6                | 3,4                | 3,7                | 3,2        | 2,9                | 3,2                |
| <b>DP</b>            | 2,8                | 2,6                | 0,6                | 2,5                | 3,7                | 2,7                | 0,5                | 0,7                | 0,4                | 0,4        | 0,2                | 0,4                |
| <b>CV%</b>           | 20,3               | 20,8               | 6,2                | 23,1               | 33,1               | 23,9               | 14,8               | 21,5               | 11,7               | 12,2       | 8,3                | 14,1               |
| <b>Equação Y=</b>    | 0,87x-17,15        | -1,01x-16,74       | -0,20x-10,01       | -0,68x-13,55       | -1,2x-15,85        | -0,003x-15,0       | 0,16x-2,07         | 0,18x-2,62         | 0,13x-3,14         | 0,15x-2,55 | 0,03x-2,77         | 0,10x-2,75         |
| <b>R<sup>2</sup></b> | 0,45 <sup>NS</sup> | 0,45 <sup>NS</sup> | 0,50 <sup>NS</sup> | 0,36 <sup>NS</sup> | 0,50 <sup>NS</sup> | 0,51 <sup>NS</sup> | 0,43 <sup>NS</sup> | 0,31 <sup>NS</sup> | 0,43 <sup>NS</sup> | 0,73*      | 0,12 <sup>NS</sup> | 0,25 <sup>NS</sup> |

DP Desvio-padrão; CV% Coeficiente de variação em porcentagem; NS Não significativa pelo teste T; \* Significativa pelo teste T a 5% de probabilidade; \*\* Significativo pelo teste T a 5% de probabilidade

**Tabela 5.** Teores dos ácidos graxos insaturados oléico e linoléico em polpa de frutos de diferentes idades em cultivares de coqueiro anão.

| Idade          | Oléico      |            |           |                    |                    |                    | Linoléico          |                    |                    |                    |                    |                    |
|----------------|-------------|------------|-----------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
|                | AABrG       | AAM        | AVC       | AVBrG              | AVM                | AVeBrJ             | AABrG              | AAM                | AVC                | AVBrG              | AVM                | AVeBrJ             |
| 6              | 20,0        | 15,2       | 9,5       | 12,7               | 16,3               | 20,7               | 4,2                | 4,4                | 1,2                | 2,7                | 3,6                | 5,0                |
| 7              | 11,2        | 11,7       | 8,5       | 8,1                | 8,0                | 7,7                | 1,3                | 1,3                | 1,3                | 1,1                | 1,2                | 0,6                |
| 8              | 17,0        | 18,1       | 7,3       | 19,5               | 17,3               | 13,7               | 3,3                | 3,2                | 1,0                | 3,1                | 4,1                | 1,5                |
| 9              | 6,5         | 6,3        | 5,4       | 8,0                | 6,4                | 6,0                | 0,7                | 0,6                | 1,0                | 0,9                | 0,7                | 0,5                |
| 10             | 7,8         | 7,3        | 6,2       | 5,5                | 6,5                | 6,0                | 1,8                | 1,1                | 1,0                | 1,2                | 1,4                | 0,8                |
| 11             | 7,1         | 6,8        | 7,2       | 6,2                | 5,8                | 5,7                | 1,3                | 1,1                | 1,2                | 0,9                | 1,1                | 0,6                |
| 12             | 7,2         | 5,1        | 5,6       | 6,0                | 4,4                | 7,0                | 1,2                | 0,6                | 0,5                | 0,8                | 0,5                | 0,7                |
| Média          | 11,0        | 10,1       | 7,1       | 9,4                | 9,2                | 9,5                | 2,0                | 1,8                | 1,0                | 1,5                | 1,8                | 1,4                |
| DP             | 5,4         | 5,0        | 1,5       | 5,1                | 5,3                | 5,6                | 1,3                | 1,5                | 0,3                | 1,0                | 1,4                | 1,6                |
| CV%            | 49,5        | 49,8       | 21,3      | 53,7               | 57,1               | 59,2               | 65,1               | 83,2               | 25,5               | 62,4               | 80,0               | 117,5              |
| Equação<br>Y=  | 1,22x+13,24 | 1,31x+1,24 | 0,55x+2,2 | 1,22x-13,55        | 1,31x+0,51         | 1,33x+1,03         | 0,37x-3,47         | 0,41x-3,74         | 0,08x-1,36         | 0,29x-2,67         | 0,44x-3,54         | 0,49x-3,33         |
| R <sup>2</sup> | 0,82**      | 0,81**     | 0,81**    | 0,22 <sup>NS</sup> | 0,56 <sup>NS</sup> | 0,51 <sup>NS</sup> | 0,31 <sup>NS</sup> | 0,54 <sup>NS</sup> | 0,50 <sup>NS</sup> | 0,41 <sup>NS</sup> | 0,43 <sup>NS</sup> | 0,41 <sup>NS</sup> |

DP Desvio-padrão; CV% Coeficiente de variação em porcentagem; NS Não significativa pelo teste T;  
\* Significativa pelo teste T a 5% de probabilidade; \*\* Significativo pelo teste T a 5% de probabilidade

(Tabela 6) foram positivas e altamente significativa (cáprico x láurico  $r_f = 0,82^{**}$ , palmítico x oleíco  $r_f = 0,83^{**}$ , palmítico x linoléico  $r_f = 0,88^{**}$ , oleíco x linoléico  $r_f = 0,96^{**}$ ) ou positiva e não significativa (caprílico x láurico  $r_f = 0,30^{NS}$  e láurico x esteárico  $r_f = 0,06^{NS}$ ). Para os pares caprílico x esteárico ( $r_f = -0,65^{**}$ ) e cáprico x esteárico ( $r_f = -0,41^{NS}$ ), as correlações foram negativas altamente significativa e não significativa, respectivamente.

Já para os pares de caracteres nos quais um dos ácidos aumentou e o outro diminuiu, as correlações fenotípicas foram normalmente negativas e altamente significativas (cáprico x palmítico  $r_f = -0,64^{**}$ , cáprico x oleíco  $r_f = -0,67^{**}$ , cáprico x linoléico  $r_f = -0,75^{**}$ , láurico x palmítico  $r_f = -1,00^{**}$ , láurico x oleíco  $r_f = -0,90^{**}$ , láurico x linoléico  $r_f = -0,98^{**}$  e esteárico x linoléico  $r_f = -0,86^{**}$ ); negativas e não significativas (caprílico x oleíco  $r_f = -0,19^{NS}$ , caprílico x linoléico  $r_f = -0,36^{NS}$  e esteárico x oleíco  $r_f = -0,31^{NS}$ ) e até nula (esteárico x palmítico ( $r_f = 0,0$ )).

Para o ácido mirístico, cujo teor se manteve ou decresceu ligeiramente entre as cultivares de coqueiro anão, correlacionou-se positivamente com os ácidos que diminuíram com a idade dos frutos, sendo altamente significativa com o ácido palmítico  $r_f = 0,80^{**}$  e não significativa com os ácidos oleíco  $r_f = 0,30^{NS}$  e linoléico  $r_f = 0,30^{NS}$ ; e normalmente negativas com os ácidos que aumentaram com a idade, sendo altamente significativa com o caprílico  $r_f = -0,80^{**}$ , cáprico  $r_f = -1,0^{**}$  e láurico  $r_f = -1,0^{**}$ . A exceção neste caso ocorreu entre mirístico x esteárico em que a correlação foi positiva e significativa ( $r_f = 0,55^*$ ).

Apenas a correlação entre o ácido capróico e todos os demais foi nula. É conveniente salientar que, no melhoramento do coqueiro, para se aumentar os teores de ácidos graxos alimentares, como o palmítico, oleíco e linoléico, ao se selecionar para um deles inevitavelmente pode-se estar aumentando os teores dos outros dois, já que suas correlações foram positivas e altamente significativas. Entretanto, o melhorista poderá ter grande dificuldade para aumentar também o teor do ácido graxo esteárico, já que suas correlações com os ácidos palmítico, oleíco e linoléico, são nula, negativa não

significativa e negativa e altamente significativa (Tabela 6), respectivamente, indicando que ao se selecionar para o ácido esteárico indiretamente poderá diminuir principalmente o teor do ácido linoléico. Esse mesmo problema poderá ocorrer quando o principal objetivo do melhoramento é aumentar o teor do ácido láurico, já que a correlação fenotípica entre esse ácido e os demais ácidos alimentares são, em geral, negativas e altamente significativas.

Praticamente os teores de todos os ácidos graxos estão próximos aos observados por Tavares et al.<sup>16</sup>, na polpa dos gigantes e híbridos intervarietais. Os ácidos mirístico (em média 20,7g/100g), linoléico (variando em média de 3,5 aos 6 meses para 0,7g/100g aos 12 meses), oleíco (variando em média de 15,7 aos 6 meses para 5,9g/100g aos 12 meses) e láurico (variando em média 38,1 aos 6 meses a 49,6g/100g aos 12 meses), existentes na polpa do fruto de coqueiro anão independente da cultivar, estão dentro das faixas de ácidos graxos citadas por Mazzani<sup>11</sup>, para a família das palmáceas. Entretanto, os teores de ácido láurico das cultivares AVC (54,2g/100g) e AVM (54,6 g/100g), ambos na polpa com 12 meses, suplantaram a percentagem máxima de 50% de ácido láurico citadas por Mazzani<sup>11</sup>. Esses teores foram superiores inclusive, aos observados por Tavares et al.<sup>16</sup> em 9 acessos de gigante (variou de 49,6% no GNH a 54,1% no GRT) e nos híbridos PB 121 (48,4%) e PB111 (52,9%), esses anões.

## CONCLUSÕES

A polpa do coqueiro anão apresentou baixos teores de gordura, independente da cultivar.

O teor de gordura da polpa de coqueiro anão aumentou com a idade até 11 meses.

Os teores de ácido láurico foram maiores na polpa dos frutos secos, enquanto os dos ácidos palmítico, linoléico e oleíco, na polpa dos frutos verdes.

O teor do ácido mirístico foi praticamente igual nos frutos verdes e secos.

**Tabela 6.** Correlações fenotípicas dos teores de ácidos graxos de polpa de frutos de diferentes idades em cultivares de coqueiro anão.

|                  | Capróico | Caprílico | Cáprico            | Láurico            | Mirístico           | Palmítico           | Esteárico           | Oleíco              | Linoléico           |
|------------------|----------|-----------|--------------------|--------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| <b>Capróico</b>  | -        | 0         | 0                  | 0                  | 0                   | 0                   | 0                   | 0                   | 0                   |
| <b>Caprílico</b> |          | -         | 0,63 <sup>**</sup> | 0,30 <sup>NS</sup> | -0,80 <sup>**</sup> | -0,48 <sup>*</sup>  | -0,65 <sup>**</sup> | -0,19 <sup>NS</sup> | -0,36 <sup>NS</sup> |
| <b>Cáprico</b>   |          |           | -                  | 0,82 <sup>**</sup> | -1,0 <sup>**</sup>  | -0,64 <sup>**</sup> | -0,41 <sup>NS</sup> | -0,67 <sup>**</sup> | -0,75 <sup>**</sup> |
| <b>Láurico</b>   |          |           |                    | -                  | -1,0 <sup>**</sup>  | -1,0 <sup>**</sup>  | 0,06 <sup>NS</sup>  | -0,9 <sup>**</sup>  | -0,98 <sup>**</sup> |
| <b>Mirístico</b> |          |           |                    |                    | -                   | 0,80 <sup>**</sup>  | 0,55 <sup>*</sup>   | 0,30 <sup>NS</sup>  | 0,30 <sup>NS</sup>  |
| <b>Palmítico</b> |          |           |                    |                    |                     | -                   | 0                   | 0,83 <sup>**</sup>  | 0,88 <sup>**</sup>  |
| <b>Esteárico</b> |          |           |                    |                    |                     |                     | -                   | -0,31 <sup>NS</sup> | -0,86 <sup>**</sup> |
| <b>Oleíco</b>    |          |           |                    |                    |                     |                     |                     | -                   | 0,96 <sup>**</sup>  |
| <b>Linoléico</b> |          |           |                    |                    |                     |                     |                     |                     | -                   |

\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; <sup>NS</sup> Não significativo  $p > 0,05$



As polpas dos cocos anões vermelhos de Camarões (AVC) e da Malásia (AVM), mostraram-se ricas em ácido láurico, devendo, portanto, serem as preferidas nos programas de cruzamentos que visem melhorar os teores de ácido láurico para maximizar o seu uso nas agroindústrias de saboaria e detergentes.

## REFERÊNCIAS

1. American Oil Chemists' Society. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society**. 4<sup>th</sup> ed. Champaign, USA, A.O.C.S., 1995 (A.O.C.S. Official Method Ce 1d-91: Determination of fatty acids in edible oils and fats by capillary liquid chromatography (GLC)).
2. Andriquetto, J. M. **Nutrição animal**. 4 ed., São Paulo: Nobel; 1981. v.1, p.90-8
3. Bailey's Industrial Oil and Fat Products. Fatty acids in newer fats and oils. In: Hui, Y.H. (ed). **Edible oil and fat products: general application**. New York: Wiley-Interscience; 1996. v.1, p.429.
4. Balachandran, F. M.; Arumughan, C.; Mathew, A.G. Distribution of major chemical constituents and fatty acids in different regions of coconut endosperm. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, 62(11):1583-6, 1985.
5. Bliska, F. M. de; Leite, R. S.; Savitci, L.A. O coco no Brasil – Aspectos econômicos e de mercado. **Colet. ITAL**, 25 (1): 81-105, 1995.
6. Ferreira, J. M. S.; Warwick, D. R. N.; Siqueira, L. A. (eds.) **Cultura do coqueiro no Brasil**. Aracaju, EMBRAPA-SPI, 1994. 300 p.
7. Gomes, F. P. **Curso de estatística experimental**. São Paulo: Nobel; 1985. 466p.
8. Instituto Adolfo Lutz. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. 3<sup>a</sup>ed., São Paulo: IMESP; 1985, p. 42-3, 266.
9. Kapseu, C. et al. Huiles de coco et de palmiste: source d'acide gras laurique. **Riv. Ital. Sostanze Grasse**, 74(5): 205-8, 1997.
10. Laureles, L. R. et al. Variability in fatty acid and triacylglycerol composition of oil of coconut (*Coconut nucifera* L.) hybrids and their parentals. **J. Agric. Food Chem.**, 50:1581-6, 2002.
11. Mazzani, B. **Plantas Oleaginosas**. Barcelona: Ed. Salvat; 1963, 380p.
12. Persley, G. J. **Replenishing the tree of life: Towards an International Agenda for Coconut Palm Research**. Wallinggard: CAB/ACCAR; 1992, 156p.
13. Santoso, U. et al. Nutrient composition of *kopyor* coconuts (*Cocos nucifera* L.). **Food Chem.**, 57(2):299-304, 1996.
14. Sobral, J. P. **Composição química e digestibilidade do farelo de coco**. Piracicaba, 1976, 62p. [Dissertação de Mestrado-Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz-Universidade de São Paulo].
15. Steel, R. G. D.; Torrie, J. H. **Principles and procedures of statistics a biometrical approach**. New York: McGraw-Hill; 1980. 633p.
16. Tavares, M. et. al. Estudo das características físicas e químicas de coco ralado comercializado a varejo e de coco in natura com relação aos parâmetros legais vigentes. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 56(1): 105-12, 1996.

# Composição de ácidos graxos em óleos e gorduras de fritura

## Fatty acids composition in frying fats and oils

RIALA6/993

Maria do Rosário Viçeta LOPES<sup>1</sup>, Sabria AUED-PIMENTEL<sup>2</sup>, Miriam Solange Fernandes CARUSO<sup>2</sup>, Neuza JORGE<sup>3\*</sup>, Valter RUVIERI<sup>2</sup>

<sup>3\*</sup> Endereço para correspondência: Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos, IBILCE – UNESP, Rua Cristóvão Colombo, 2265, Jardim Nazareth, CEP 15054-000, São José do Rio Preto-SP, e-mail: njorge@eta.ibilce.unesp.br

<sup>1</sup> Instituto Adolfo Lutz (IAL) – São José do Rio Preto

<sup>2</sup> Instituto Adolfo Lutz (IAL) – Divisão de Bromatologia e Química – São Paulo

### RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar as alterações no perfil dos ácidos graxos em 25 amostras, óleo de soja (21) e gordura vegetal parcialmente hidrogenada (4), utilizados em processos de fritura de alimentos prontos para o consumo, comercializados em São José do Rio Preto, SP. Foi determinada a composição dos ácidos graxos daquelas amostras por cromatografia em fase gasosa e esta foi comparada com os valores médios de amostras de óleos de soja e gordura vegetal parcialmente hidrogenada de diferentes marcas comerciais, sem utilização, tomados como referência. Para as amostras de óleo de soja, de modo geral, observou-se uma diminuição na concentração dos ácidos graxos polinsaturados, sugerindo perdas nutricionais, e um aumento proporcional dos ácidos graxos saturados. Observou-se, também, moderada correlação positiva entre ácidos graxos saturados e porcentagem de compostos polares totais (CPT%) e negativa entre ácidos graxos polinsaturados e CPT. Entretanto, devido à ampla faixa de variação que a composição dos ácidos graxos do óleo de soja e, principalmente, das gorduras vegetais parcialmente hidrogenadas podem apresentar, os perfis observados nos óleos e gorduras após as frituras permaneceram característicos do óleo de soja e gorduras hidrogenadas sem uso.

**Palavras-Chave.** ácidos graxos, cromatografia gasosa, óleos e gorduras, fritura.

### ABSTRACT

The objective of this study was to analyze changes in the fatty acid profile of twenty five samples of soybean oil (21) and partially hydrogenated vegetable fat (4), used in the frying process of foods in São José do Rio Preto city, SP, Brazil. The fatty acid composition determined in those samples by gas chromatography was compared to the average values obtained in non-used samples of different brands of soybean oil and partially hydrogenated vegetable fat, taken as reference. A decreasing in the polyunsaturated fatty acids concentration was observed in the soybean oil samples, suggesting nutritional losses, as well as a proportional increasing of saturated fatty acids. There was also a positive moderate correlation between saturated fatty acids and the percentage of total polar compounds (%TPC), and a negative correlation between polyunsaturated fatty acids and %TPC. However, due to the large range of fatty acid composition in soybean oil and, mainly, in partially hydrogenated vegetable fat samples, the fatty acid profiles observed, after the frying process, remained characteristic of non-used oils and fats.

**Key Words.** fatty acids, gas chromatography, oils and fats, fried food.

### INTRODUÇÃO

O processo de fritura, caracterizado pela imersão do produto alimentício em óleo quente, é um método rápido e prático de preparo de alimentos<sup>23</sup>.

A alteração dos óleos submetidos à fritura envolve a formação de uma ampla variedade de compostos, em diferentes níveis, que dependem de variáveis como tipos de produto e

gordura utilizada, tempo e temperatura, se o processo é contínuo ou descontínuo, etc, resultando numa complexa mistura de produtos oxidados e materiais graxos polimerizados<sup>13</sup>.

A formação dos compostos de degradação tais como monômeros, dímeros, polímeros e compostos cíclicos de diferentes polaridades, com ou sem oxigênio, é de grande interesse sob o ponto de vista fisiológico e nutricional, pois os compostos tornam-se parte da dieta ao permanecer dissolvidos

no óleo de fritura e incorporados ao alimento frito<sup>19</sup>. Os possíveis riscos à saúde envolvidos no consumo de gorduras aquecidas e/ou oxidadas são predisposição à aterosclerose, ação mutagênica ou carcinogênica<sup>9,38</sup>.

Além do aspecto nutricional, existe o interesse analítico, uma vez que o teor daqueles compostos acumulados no óleo desde o início da fritura está relacionado com a sua alteração total<sup>19</sup>. Entre os parâmetros que medem alteração dos óleos e gorduras empregados em frituras está a percentagem de compostos polares totais, formados a partir dos triacilglicerídeos. Considera-se que o descarte de uma amostra submetida ao processo de fritura deve acontecer quando o seu teor de compostos polares se encontrar acima de 25%, limite geralmente estabelecido nas legislações internacionais. Outro parâmetro considerado é a percentagem de ácidos graxos livres, para os quais, alguns países estabelecem limites máximos em torno de 1 e 2,5%. Ácidos graxos livres, presentes em teores superiores a 2,5%, geralmente proporcionam produtos de baixa qualidade<sup>10,11,14,15,27,33</sup>.

No Brasil ainda não existe uma legislação específica para o descarte de óleos de frituras, o que possibilita o uso abusivo destas matérias graxas, com repercussão na saúde pública<sup>19</sup>.

A avaliação do perfil de ácidos graxos de óleos e gorduras submetidas à fritura, tais como óleo de soja e gordura vegetal hidrogenada, pode fornecer dados importantes sobre as alterações para cada ácido graxo ocorridas durante este processo.

Alguns estudos têm demonstrado que a alteração do óleo de soja refinado é influenciada pela quantidade de ácidos graxos mais insaturados presentes na amostra e que a perda de ácido linolênico pode se situar entre 20 e 25%<sup>25,37</sup>.

O objetivo deste trabalho foi avaliar as alterações no perfil dos ácidos graxos em 25 amostras de óleos e gorduras utilizados em processos de fritura, comparando-as com os valores médios obtidos em amostras comerciais sem utilização e buscando correlações com a porcentagem de compostos polares totais, a qual é um parâmetro empregado para avaliação de descarte de óleos de fritura.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Amostras

Foram coletadas 25 amostras de óleos e gorduras utilizadas em processos de fritura de diversos tipos de alimentos, como batatas, salgadinhos, pastéis, produtos cárneos e empanados. Das 25 amostras analisadas, 21 eram de óleo de soja, usadas em barracas, feiras livres, lanchonetes, pastelarias, restaurantes e cozinhas industriais, e apenas 4 eram de gordura vegetal hidrogenada, empregadas principalmente em cadeias de *fast food*. Todas as amostras eram procedentes de estabelecimentos comerciais de diferentes pontos da cidade de São José do Rio Preto-SP, sendo uma amostra de cada estabelecimento.

As amostras foram coletadas durante o processo de

fritura, ou seja, os óleos e as gorduras se encontravam em uso, sendo o tempo de utilização destes desconhecido. Após a coleta, as mesmas foram conservadas em *freezer*, em frascos de vidro de cor âmbar, à temperatura aproximada de  $-20^{\circ}\text{C}$ , e descongeladas imediatamente antes de serem analisadas.

Visando avaliar a variação da composição em ácidos graxos de óleos de soja disponíveis no comércio foram analisadas 14 marcas diferentes, as quais foram denominadas como óleos de soja sem uso e utilizadas para comparação com as amostras de óleos de fritura.

### Métodos

#### Determinação dos ácidos graxos

Os ésteres metílicos de ácidos graxos foram preparados segundo a norma IUPAC 2301<sup>18</sup> para os óleos com acidez inferior a 2%, expressa em ácido oléico; para amostras de óleos com acidez superior a 2%, foi utilizado o método descrito nas Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz<sup>16</sup>.

#### Preparação de ésteres metílicos de ácidos graxos - Método IUPAC

Cerca de 100 mg da amostra foi dissolvida em 3 mL de n-hexano em um tubo de vidro de 20 mL com tampa. Foi adicionado 0,2 mL de solução metanólica de KOH 2 N e o tubo foi submetido a agitação vigorosa por 30 segundos, em agitador do tipo Vortex. Foram adicionados 3 mL de solução de cloreto de sódio saturada. Após a separação das fases procedeu-se à injeção de 0,2 a 1  $\mu\text{L}$  da fase superior no cromatógrafo a gás.

#### Método de transesterificação - Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz

Cerca de 25 mg da amostra (óleo ou gordura vegetal) foi transferida para um frasco de transesterificação. Foram adicionados 3 mL de n-hexano, 15 mL de solução de metanol com 2% de ácido sulfúrico (v/v) e algumas pérolas de vidro. O frasco foi aquecido em refluxo durante uma hora e, posteriormente, resfriado. Foram adicionados 40 mL de solução de cloreto de sódio saturada, seguido de agitação por um minuto; mais solução de cloreto de sódio saturada foi adicionada até que a fase orgânica, onde estão dissolvidos os ésteres metílicos, atingisse a parte afunilada do frasco. Após a separação nítida das fases, foi utilizada a fase superior na análise cromatográfica.

#### Características do aparelho e condições de operação:

Cromatógrafo a gás, marca Shimadzu, modelo GC-17A com detector de ionização de chama, coluna capilar de sílica fundida CP-Sil 88 de 50 m, com diâmetro interno de 0,25 mm e espessura do filme 0,20  $\mu\text{m}$ . Temperatura programada da coluna:  $60^{\circ}\text{C}$  (por 2 min),  $15^{\circ}\text{C}/\text{min}$  até  $135^{\circ}\text{C}$  (por 1 min),  $3^{\circ}\text{C}/\text{min}$  até  $215^{\circ}\text{C}$  (por 5 min); temperatura do injetor:  $220^{\circ}\text{C}$ ; temperatura do detector:  $220^{\circ}\text{C}$ ; gás de arraste: hidrogênio, velocidade linear 22 mL/min; razão de divisão da amostra 1:50.

A identificação dos ácidos graxos foi realizada através da comparação dos tempos de retenção de padrões puros de

ésteres metílicos de ácidos graxos com os dos componentes separados das amostras. A quantificação foi feita por normalização de área<sup>4,17</sup>.

#### **Determinação de compostos polares totais**

Foi aplicado o método cromatográfico, proposto por Dobarganes et al<sup>12</sup>. Um grama da amostra de óleo, pesado em um béquer de 25 mL, foi transferido quantitativamente com auxílio de cerca de 2 mL de hexano:éter etílico (90:10) para uma coluna de vidro, com 1 cm de diâmetro e 30 cm de comprimento, previamente preparada.

**Preparação da coluna:** em béquer de 50mL foram pesados 5 gramas de sílica gel, granulometria de 0,063-0,200 mm, marca Merck, nº 7734 ou equivalente, previamente seca em estufa a 105°C/1 hora, resfriada à temperatura ambiente em dessecador e agitada por 10 minutos para homogeneização das partículas. Foram adicionados cerca de 11 mL da mistura de hexano:éter etílico (90:10) e, utilizando um funil pequeno, a mistura homogênea foi transferida, de uma só vez à coluna, cuja extremidade inferior foi revestida cuidadosamente por uma camada de algodão. A sílica residual foi transportada para a coluna com 2 mL de hexano:éter etílico (90:10). Em seguida, foram adicionados aproximadamente 1 grama de areia tratada (camada de 1 cm) para facilitar a posterior fixação da amostra. As paredes do funil e bordas da coluna foram lavadas, para arrastar a sílica e areia aderidas. O solvente em excesso foi eliminado, sem que a sílica ficasse descoberta.

A fração apolar foi eluída com a mistura de solventes hexano:éter etílico (90:10) e a fração polar com éter etílico, empregando 50 mL em cada eluição. As frações polar e apolar foram recolhidas, separadamente. O solvente das frações foi evaporado em rotavapor com sistema de vácuo, e após a secagem efetuada a pesagem de cada fração.

#### **Determinação de ácidos graxos livres**

A porcentagem de ácidos graxos livres foi expressa em ácido oléico. Foi utilizado o método AOCS Cd 3d-63 (1993)<sup>3</sup>.

#### **Análise estatística**

Foram calculados os coeficientes de correlação de Pearson<sup>29</sup>, para os compostos polares totais das amostras de óleo de soja submetidas à fritura contra o total de ácidos graxos saturados, mono e polinsaturados (*cis* e *trans*).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A Tabela 1 apresenta a composição percentual, em ácidos graxos, das amostras analisadas para os óleos de soja e, a Tabela 2, para as gorduras vegetais hidrogenadas. É importante salientar que, para a análise da composição percentual em ácidos graxos, foram eleitas amostras que apresentaram teores de compostos polares ao redor de 18% (Tabela 3). Os resultados foram

comparados com o perfil de ácidos graxos das 14 amostras de óleos de soja adquiridas do comércio, sem utilização (Tabela 4).

A composição em ácidos graxos das amostras de óleos de soja e gorduras hidrogenadas mostra que existem diferenças entre eles, conforme Tabelas 1 e 2, respectivamente. A linha correspondente a "outros", em ambas as tabelas, refere-se àqueles ácidos graxos cuja concentração não supera 0,1% na amostra.

Enquanto os óleos de soja apresentaram maiores valores para ácidos polinsaturados, de 45,19 a 55,97%, com porcentagens de ácido linolênico variando entre 2,17 e 4,99%, as gorduras hidrogenadas apresentaram valores bem inferiores para esses ácidos polinsaturados, variando de 4,07 a 18,05%, com 0,12 a 0,38% de ácido linolênico.

Os resultados da Tabela 3 indicam que, dentre as amostras analisadas, a amostra 14, apresentou uma das menores concentrações em ácidos graxos polinsaturados (47,07%) e foi também a que apresentou maior resultado de alteração global, em compostos polares (45,69%)<sup>23</sup>.

A diminuição dos ácidos graxos linoléico e linolênico pode representar perdas nutricionais, uma vez que são ácidos graxos essenciais não sintetizados pelo organismo humano<sup>21,22</sup>. Damy<sup>8</sup>, avaliando o nível de alteração de óleos e gorduras, observou perda de 1,3% no teor de ácido linoléico da amostra final de óleo de soja refinado submetido à temperatura de 180°C. Verificou, também, pequeno aumento percentual dos ácidos graxos saturados. Outros autores também relataram o aumento do grau de saturação de óleos associado ao aumento do tempo de fritura<sup>1,34</sup>.

As legislações do Chile, França e Bélgica não permitem a utilização de óleos vegetais com mais de 2% de ácido linolênico em processos de fritura, devido à rápida formação de monômeros cíclicos, os quais são considerados compostos de risco do ponto de vista fisiológico<sup>14,26,27</sup>. Segundo a legislação brasileira, através da Resolução n.º 482/99-ANVISA<sup>7</sup>, o óleo de soja refinado pode apresentar de 4,0 a 11,0% em ácido linolênico. De acordo com a literatura, esses valores indicam que o óleo de soja não é adequado para uso em frituras intermitentes<sup>2,25,27</sup>.

Com relação ao ácido palmítico, foi possível observar que permaneceu praticamente sem alteração na maioria das amostras e o ácido esteárico apresentou-se ligeiramente aumentado na grande maioria das amostras quando comparadas com o perfil médio obtido das 14 amostras de referência (Tabela 1).

Os resultados apresentados nas Tabelas 4 e 5 correspondem às variações da composição em ácidos graxos encontradas para os valores obtidos de 21 amostras analisadas de óleos de soja e 4 amostras de gorduras vegetais hidrogenadas, respectivamente. Os valores, em porcentagem de área, estão distribuídos em ácidos graxos saturados, monoinsaturados e polinsaturados, com conteúdos específicos dos ácidos linoléico (C<sub>18:2</sub>) e linolênico (C<sub>18:3</sub>), valores mínimo e máximo observados entre as amostras e, ainda, o coeficiente de variação encontrado. Também foram discriminadas, porcentagens dos ácidos graxos *trans* isômeros monoinsaturados e polinsaturados.

**Tabela 1.** Composição percentual em ácidos graxos de óleo de soja utilizados para fritura em estabelecimentos do ramo de produção de alimentos para consumo imediato.

| Amostras | Saturados | Ácidos Graxos                           |                               |                      |              |              |                          |                                    |                |                |                          |
|----------|-----------|---|-------------------------------|----------------------|--------------|--------------|--------------------------|------------------------------------|----------------|----------------|--------------------------|
|          |           | Mono cis<br>(C16:1+<br>C18:1+<br>C20:1) | Poli cis<br>(C18:2+<br>C18:3) | C18:1 cis<br>(w9+w7) | C18:2<br>cis | C18:3<br>cis | Mono<br>trans<br>(C18:1) | Poli<br>trans<br>(C18:2+<br>C18:3) | C18:2<br>trans | C18:3<br>trans | Não<br>Identi-<br>ficado |
| 03       | 18,44     | 25,31                                   | 50,41                         | 24,98                | 47,19        | 3,23         | 0,21                     | 3,09                               | 1,17           | 1,92           | 2,55                     |
| 04       | 19,52     | 25,62                                   | 49,27                         | 25,28                | 46,79        | 2,48         | 0,30                     | 2,39                               | 1,28           | 1,11           | 2,91                     |
| 06       | 19,54     | 21,13                                   | 49,72                         | 20,82                | 46,00        | 3,72         | 0,15                     | 2,17                               | 0,84           | 1,33           | 7,30                     |
| 10       | 17,71     | 25,70                                   | 52,16                         | 25,36                | 49,16        | 3,00         | 0,16                     | 2,14                               | 1,15           | 0,99           | 2,26                     |
| 12       | 17,13     | 24,88                                   | 53,99                         | 24,56                | 50,42        | 3,57         | 0,22                     | 1,78                               | 0,84           | 0,94           | 1,50                     |
| 13       | 16,32     | 25,46                                   | 54,84                         | 25,13                | 50,01        | 4,84         | 0,04                     | 1,07                               | 0,36           | 0,71           | 2,50                     |
| 14       | 19,59     | 27,74                                   | 47,07                         | 27,39                | 44,90        | 2,17         | 0,27                     | 2,78                               | 1,28           | 1,50           | 2,55                     |
| 25       | 16,64     | 25,21                                   | 54,67                         | 24,83                | 50,05        | 4,62         | 0,09                     | 1,15                               | 0,54           | 0,61           | 2,20                     |
| 34       | 17,84     | 26,84                                   | 52,77                         | 26,42                | 48,10        | 4,67         | 0,07                     | 1,08                               | 0,35           | 0,73           | 1,60                     |
| 35       | 21,06     | 29,78                                   | 45,19                         | 28,98                | 42,11        | 3,08         | 0,43                     | 1,41                               | 0,61           | 0,80           | 2,13                     |
| 38       | 16,62     | 25,78                                   | 54,72                         | 25,44                | 50,38        | 4,34         | 0,03                     | 1,41                               | 0,44           | 0,97           | 1,63                     |
| 39       | 17,00     | 26,11                                   | 52,34                         | 25,72                | 49,09        | 3,25         | 0,11                     | 2,42                               | 1,02           | 1,40           | 2,30                     |
| 40       | 17,60     | 26,34                                   | 52,54                         | 25,96                | 48,40        | 4,14         | 0,05                     | 1,71                               | 0,46           | 1,25           | 2,08                     |
| 46       | 17,30     | 23,95                                   | 55,87                         | 23,62                | 50,88        | 4,99         | 0,04                     | 1,28                               | 0,38           | 0,90           | 1,71                     |
| 47       | 19,21     | 24,41                                   | 53,17                         | 23,99                | 48,54        | 4,63         | 0,04                     | 1,23                               | 0,38           | 0,85           | 1,96                     |
| 48       | 18,39     | 25,16                                   | 53,28                         | 24,80                | 49,20        | 4,08         | 0,04                     | 1,38                               | 0,46           | 0,92           | 1,88                     |
| 52       | 16,68     | 24,67                                   | 55,97                         | 24,32                | 51,48        | 4,49         | 0,05                     | 1,23                               | 0,37           | 0,86           | 1,54                     |
| 53       | 17,28     | 25,46                                   | 53,33                         | 25,07                | 48,97        | 4,36         | 0,22                     | 0,63                               | 0,64           | 1,12           | 2,03                     |
| 56       | 17,93     | 26,76                                   | 51,81                         | 26,39                | 47,24        | 4,57         | 0,08                     | 0,63                               | 0,25           | 0,38           | 2,97                     |
| 57       | 18,35     | 27,59                                   | 51,34                         | 27,19                | 47,08        | 4,26         | 0,04                     | 0,72                               | 0,27           | 0,45           | 2,17                     |
| 58       | 18,37     | 26,23                                   | 51,60                         | 25,83                | 47,95        | 3,65         | 0,06                     | 1,66                               | 0,63           | 1,03           | 2,23                     |

Saturados: Somatória dos ácidos graxos C8:0, C14:0, C16:0, C17:0, C18:0, C20:0, C22:0 e C24:0

Pela Tabela 4 observa-se que a composição média em ácidos graxos saturados dos óleos de soja de fritura foi de 18,02% com valores mínimo e máximo de 16,32 a 21,06%, respectivamente, indicando um aumento de 14,7% em relação à média das amostras comerciais sem utilização. Quanto aos ácidos graxos insaturados, observa-se um aumento nos teores de monoinsaturados (13,2%) e uma redução nos teores de polinsaturados (13,7%). O ácido linolênico (C<sub>18:3</sub>) foi o que apresentou, em média, a maior porcentagem de perda (32,0%) em relação à média das amostras sem utilização.

Observa-se, ainda, pela Tabela 4, a presença de ácidos graxos *trans* isômeros nas amostras analisadas de óleos de soja de fritura. Os valores variaram de 0,03 a 0,43% para isômeros *trans* originados a partir de ácidos graxos monoinsaturados e de 0,63 a 3,09% para isômeros *trans* de ácidos graxos polinsaturados, apresentando coeficientes de variação de 84,61

e 39,63%, respectivamente. Entretanto, também foi observado, em menor quantidade, nas amostras de óleos de soja sem uso, isômeros *trans* de ácidos graxos polinsaturados. Estes isômeros provavelmente se formaram em consequência de processo inadequado de refino.

Dobarganes e Perez-Camino<sup>11</sup> realizaram um estudo sobre a composição em ácidos graxos de óleos de soja, oliva e palma, submetidos a diferentes graus de termoxidação. Os resultados encontrados permitiram deduzir que as alterações nestes óleos ocorreram preferencialmente nos ácidos graxos mais insaturados e nos triacilgliceróis com mais elevada insaturação total.

Pela análise global dos resultados para as amostras de óleo de soja (Tabela 4), pode-se verificar que o processo de fritura leva a uma diminuição na concentração dos ácidos graxos polinsaturados e, por consequência, um aumento proporcional dos ácidos graxos saturados e monoinsaturados.

**Tabela 2.** Composição percentual em ácidos graxos de gorduras hidrogenadas utilizadas para fritura em estabelecimentos do ramo de produção de alimentos para consumo imediato.

| Ácidos Graxos                               | GVH** | Média | DP    | Amostras |       |       |       |
|---|-------|-------|-------|----------|-------|-------|-------|
|   |       |       |       | 07       | 27    | 29    | 36    |
| C <sub>8</sub>                              |       |       |       | 0,04     | 0,04  | 0,08  | 0,07  |
| C <sub>14</sub>                             |       | 0,29  | 0,24  | 0,25     | 0,73  | 0,81  | 0,29  |
| C <sub>16</sub>                             |       | 13,65 | 3,03  | 13,35    | 21,79 | 22,70 | 14,84 |
| C <sub>16:1</sub>                           |       |       |       | 0,18     | 2,00  | 0,41  | 0,37  |
| C <sub>17</sub>                             |       |       |       | 0,15     | 0,09  | 0,09  | 0,12  |
| C <sub>18</sub>                             |       | 10,02 | 4,42  | 7,23     | 4,91  | 3,89  | 5,65  |
| C <sub>18:1 trans</sub>                     |       | 21,10 | 8,47  | 21,04    | 18,98 | 15,54 | 25,37 |
| C <sub>18:1</sub> ( $\omega_9 + \omega_7$ ) |       | 36,75 | 8,29  | 41,55    | 31,22 | 31,40 | 44,76 |
| C <sub>18:2 trans</sub>                     |       | 5,74  | 2,74  | 5,39     | 4,15  | 4,06  | 2,02  |
| C <sub>18:2</sub>                           |       | 10,72 | 11,33 | 7,44     | 14,96 | 17,67 | 3,95  |
| C <sub>18:3 trans</sub>                     |       | 1,17  | 1,27  | 0,39     | 0,35  | 0,32  | 0,27  |
| C <sub>20</sub>                             |       | 0,38  | 0,36  | 0,33     | 0,22  | 0,21  | 0,31  |
| C <sub>18:3</sub>                           |       | 1,27  | 1,20  | 0,24     | 0,21  | 0,38  | 0,12  |
| C <sub>20:1</sub>                           |       |       |       | 0,22     | 0,07  | 0,20  | 0,20  |
| C <sub>22</sub>                             |       |       |       | 0,39     | 0,31  | 0,12  | 0,34  |
| C <sub>24</sub>                             |       |       |       | 0,13     | 0,06  | 0,26  | 0,13  |
| NI  |       |       |       | 1,75     | 1,81  | 2,04  | 1,23  |
| Saturados                                   |       | 24,09 | 5,01  | 21,87    | 28,15 | 28,16 | 21,75 |
| Monoinsat. cis                              |       | 36,75 | 8,29  | 41,95    | 33,29 | 32,01 | 45,33 |
| Polinsaturados                              |       | 11,32 | 11,92 | 7,68     | 15,17 | 18,05 | 4,07  |
| - Linoléico                                 |       | 10,72 | 11,33 | 7,44     | 14,96 | 17,67 | 3,95  |
| - Linolênico                                |       | 1,27  | 1,20  | 0,24     | 0,21  | 0,38  | 0,12  |
| Mono trans                                  |       | 21,10 | 8,47  | 21,04    | 18,98 | 15,54 | 25,37 |
| Poli trans                                  |       | 6,91  | 3,05  | 5,78     | 4,50  | 4,38  | 2,29  |

GVH: Gordura Vegetal Hidrogenada; NI: não identificado

C<sub>8</sub>, ácido Caprílico; C<sub>14</sub>, ácido Mirístico; C<sub>16</sub>, ácido Palmítico; C<sub>16:1</sub>, ácido Palmitoléico; C<sub>17</sub>, ácido Margárico; C<sub>18</sub>, ácido Esteárico; C<sub>18:1</sub>, ácido Oléico; C<sub>18:2</sub>, ácido Linoléico; C<sub>18:3</sub>, ácido Linolênico; C<sub>20</sub>, ácido Araquídico; C<sub>20:1</sub>, ácido Gadoléico; C<sub>22</sub>, ácido Behênico; C<sub>24</sub>, ácido Lignocérico.\*\*Fonte: Badolato<sup>3</sup>.

A correlação dos compostos polares totais (CPT %) com os ácidos graxos saturados foi positiva e moderada ( $r = 0,7503$ ) e com os ácidos graxos polinsaturados foi negativa e moderada ( $r = -0,8117$ ), sendo ambas significativas ( $p < 0,001$ ). Para os outros ácidos graxos, as correlações não foram significativas como se pode observar nos resultados da Tabela 6. A legislação brasileira, através da Resolução n° 482/99, ANVISA<sup>7</sup>, item 2.2.2.9, estabelece para óleos vegetais refinados, limites máximos e mínimos na composição em ácidos graxos. Existe uma ampla faixa prevista de variação para a porcentagem de

ácidos graxos, permitindo que haja, entre marcas distintas, teores dos ácidos graxos diferentes. Desta forma, para amostras de óleos de fritura colhidas aleatoriamente e de origem desconhecida, torna-se incorreto afirmar que as variações encontradas sejam realmente devido às perdas por degradação.

Com relação às gorduras vegetais parcialmente hidrogenadas, devido à ausência de amostras originais, utilizou-se neste estudo, valores médios para a composição em ácidos graxos obtidos através da literatura<sup>5,6,30</sup>.

**Tabela 3.** Composição percentual em ácidos graxos saturados, mono e polinsaturados e porcentagem de Compostos Polares Totais (CPT) de óleos de soja utilizados para fritura em estabelecimentos do ramo de produção de alimentos para o consumo imediato.

| Amostras | Saturados | Monoinsaturados Cis | Polinsaturados Cis | Monoinsaturados <i>Trans</i> | Polinsaturados <i>Trans</i> | Compostos Polares Totais | Índice de Acidez |
|----------|-----------|---------------------|--------------------|------------------------------|-----------------------------|--------------------------|------------------|
| 03       | 18,44     | 25,19               | 50,42              | 0,21                         | 3,09                        | 35,83                    | 0,3787           |
| 04       | 19,52     | 25,50               | 49,27              | 0,30                         | 2,39                        | 37,99                    | 0,3891           |
| 06       | 19,54     | 21,03               | 49,72              | 0,15                         | 2,17                        | 31,50                    | 0,3887           |
| 10       | 17,71     | 25,58               | 52,16              | 0,16                         | 2,14                        | 24,22                    | 0,5734           |
| 12       | 17,13     | 24,78               | 53,99              | 0,22                         | 1,78                        | 22,47                    | 0,4937           |
| 13       | 16,32     | 25,35               | 54,85              | 0,04                         | 1,07                        | 20,95                    | 0,4310           |
| 14       | 19,59     | 27,63               | 47,07              | 0,27                         | 2,78                        | 45,69                    | 1,4048           |
| 25       | 16,63     | 25,07               | 54,67              | 0,09                         | 1,15                        | 22,40                    | 0,6458           |
| 34       | 17,84     | 26,65               | 52,77              | 0,07                         | 1,08                        | 20,73                    | 0,5935           |
| 35       | 21,06     | 29,30               | 45,19              | 0,43                         | 1,41                        | 34,25                    | 1,5067           |
| 38       | 16,62     | 25,67               | 54,72              | 0,03                         | 1,41                        | 18,16                    | 0,5137           |
| 39       | 17,00     | 26,01               | 52,34              | 0,11                         | 2,42                        | 25,82                    | 0,5503           |
| 40       | 17,60     | 26,25               | 52,54              | 0,05                         | 1,71                        | 22,78                    | 0,4638           |
| 46       | 17,30     | 23,84               | 55,87              | 0,04                         | 1,28                        | 19,75                    | 0,3423           |
| 47       | 19,28     | 24,21               | 53,17              | 0,04                         | 1,23                        | 25,30                    | 0,4464           |
| 48       | 18,39     | 25,03               | 53,28              | 0,04                         | 1,38                        | 31,83                    | 0,4254           |
| 52       | 16,68     | 24,55               | 55,97              | 0,05                         | 1,23                        | 17,26                    | 0,2980           |
| 53       | 17,28     | 25,34               | 53,33              | 0,22                         | 1,76                        | 20,98                    | 0,5935           |
| 56       | 17,93     | 26,62               | 51,81              | 0,08                         | 0,63                        | 27,36                    | 0,5503           |
| 57       | 18,35     | 27,46               | 51,34              | 0,04                         | 0,72                        | 35,81                    | 0,3787           |
| 58       | 18,37     | 26,10               | 51,60              | 0,06                         | 1,66                        | 38,01                    | 0,5935           |

**Tabela 4.** Variação da composição percentual de ácidos graxos para amostras de óleos de soja de fritura.

| Ácidos Graxos     | *Óleos de soja sem uso |      | Óleos de Fritura |        |        | CV    |
|-------------------|------------------------|------|------------------|--------|--------|-------|
|                   | Média                  | DP   | Média            | Mínimo | Máximo |       |
| Saturados         | 15,71                  | 0,74 | 18,02 ± 1,25     | 16,32  | 21,06  | 6,94  |
| Monoinsaturados   | 22,72                  | 1,12 | 25,71 ± 1,67     | 21,13  | 29,78  | 6,50  |
| Polinsaturados    | 60,46                  | 2,19 | 52,19 ± 2,73     | 45,19  | 55,97  | 5,23  |
| - Linoléico       | 54,72                  | 1,63 | 48,28 ± 2,19     | 42,11  | 51,48  | 4,54  |
| - Linolênico      | 5,75                   | 0,73 | 3,91 ± 0,80      | 2,17   | 4,99   | 20,46 |
| Mono <i>trans</i> | -                      | -    | 0,13 ± 0,11      | 0,03   | 0,43   | 84,61 |
| Poli <i>trans</i> | 1,07                   | 0,79 | 1,64 ± 0,65      | 0,63   | 3,09   | 39,63 |

\* Dados obtidos, como referência, da análise de diferentes marcas comerciais de óleos de soja, sem utilização.

DP: Desvio Padrão; CV: Coeficiente de Variação.

Observa-se pela Tabela 5, que as gorduras vegetais hidrogenadas empregadas no processo de fritura apresentaram valor médio para ácidos graxos saturados de 24,98%, cuja variação foi de 21,75 a 28,16%, indicando um aumento de 3,7% em relação ao valor médio das amostras da literatura. Para os ácidos graxos monoinsaturados, a média foi de 38,15%, variando de 32,01 a 45,33%, observando-se um acréscimo de 3,8% em relação à média das amostras comerciais sem utilização. Para os ácidos graxos polinsaturados o valor médio foi de 11,24%, com variação de 4,07 a 18,05, demonstrando uma variação 0,7% com relação ao valor médio das amostras de referência da literatura. As gorduras vegetais hidrogenadas comerciais podem apresentar uma grande variabilidade no perfil dos ácidos graxos, dependendo das condições empregadas nos processos de hidrogenação. Esta variabilidade foi refletida pelos altos valores nos desvios padrão obtidos para as amostras comerciais sem utilização (Tabela 5), e, portanto, não foi possível, neste experimento, concluir sobre as alterações no perfil daqueles componentes.

Quanto aos isômeros *trans* presentes nas gorduras parcialmente hidrogenadas observou-se que estes se apresentaram com teores superiores aos dos óleos, o que já é uma característica própria destas gorduras. As percentagens foram, em média, de 20,23 para ácidos graxos monoinsaturados *trans* e 4,24 para os polinsaturados *trans*. Os coeficientes de

variação foram 20,31 e 34,11%, respectivamente.

As gorduras hidrogenadas são obtidas pelo processo industrial de hidrogenação, que permite a conversão de óleos vegetais líquidos em alguns tipos de gorduras com diferentes níveis de consistência, características de plasticidade e comportamento térmico específico, tornando-as melhores adaptadas para o uso em panificação e frituras. As gorduras hidrogenadas apresentam maior estabilidade frente às condições drásticas do processo de fritura<sup>20</sup>. Porém, o aparecimento de isômeros *trans* durante a hidrogenação é proporcional ao emprego das condições inerentes ao processo, tais como tempo e temperatura de reação elevados<sup>19</sup>. A formação desses ácidos graxos durante o processo de hidrogenação industrial chega a cerca de 50%<sup>24</sup>.

Os ácidos graxos *trans* podem ser formados durante os processos de extração, refino, armazenamento, hidrogenação e, ainda, durante o processo de fritura, a partir tanto de ácidos graxos monoinsaturados como de polinsaturados<sup>32,35</sup>. Estudos clínicos têm demonstrado os efeitos negativos causados pela alta ingestão de ácidos graxos *trans*<sup>31,35</sup>. A partir de 1990 esse problema passou a merecer maior atenção, pois cientistas holandeses comprovaram que ao serem digeridos pelo organismo, os ácidos graxos *trans* se comportam como ácidos graxos saturados, contribuindo para o aumento da lipoproteinemia de baixa densidade<sup>28</sup>.

**Tabela 5.** Variação da composição percentual de ácidos graxos para amostras de gorduras vegetais hidrogenadas de fritura.

| Ácidos Graxos (%) | GVH** |       | Média        | Gorduras de Fritura |        | CV    |
|-------------------|-------|-------|--------------|---------------------|--------|-------|
|                   | Média | DP    |              | Mínimo              | Máximo |       |
| Saturados         | 24,09 | 5,01  | 24,98 ± 3,75 | 21,75               | 28,16  | 14,37 |
| Monoinsaturados   | 36,75 | 8,29  | 38,15 ± 6,51 | 32,01               | 45,33  | 17,06 |
| Polinsaturados    | 11,32 | 11,92 | 11,24 ± 6,48 | 4,07                | 18,05  | 57,65 |
| - Linoléico       | 10,72 | 11,33 | 11,01 ± 6,39 | 3,95                | 17,67  | 58,04 |
| - Linolênico      | 1,27  | 1,20  | 0,24 ± 0,11  | 0,12                | 0,38   | 45,80 |
| Mono <i>trans</i> | 21,10 | 8,47  | 20,23 ± 4,11 | 15,54               | 25,37  | 20,31 |
| Poli <i>trans</i> | 6,91  | 3,05  | 4,24 ± 1,44  | 2,29                | 5,78   | 34,11 |

GVH: Gordura Vegetal Hidrogenada; CV: Coeficiente de Variação.

\*\*Fonte: Badolato<sup>3</sup>.

**Tabela 6.** Coeficientes de correlação linear e equações relacionando compostos polares totais (CPT %) e ácidos graxos saturados (AGS), monoinsaturados (AGM), polinsaturados (AGP), obtidos para os óleos de soja submetidos à fritura.

| Ácidos Graxos*    | Equação                  | r       | P       |
|-------------------|--------------------------|---------|---------|
| AGS               | $y = -59,3028 + 4,8192x$ | 0,7503  | 0,0001  |
| AGM- <i>cis</i>   | $y = -12,8094 + 1,5788x$ | 0,3252  | 0,1502  |
| AGP- <i>cis</i>   | $y = 150,1336 - 2,3481x$ | -0,8117 | <0,0001 |
| AGM- <i>trans</i> | $y = 23,0725 + 35,0250x$ | 0,4848  | 0,0258  |
| AGP- <i>trans</i> | $y = 18,3074 + 5,6432x$  | 0,4670  | 0,0328  |

\* AGS: ácidos graxos saturados, AGM: ácidos graxos monoinsaturados, AGP: ácidos graxos polinsaturados



Os ácidos graxos *trans* competem com ácidos graxos essenciais, servindo como substratos alternativos das enzimas que atuam no metabolismo destes ácidos graxos, resultando na formação de eicosanóides sem atividade biológica, podendo, também, bloquear o metabolismo dos ácidos graxos essenciais, atuando como inibidores enzimáticos<sup>31</sup>.

### CONCLUSÕES

Nas amostras de óleo de soja submetidas à fritura observou-se uma diminuição na concentração dos ácidos graxos polinsaturados, sugerindo perdas nutricionais e um aumento proporcional dos ácidos graxos saturados. Esta tendência foi confirmada pela correlação positiva entre a porcentagem de compostos polares totais e ácidos graxos saturados, e negativa entre compostos polares totais (%) e ácidos graxos polinsaturados.

Entretanto, devido à ampla faixa de variação que a composição dos ácidos graxos do óleo de soja pode apresentar, e, principalmente, as amostras comerciais de gorduras vegetais parcialmente hidrogenadas, os perfis observados nos óleos e gorduras após os processos de fritura não fornecem parâmetros objetivos para avaliar o descarte dos óleos utilizados.

Os resultados obtidos reforçam a utilização do parâmetro porcentagem de compostos polares como indicativo de descarte e demonstram que valores ao redor de 18% refletem o aumento de ácidos graxos saturados e diminuição de ácidos graxos polinsaturados nos óleos submetidos à fritura, acarretando, portanto, perdas nutricionais.

### REFERÊNCIAS

1. Al-Kahtani, H.A. Survey of used frying oils from restaurants. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, 68: 857-62, 1991.
2. Ans, V. G.; Mattos, E. S.; Jorge, N. Avaliação da qualidade dos óleos de fritura usados em restaurantes, lanchonetes e similares. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, 19(3): 413-9, 1999.
3. American Oil Chemists' Society. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society**. 4<sup>th</sup> ed. Champaign, IL, A.O.C.S., 1993 (A.O.C.S. Official Method Cd 3d-63: Fatty acid composition by gas chromatography).
4. American Oil Chemists' Society. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society**. 4<sup>th</sup> ed. Champaign, IL, A.O.C.S., 1995 (A.O.C.S. Official Method Ce 1-62: Fatty acid composition by gas chromatography).
5. Badolato, E.S.G. **Aspectos analíticos da determinação de ácidos graxos trans em margarinas e gorduras vegetais hidrogenadas**. São Paulo, 2000 [Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo].
6. Basso, R.; Almeida-Gonçalves, I.; Mancini-Filho, J. Avaliação qualitativa e quantitativa dos ácidos graxos trans em gorduras vegetais hidrogenadas. **Bol. Soc. Bras. Ciênc. Tecnol. Aliment.**, 33: 57-63, 1999.
7. Brasil. Leis, decretos, etc. - Resolução nº 482, de 23 de setembro de 1999. Regulamento Técnico para fixação de identidade e qualidade de óleos e gorduras vegetais. **Diário Oficial da União**, Brasília-DF, v. 196. 13 out. 1999. Seção I, p. 82-7.
8. Damy, P.C. **Alterações físico-químicas de óleo de soja e da gordura hidrogenada durante o processo de fritura descontínua de batatas**. São José do Rio Preto, 2001. [Dissertação de Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - Universidade Estadual Paulista].
9. Dobarganes, M. C.; Márquez-Ruiz, G. Calidad de las grasas de fritura en el sector de restauración de Andalucía. **Grasas y Aceites**, 46(2): 115-120, 1995.
10. Dobarganes, M.C.; Márquez-Ruiz, G. Regulation of used frying fats and validity of quick tests for discarding the fats. **Grasas y Aceites**, 49: 331-5, 1998.
11. Dobarganes, M.C.; Pérez-Camino, M. C. Fatty acid composition: a useful tool for the determination of alteration level in heated fats. **Rev. Fr. Corps Gras.**, 35: 1352-63, 1988.
12. Dobarganes, M.C.; Velasco, J.; Dieffenbacher, A. Determination of polar compounds, polymerized and oxidized triacylglycerols, and diacylglycerols in oils and fats. **Pure Appl. Chem.**, 72: 1563-75, 2000.
13. Fedeli, E. The behaviour of olive oil during cooking and frying. In: Varela G; Bender, A. E.; Morton, I. A. (Ed.) **Frying of food: principles, changes, new approaches**. Chichester: Ellis Horwood, 1988, p. 52-81.
14. Firestone, D.; Stier, R.F.; Blumenthal, M. M. Regulation of frying fats and oils. **Food Technol.**, 45: 90-4, 1991.
15. Firestone, D. Worldwide regulation of frying fats and oils. **Inform**, 4(12): 1366-1371, 1993.
16. Instituto Adolfo Lutz. (São Paulo). **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. Métodos químicos e físicos para análise de alimentos, 3<sup>a</sup> ed., São Paulo, IMESP, 1985, v. 1, 266 p.
17. International Standard ISO 5508 - Animal and vegetable fats and oils - **Analysis by gas chromatography of methyl esters of fatty acids**. ISO 5508-1990 - 09-15.
18. IUPAC. **Standard methods for analysis of oils, fats and derivatives**. In: International Union of Pure and Applied Chemistry. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 7th. Ed., method 2301, 1987.
19. Jorge, N. Alterações em óleos de fritura. **Hig. Aliment.**, 11(52): 15-22, 1997.
20. Kawashima, L.M.; Soares, L.M.V. Gorduras em sorvetes nacionais: conteúdo, composição de ácidos graxos e teor de trans-isômeros. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, 13: 194-202, 1993.
21. Lawson, H. **Food oils and fat: technology, utilization and nutrition**. Chapman & Hall, 1995. 339 p.
22. Lillard, D. A. Effect of processing on chemical and nutritional changes in food lipids. **J. Food Protec.**, 46(1): 61-7, 1983.
23. Lopes, M. R. V. **Estudo comparativo entre métodos analíticos tradicionais e testes rápidos utilizados na avaliação da qualidade dos óleos e gorduras de fritura**. São José do Rio Preto, 2002. [Dissertação de Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos - Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - Universidade Estadual Paulista].
24. Mancini-Filho, J. Avaliação da participação dos ácidos graxos trans em processos metabólicos. In: **Ciências dos alimentos - avanços e perspectivas na América Latina**. 1997. 16p.
25. Márquez-Ruiz, G.; Tasioula-Margari, M.; Dobarganes, M.C. Quantitation and distribution of altered fatty acids in frying fats. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, 72: 1171-6, 1995.
26. Masson, L. et al. Comportamiento de aceite poliinsaturados en la preparación de patatas fritas para consumo inmediato: Formación de nuevos compuestos y comparación de métodos analíticos. **Grasas y Aceites**, 48(5): 273-281, 1997.
27. Masson, L. et al. Fat deterioration in deep fat frying «french fries» potatoes at restaurant and food shop sector. **Grasas y Aceites**, 50: 460-468, 1999.
28. Mensink, R.P.; Katan, M.B. Effect of dietary *trans* fatty acids on high-density and low-density lipoprotein cholesterol levels in health subjects. **N. Engl. J. Med.**, 323: 439-45, 1990.
29. Morettin, P. A.; Bussab, W.O. **Estatística básica**. 4<sup>a</sup> ed. São Paulo, Atual, 321 p., 1987.

30. Ovesen, L.; Leth, T.; Hansen, K. Fatty acid composition and contents of *trans* monounsaturated fatty acids in frying fats, and in margarines and shortenings marketed in Denmark. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, 75: 1079-83, 1998.
31. Padovesi, R.; Mancini-Filho, J. Ácidos graxos trans. In: Curi, R.; Pompéia, C.; Miyasaka, C. K.; Procópio, J. **Entendendo as gorduras**. São Paulo. Manoli, 2002. cap., 36. p. 509-21.
32. Palaez-Alvarez, V.M.; Szmrecsányi, T.; Tango, J.S. Determinants of technological innovation in the shortening industry. In: **International Meeting On Fats & Oils Technology**, Anais, Campinas, p.129-137, 1991.
33. Paul, S.; Mittal, G. S. Regulating the use of degraded oil/fat in deep-fat/oil food frying. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, 37(7): 635-62, 1997.
34. Pozo-Díez, R. M. **Estudio del proceso de fritura de alimentos frescos y congelados prefritos. Comportamiento del aceite de semilla de girasol de alto contenido en ácido oleico**. Alcalá de Henares, 1995. [Tese de Doutorado em Farmácia - Facultad de Farmacia - Universidad de Alcalá de Henares].
35. Santana, D.M.; Marques, M.M.; Rosa, C.A.R. Determinação por cromatografia gasosa da composição em ácidos graxos e teor de ácidos graxos *trans* oléico em algumas marcas de batata frita. **Bol. Soc. Bras. Cienc. Tecnol. Alim.**, 33: 64-9, 1999.
36. Takeoka, G. R.; Full, G. H.; Dao, L. T. Effect of heating on the characteristics and chemical composition of selected frying oils and fats. **J. Agric. Food Chem.**, 45: 3244-9, 1997.
37. Tyagi, V.K.; Vasishtha, A.K. Changes in the characteristics and composition of oils during deep-fat frying. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, 73: 499-505, 1996.
38. Varela, G.; Ruíz-Roso, B. Frying process in the relation fat/degenerative diseases. **Grasas y Aceites**, 4(3/4): 359-65, 1998.

# Queijo Minas Frescal: avaliação da Qualidade e Conformidade com a Legislação

## “Minas Frescal” cheese: evaluation of quality and its observance of Brazilian Guidelines

RIALA6/994

Berenice M. BRIGIDO<sup>1\*</sup>, Valéria P.S.FREITAS<sup>1</sup>, Elaine M.A.MAZON<sup>1</sup>, Beatriz PISANI<sup>1</sup>, Maria Ângela G. PRANDI<sup>1</sup>, Maria Helena C.R. PASSOS<sup>2</sup>

\* Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Instituto Adolfo Lutz – Laboratório I de Campinas - R. São Carlos, nº 720, CEP: 13025-420 - Campinas-SP.

e-mail: bbrigido@ial.sp.gov.br

<sup>2</sup> Grupo de Vigilância Sanitária – DIR XII-Campinas, - Av. Orozimbo Maia, nº 75, CEP: 13023-909 - Campinas-SP.

### RESUMO

O queijo Minas Frescal é um dos produtos de laticínios mais populares do Brasil. Este trabalho teve como objetivo avaliar os resultados obtidos nas análises de amostras de queijos Minas Frescal, verificando sua conformidade com a legislação, antes e após a publicação da Instrução Normativa nº 4/2004. Foram avaliadas 22 amostras, de diferentes marcas comerciais, com registro no Serviço de Inspeção Federal (SIF). As amostras foram colhidas pelas equipes de Vigilância Sanitária em estabelecimentos varejistas de municípios abrangidos pela Direção Regional de Saúde (DIR) de Campinas, de Piracicaba e de São João da Boa Vista, em atendimento ao Programa Paulista 2002 e Programa Paulista Biênio 2003-2004. A determinação do teor de umidade e de gordura no extrato seco foi realizada segundo metodologia descrita pelo IAL (1985), as análises microbiológicas (coliformes a 45°C, estafilococos coagulase positiva, *Salmonella* sp e *Listeria monocytogenes*) foram efetuadas conforme preconizado pela APHA (1992) e a análise da rotulagem foi realizada com base na Portaria nº 371/1997, do MAA, verificando se constava na lista de ingredientes a presença de aditivos não permitidos (ácido láctico). Os resultados obtidos, considerando-se a legislação em vigor no período de realização do Programa Paulista, demonstraram que 68,2% das amostras foram condenadas, sendo 31,8% devido aos parâmetros físico-químicos, 50,0% devido aos padrões microbiológicos e 36,4% por constar a presença de ácido láctico na rotulagem, indicando que a qualidade dos queijos Minas Frescal é insatisfatória. Quando os mesmos resultados foram avaliados considerando-se a legislação atualmente em vigor, verificou-se uma maior porcentagem de condenação (95,5%), sendo 95,5% quanto aos parâmetros físico-químicos e 54,5% quanto aos padrões microbiológicos. Para que queijos Minas Frescal com padrão de qualidade de excelência sejam expostos ao consumo, é imprescindível maior interesse e empenho dos fabricantes e rigor na fiscalização por parte dos órgãos competentes. O Programa Paulista, que objetiva monitorar a qualidade e detectar irregularidades em alimentos comercializados no Estado de São Paulo, com aplicação da legislação sanitária, é de relevada importância nesse sentido.

**Palavras-Chave.** queijo Minas Frescal, qualidade, análise microbiológica, análise físico-química, legislação

### ABSTRACT

“Minas Frescal” cheese is one of the most popular dairy consumption products in Brazil. The purpose of the present study was to evaluate whether the results obtained from the analyses of Minas Frescal cheese samples were in accordance with the established rules, before and after the Brazilian Normative Instructions (*Instrução Normativa*) nº 04/2004 has been published.. Twenty-two cheese samples of from different brands, registered in the Federal Inspection Service, were collected from retail outlets of Campinas, Piracicaba and São João da Boa Vista cities. These samples were collected by the Sanitary Surveillance Program of the respective Regional Health Administration Service and they were sent to Instituto Adolfo Lutz - Regional Laboratory of Campinas for performing the analyses, according to the São Paulo State Food Programs of

2002 and of 2003/2004 (*Programas Paulista de Alimentos 2002 and 2003/2004*). The moisture and fat contents in a dry extract weight basis were determined according to the “Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz”. Microbiological analyses (coliforms at 45°C, positive coagulase staphylococci, *Salmonella* sp and *Listeria monocytogenes*) were carried out according to APHA (1992). The labeling evaluation was done based on the Regulation (*Portaria*) nº 371/1997 – M.A.A (Ministry of Agriculture & Supply), for verifying the presence of forbidden additives in the ingredient list. According to the ongoing rules at that time, 68.2% of the analyzed samples failed to comply with the legislation, being 31.8% as for physical-chemical features, 50% due to microbiological criteria, and 36.4% because of the presence of lactic acid according to the label: The observed data indicated that the quality of “Minas Frescal” cheese samples were unsatisfactory. Assessing these results with current legislation, an even greater rate of non-compliance (95.5%) was observed, of which 95.5% was due to physical-chemical failures, and 54.5% as for microbiological criteria. In order to guarantee the quality of consumption products placed for selling in the market in accordance with the excellence standards, the Minas Frescal” cheeses manufacturers concerns and efforts are crucial, in addition to the stringent inspection procedures by the competent authorities. In regarding to this issue, the establishment of the São Paulo State Food Programs aiming to monitor the quality of commercialized food, and to detect irregularities with respect to sanitary legislation in São Paulo State has been of great importance.

**Key Words.** Minas Frescal cheese, quality, microbiological analysis, physical-chemical analysis, legislation.

## INTRODUÇÃO

O queijo Minas Frescal, considerado o único genuinamente nacional, é um produto de grande aceitação no mercado, de elaboração simples e alto rendimento de fabricação, o que atrai o interesse de indústrias de pequeno, médio e grande porte. No ano 2000, o Minas Frescal ocupou a quarta posição na produção brasileira de queijos sob inspeção federal, com 28,8 toneladas<sup>23</sup>.

Tanto médicos quanto nutricionistas recomendam o consumo de leite e seus derivados como base de uma alimentação balanceada e, principalmente, como alimento para crianças e adolescentes que, por estarem em fase de crescimento, necessitam de um consumo maior de proteínas<sup>19</sup>. Os produtos derivados de leite são excelentes fontes de aminoácidos essenciais e de vitamina A existente na gordura<sup>36</sup>.

A Portaria nº 352/97<sup>6</sup> define como Minas Frescal o queijo fresco obtido por coagulação enzimática do leite com coalho e/ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não com ação de bactérias lácticas específicas.

Na produção de queijo Minas Frescal, diversas alternativas tecnológicas têm sido utilizadas pelos laticínios, como por exemplo: a adição de ácido láctico industrial (85% de pureza), o emprego tradicional de fermento láctico, substituição parcial do fermento por ácido láctico, ultrafiltração, variações na temperatura de coagulação ou até mesmo emprego de prensagem, etc<sup>18,38</sup>. Essa grande diversidade de processamentos, os quais variam conforme a região, estado ou, mais especificamente, a indústria de laticínios, é apontada como o principal fator responsável por diferenças encontradas nos parâmetros físico-químicos de amostras de queijo Minas Frescal, inclusive variações acentuadas nos teores de umidade e gordura<sup>26,27</sup>.

A bibliografia nacional revela, de maneira repetitiva, um quadro desfavorável da qualidade microbiológica do queijo Minas Frescal. Vários trabalhos têm demonstrado a ocorrência de elevados índices de contaminação e a presença de bactérias patogênicas nesse tipo de queijo, destacando-se, entre outras, *Staphylococcus aureus*<sup>11,28,37</sup> diversos sorogrupos de *Escherichia coli*<sup>2</sup> e *Listeria monocytogenes*<sup>11,15,39</sup>.

Segundo Pinto et al.<sup>30</sup>, a contaminação dos queijos Minas Frescal vem assumindo considerável importância no aspecto de Saúde Pública, sendo considerada pela Vigilância Sanitária um problema emergente que exige maior atenção por parte dos órgãos oficiais, principalmente no que concerne ao controle higiênico-sanitário do produto.

Neste contexto, a fim de verificar se os queijos Minas Frescal industrializados expostos à venda no comércio do Estado de São Paulo atendiam aos requisitos de segurança, qualidade e conformidade com a legislação, esse produto foi incluído no Programa Paulista 2002<sup>33</sup> e Programa Paulista Biênio 2003-2004<sup>34</sup>.

Até o início de março de 2004, conforme estabelecido na Portaria nº 352/97<sup>6</sup>, o queijo Minas Frescal era classificado como queijo semi-gordo, de alta umidade. No dia 05 de março, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento publicou a Instrução Normativa nº 4/2004<sup>9</sup>, a qual incluiu o termo “Muito” na expressão “Alta Umidade” nos itens 2.2 (classificação), 4.2.3 (Requisitos Físico-Químicos) e 5.1 (Aditivos) no Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade do Queijo Minas Frescal.

Essa Instrução Normativa, além de alterar o padrão referente ao teor de umidade e conferir respaldo legal à adição de ácido láctico no processo de fabricação do queijo Minas Frescal<sup>5</sup>, permite que padrões microbiológicos distintos sejam utilizados pelos laboratórios de saúde pública, com base na presença, ou não, de bactérias lácticas abundantes e viáveis<sup>8</sup>.

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo avaliar os resultados obtidos nas análises de amostras de queijos Minas Frescal, verificando sua conformidade com a legislação, antes e após a publicação da Instrução Normativa nº 4/2004<sup>9</sup>.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram avaliadas 22 amostras de queijo Minas Frescal, de diferentes marcas comerciais, produzidas em laticínios submetidos à fiscalização do Serviço de Inspeção Federal (SIF), quanto aos parâmetros físico-químicos, microbiológicos e de rotulagem.

As amostras foram colhidas pelas equipes de Vigilância Sanitária em estabelecimentos comerciais de municípios abrangidos pela Direção Regional de Saúde (DIR) de Campinas, de Piracicaba e de São João da Boa Vista, em atendimento ao Programa Paulista 2002<sup>33</sup> e ao Programa Paulista Biênio 2003/2004<sup>34</sup>, e transportadas ao laboratório em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável.

O teor de gordura no extrato seco foi determinado pelo método de "Gerber" e a umidade por gravimetria, utilizando areia tratada em estufa a 105°C, segundo metodologias descritas no livro de "Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz"<sup>20</sup>. Os ensaios foram realizados em duplicata.

As análises microbiológicas (coliformes totais, coliformes a 45°C, estafilococos coagulase positiva, *Salmonella* sp e *Listeria monocytogenes*) foram realizadas conforme preconizado no "Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods"<sup>31</sup>.

A análise da rotulagem foi realizada segundo critérios adotados pelo Programa Paulista, com base na Portaria nº 371/97<sup>7</sup>, verificando se constava na lista de ingredientes a presença de aditivos não permitidos (ácido láctico).

## RESULTADOS

Os resultados obtidos nas análises físico-químicas, microbiológicas e de rotulagem (lista de ingredientes) das amostras de queijo Minas Frescal são apresentados na Tabela 1

A Tabela 2 apresenta os valores mínimos, máximos e a mediana para o prazo de validade das amostras de queijo Minas Frescal elaboradas por dois diferentes processos de fabricação.

A Figura 1 apresenta o perfil de condenação das amostras conforme a classificação do queijo Minas Frescal em alta e muito alta umidade.

A Figura 2 apresenta o perfil de condenação das amostras quanto aos parâmetros físico-químicos e rotulagem conforme classificação do queijo Minas Frescal em alta e muito alta umidade.

A Figura 3 apresenta o perfil de condenação das amostras quanto aos padrões microbiológicos conforme classificação do queijo Minas Frescal em alta e muito alta umidade.

## DISCUSSÃO

Na emissão dos resultados de análise fiscal dos queijos Minas Frescal colhidos em atendimento ao Programa Paulista 2002 e ao Programa Paulista Biênio 2003-2004, considerou-se esse queijo como de alta umidade, seguindo a classificação da Portaria nº 352/97<sup>6</sup>, uma vez que a Instrução Normativa nº 4/2004<sup>9</sup> ainda não estava em vigor no país.

Na Tabela 1 estão apresentados os resultados obtidos nas análises físico-químicas, microbiológicas e de rotulagem (lista de ingredientes) das amostras de queijo Minas Frescal.

Considerando-se o Minas Frescal como queijo de alta umidade, verifica-se na Figura 1 que, das 22 amostras analisadas, 68,2% (15) foram consideradas em desacordo com a legislação, sendo 31,8% (07) em relação aos parâmetros físico-químicos, 50,0% (11) em relação aos padrões microbiológicos e 36,4% (8) por constar na rotulagem (lista de ingredientes) a presença de ácido láctico.

Uma única amostra pode ter apresentado mais de um motivo de condenação. Assim sendo, a soma do número de amostras condenadas devido aos parâmetros físico-químico, microbiológico e rotulagem é diferente do total de amostras condenadas.

Se considerarmos a legislação atualmente em vigor, do total de amostras analisadas, 95,5% (21) não atenderiam aos padrões legais, sendo 95,5% (21) em relação aos parâmetros físico-químicos e 54,5% (12) em relação aos padrões microbiológicos. Nenhuma amostra seria condenada pela presença de ácido láctico, uma vez que esse aditivo é permitido em queijos de muito alta umidade. Os padrões legais considerados estão apresentados na Tabela 3.

Quanto aos parâmetros físico-químicos, observa-se na Figura 2 que 27,3% (06) das amostras estavam em desacordo devido ao teor de umidade, quando classificadas como de alta umidade.

Com a vigência da Instrução Normativa nº 4/2004<sup>9</sup>, o Minas Frescal passou a ser classificado como queijo de muito alta umidade, o que resultaria em um aumento considerável do número de amostras em desacordo quanto aos parâmetros físico-químicos. Esse aumento, conforme mostrado na Figura 2 é devido, exclusivamente, ao teor de umidade dos queijos. Das 22 amostras analisadas, 77,3% (17) apresentaram umidade inferior a 55,0%, não se enquadrando, portanto, no padrão de queijo de muito alta umidade. Esses resultados diferem dos obtidos por Carvalho<sup>11</sup>, Omairi<sup>27</sup> e Oliveira et al.<sup>26</sup> que observaram um número expressivo de amostras de queijo Minas frescal com umidade igual ou superior a 55,0%.

O aumento do teor de umidade do queijo é responsável pelo aumento de rendimento quando se utiliza ácido láctico na fabricação de queijo Minas Frescal. Segundo Carvalho<sup>11</sup>, esta é a provável razão pela qual muitas indústrias de laticínios têm adotado este tipo de processamento.

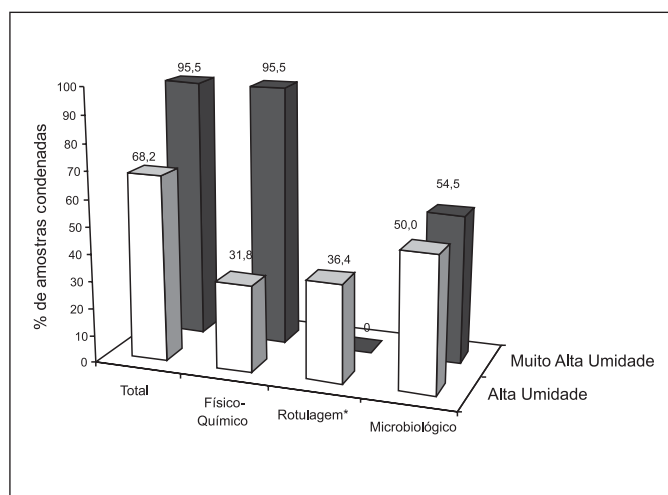
**Tabela 1.** Resultados das análises físico-químicas, de rotulagem (lista de ingredientes) e microbiológicas realizadas nas amostras de queijo Minas Frescal

| Amostra | Físico-Químicas |                             | Rotulagem   |                           | Microbiológicas           |  |                      |                               |  |
|---------|-----------------|-----------------------------|---|---------------------------|---------------------------|--|----------------------|-------------------------------|--|
|         | Umidade (%)     | Gordura no Extrato Seco (%) | Presença de Cultura Láctica (CL) e/ou Ácido Láctico (AL) na Lista de Ingredientes | Coliformes Totais (NMP/g) | Coliformes a 45°C (NMP/g) | Estafilococos coagulase positiva (UFC/g) | <i>Salmonella</i> sp | <i>Listeria monocytogenes</i> |  |
| 01      | 52,58           | 44,39                       | CL  | ≥24.000                   | ≥24.000                   | <10 <sup>2</sup>                         | ausência             | ausência                      |  |
| 02      | 46,82           | 45,61                       | CL  | ≥24.000                   | >11.000                   | <10 <sup>2</sup>                         | ausência             | ausência                      |  |
| 03      | 50,75           | 42,25                       | CL  | ≥24.000                   | ≥24.000                   | <10 <sup>2</sup>                         | ausência             | ausência                      |  |
| 04      | 61,92           | 41,22                       | CL  | 9.300                     | 2.100                     | <10 <sup>2</sup>                         | ausência             | ausência                      |  |
| 05      | 54,20           | 44,52                       | CL  | ≥24.000                   | ≥24.000                   | <10 <sup>2</sup>                         | ausência             | presença                      |  |
| 06      | 53,15           | 40,35                       | CL  | ≥24.000                   | <0,3                      | <10 <sup>2</sup>                         | ausência             | ausência                      |  |
| 07      | 54,20           | 40,60                       | CL  | ≥24.000                   | <0,3                      | <10 <sup>2</sup>                         | ausência             | ausência                      |  |
| 08      | 53,44           | 43,26                       | CL  | 11.000                    | <0,3                      | <10 <sup>2</sup>                         | ausência             | ausência                      |  |
| 09      | 53,11           | 44,90                       | CL  | 2.400                     | 210                       | <10 <sup>2</sup>                         | ausência             | ausência                      |  |
| 10      | 50,05           | 44,76                       | CL  | 1.100                     | 1.100                     | <10 <sup>2</sup>                         | ausência             | ausência                      |  |
| 11      | 58,72           | 47,72                       | CL  | ≥24.000                   | <0,3                      | 4,1 x 10 <sup>3</sup>                    | ausência             | ausência                      |  |
| 12      | 48,02           | 42,09                       | AL  | ≥24.000                   | ≥24.000                   | <10 <sup>2</sup>                         | ausência             | ausência                      |  |
| 13      | 31,35           | 42,90                       | AL  | ≥24.000                   | ≥24.000                   | <10 <sup>2</sup>                         | ausência             | ausência                      |  |
| 14      | 46,20           | 39,72                       | AL  | ≥24.000                   | ≥24.000                   | <10 <sup>2</sup>                         | ausência             | ausência                      |  |
| 15      | 52,31           | 40,72                       | AL  | 2.400                     | 2.400                     | <10 <sup>2</sup>                         | ausência             | ausência                      |  |
| 16      | 66,40           | 48,60                       | AL  | ≥24.000                   | ≥24.000                   | <10 <sup>2</sup>                         | ausência             | ausência                      |  |
| 17      | 59,00           | 52,80                       | AL  | ≥24.000                   | 210                       | 1,5 x 10 <sup>4</sup>                    | ausência             | ausência                      |  |
| 18      | 60,69           | 47,72                       | AL  | 930                       | <0,3                      | <10 <sup>2</sup>                         | ausência             | ausência                      |  |
| 19      | 48,80           | 42,90                       | NC <sup>a</sup>   | ≥24.000                   | 11.000                    | 1,5 x 10 <sup>5</sup>                    | ausência             | ausência                      |  |
| 20      | 54,21           | 39,00                       | NC  | 4.600                     | 390                       | <10 <sup>2</sup>                         | ausência             | ausência                      |  |
| 21      | 54,09           | 40,00                       | NC  | ≥24.000                   | 460                       | <10 <sup>2</sup>                         | ausência             | ausência                      |  |
| 22      | 54,52           | 35,07                       | CL e AL   | ≥24.000                   | <0,3                      | <10 <sup>2</sup>                         | ausência             | ausência                      |  |

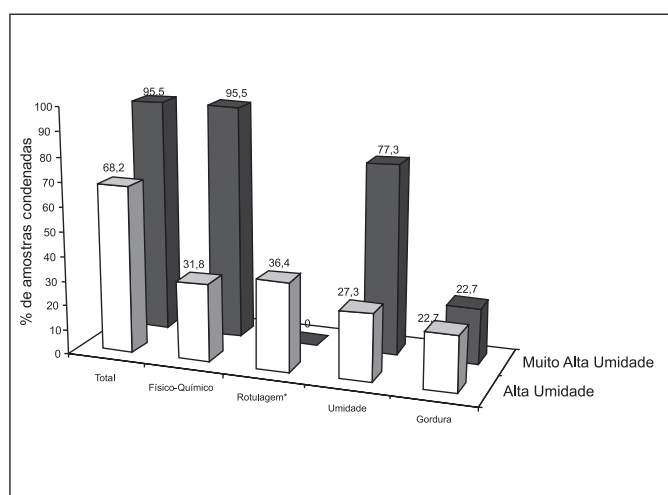
<sup>a</sup>: não consta na lista de ingredientes a presença de cultura láctica ou ácido láctico

**Tabela 2.** Prazo de validade: mediana, valores mínimos e máximos em amostras de queijo Minas Frescal elaboradas por dois diferentes processos de fabricação

| Processo                  | Prazo de validade (dias) |        |         |
|---------------------------|--------------------------|--------|---------|
|                           | Mínimo                   | Máximo | Mediana |
| Adição de Cultura láctica | 16                       | 60     | 20      |
| Adição de Ácido láctico   | 15                       | 60     | 30      |



**Figura 1.** Perfil de condenação das amostras conforme a classificação do queijo Minas Frescal em alta e muito alta umidade  
\* presença de ácido láctico na lista de ingredientes



**Figura 2.** Perfil de condenação das amostras quanto aos parâmetros físico-químicos e rotulagem, conforme classificação do queijo Minas Frescal em alta e muito alta umidade.  
\* presença de ácido láctico na lista de ingredientes

O Minas Frescal fabricado com o uso de acidificação direta apresenta ainda, como vantagem, menores alterações na estocagem que os queijos produzidos com fermento láctico<sup>18,38</sup>. Entretanto, tem sido demonstrado que queijos produzidos por acidificação direta estão mais sujeitos ao crescimento bacteriano<sup>17,24</sup>.

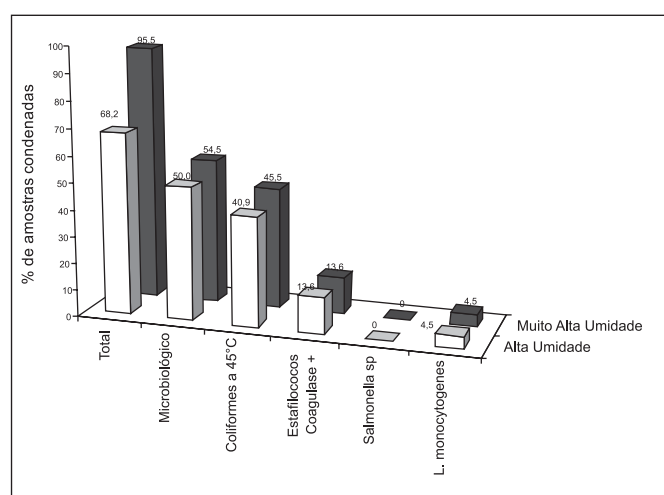
Na Tabela 1 pode ser observado que o teor de umidade dos queijos variou de 31,35% a 66,40%. Uma variação acentuada na percentagem de umidade também foi obtida por Oliveira et al.<sup>26</sup>.

O valor médio de umidade encontrado neste trabalho para queijos produzidos com adição de cultura láctica foi de 53,54%. Pela avaliação da variação dos limites mínimo e máximo permitidos para queijo de alta umidade (Tabela 3), os dados mostram que a totalidade dos queijos condensados, produzidos por este processo, apresentou teor de umidade acima do limite máximo permitido. Já, aqueles produzidos por acidificação direta, com valor médio de 51,99%, apresentaram índice de condensaço tanto por valores acima quanto por valores abaixo do permitido.

Os valores medianos encontrados para o teor de umidade (53,15% para queijo com cultura láctica e 52,31% para queijo com ácido láctico) assemelham-se aos valores da média para os dois tipos de processo, evidenciando que a maioria das amostras analisadas tende para o intervalo de normalidade.

Também pode ser observado na Figura 2 que 22,7% (05) das amostras foram condenadas devido ao teor de gordura no extrato seco, antes e após a publicação da Instrução Normativa n° 4/2004<sup>9</sup>, uma vez que não houve alteração da classificação do queijo Minas Frescal (semigordo) quanto a este parâmetro.

Embora se deva trabalhar com um leite que apresente um teor de gordura bem definido (entre 3,0 e 3,2%), a fim de se obter um queijo Minas Frescal com qualidade, Furtado e Lourenço Neto e Magalhães et al.<sup>18,22</sup> constataram a falta de padronizaço



**Figura 3.** Perfil de condenação das amostras quanto aos padrões microbiológicos, conforme classificação do queijo Minas Frescal em alta e muito alta umidade.

**Tabela 3.** Padrões legais para queijo Minas frescal antes (alta umidade) e após a vigência da Instrução Normativa nº4/2004 (muito alta umidade)

| Parâmetros*  | Classificação                     |  |
|--|-----------------------------------|--|
|  | Queijo Semi-Gordo<br>Alta umidade | Queijo Semi-Gordo<br>Muito Alta umidade  |
| Umidade (g/100g)                                     | 46,0 a 54,9                       | Maior ou igual a 55,0  |
| Gordura (g/100g)                                     | 25,0 a 44,9                       | 25 a 44,9  |
| Lista de ingredientes<br>(presença de ácido láctico) | Não permitido                     | Permitido  |
| Coliformes 45°C                                      | $\leq 5 \times 10^3$ NMP/g        | Com cultura láctea: $\leq 5 \times 10^3$ NMP/g<br>Sem cultura láctea: $\leq 5 \times 10^2$ NMP/g |
| Estafilococos coagulase<br>positiva                  | $\leq 10^3$ UFC/g                 | Com cultura láctea: $\leq 10^3$ UFC/g<br>Sem cultura láctea: $\leq 5 \times 10^2$ UFC/g          |
| <i>Salmonella</i> sp                                 | Ausência em 25g                   | Com cultura láctea: Ausência em 25g<br>Sem cultura láctea: Ausência em 25g                       |
| <i>Listeria monocytogenes</i>                        | Ausência em 25g                   | Com cultura láctea: Ausência em 25g<br>Sem cultura láctea: Ausência em 25g                       |

\* conforme estabelecido na Portaria nº 146/96 e Resolução RDC nº 12/2001

do teor de gordura do leite utilizado como matéria-prima para fabricação deste tipo de queijo.

No presente trabalho, verifica-se na Tabela 1 que o teor de gordura no extrato seco variou de 39,00 a 52,80%. Todos os queijos condenados apresentaram valores acima do limite máximo permitido, sendo classificados, por isso, como gordos. Resultados similares foram obtidos por Omairi<sup>27</sup>, que verificou que os valores médios encontrados classificavam os queijos como gordos e extra gordos.

Segundo Oliveira et al.<sup>26</sup>, as variações nos percentuais de umidade e gordura refletem a diversidade de critérios tecnológicos utilizados na fabricação de queijos Minas Frescal, concordando com a afirmação de Pinto et al.<sup>30</sup>, sobre a necessidade de padronização das técnicas empregadas nos laticínios.

Os resultados obtidos nas análises microbiológicas (Tabela 1) evidenciaram a qualidade higiênico-sanitária insatisfatória dos queijos, com risco potencial à saúde do consumidor, concordantes com os relatados na literatura.

Das 22 amostras analisadas, verifica-se na Figura 3 que 40,9% (09) apresentaram coliformes termotolerantes (45°C) acima do limite máximo tolerado, quando consideradas de alta umidade.

Com a vigência da Instrução Normativa nº 4/2004<sup>9</sup>, o Minas Frescal passou a ser classificado como queijo de muito alta umidade, o que resultaria em aumento de uma unidade no número de amostras em desacordo quanto à população de coliformes termotolerantes. Esta amostra, em cuja rotulagem (lista

de ingredientes) constava a presença de ácido láctico, apresentou uma população igual a  $2,4 \times 10^3$  NMP/g, superior ao limite máximo tolerado para queijo sem a ação de bactérias lácticas (Tabela 2). Portanto, 45,5% (10) das amostras estariam em desacordo devido ao grau de contaminação por esses microrganismos (Figura 3).

Os coliformes fecais (termotolerantes a 45°C), população predominantemente constituída por *Escherichia coli*, caracterizam um grupo de microrganismos cuja presença em alimentos é indicativa de contaminação fecal. Essa contaminação, além de identificar as más condições higiênicas do produto, indica, também, a possibilidade de transferência de patógenos pertencentes aos grupos *E. coli* enteropatogênica clássica, *E. coli* enterotoxigênica, *E. coli* enteroinvasiva, *E. coli* enteroagregativa e *E. coli* enterohemorrágica<sup>29</sup>. Na pesquisa conduzida por Araújo et al.<sup>2</sup> verificou-se que, das 161 cepas identificadas como *E. coli*, isoladas de queijo Minas frescal comercializado no Rio de Janeiro-RJ, 21,1% foram sorogrupadas como EPEC, sendo o sorogrupo mais encontrado o O127, seguido pelo O55.

No estudo realizado por Oliveira et al.<sup>26</sup>, foram avaliadas 32 amostras de queijo Minas frescal, coletadas imediatamente após a fabricação e embalagem, em 6 fábricas de laticínios subordinadas à fiscalização do Serviço de Inspeção Federal (SIF). Os resultados mostraram que 6 (18,8%) amostras estavam contaminadas com coliformes fecais, sendo que 2 (6,3%) delas continham uma população superior a  $10^3$  NMP/g. Omairi<sup>27</sup> verificou que mais de 30% dos queijos considerados impróprios



para o consumo já tinham saído contaminados das fábricas e apresentaram o mesmo nível de contaminação no comércio varejista.

Isepon et al.<sup>21</sup> observaram que, das 11 amostras de queijo Minas frescal industrializado, colhidas no comércio de Ilha Solteira-SP, 8 (72,7%) apresentaram população de coliformes fecais acima de 110 NMP/g. Peresi et al.<sup>28</sup>, Pereira et al.<sup>29</sup> e Tamada et al.<sup>37</sup> analisaram queijos comercializados, respectivamente, em São José do Rio Preto-SP, Belo Horizonte-MG e Botucatu-SP e verificaram ser comum a ocorrência de amostras contendo coliformes fecais com esse grau de contaminação. Em Campinas-SP, Carvalho<sup>11</sup>, ao avaliar queijos obtidos por processamento com acidificação direta (ácido láctico) e com cultura láctica, observou que 25 (41,0%) amostras continham uma população de coliformes termotolerantes (45°C) igual ou superior a  $1,1 \times 10^4$  NMP/g. No presente trabalho, todas as amostras consideradas em desacordo com a legislação apresentaram valores iguais ou superiores a  $1,1 \times 10^4$  NMP/g.

Na Figura 3 pode ser observado que 13,6% (03) das amostras estavam contaminadas com estafilococos coagulase positiva acima de  $10^3$  UFC/g, quando enquadradas como de alta ou muito alta umidade, apresentando contagens da ordem de  $10^3$  a  $10^5$  UFC/g (Tabela 1).

Valores superiores a  $10^3$  UFC/g também foram obtidos por Tamada et al.<sup>37</sup> e Peresi et al.<sup>28</sup>, respectivamente, em 2 (10%) e em 1 (3,3%) das amostras de queijo Minas frescal analisadas. Por sua vez, contagens da ordem de  $10^6$  UFC/g foram observadas por Carvalho<sup>11</sup>, em queijos industrializados coletados em estabelecimentos comerciais da região metropolitana de Campinas-SP, evidenciando a possibilidade de ocorrência de surto de intoxicação estafilocócica pela ingestão desse alimento.

Trabalhos relatados na literatura têm incriminado o queijo Minas frescal, particularmente o produzido artesanalmente, como responsável pela ocorrência de surtos de intoxicação estafilocócica<sup>14,16,32</sup>.

No presente trabalho, nenhuma das amostras analisadas estava contaminada com *Salmonella* sp. (Figura 3). A ausência desta bactéria em queijo Minas frescal industrializado também foi observada por Carvalho<sup>11</sup>, Peresi et al.<sup>28</sup>, Pereira et al.<sup>29</sup>, Tamada et al.<sup>37</sup> e Ávila & Gallo<sup>3</sup>.

Na Tabela 1 pode ser observado que foi detectada a presença de *L. monocytogenes* em uma (4,5%) amostra de queijo Minas Frescal. A presença desta bactéria neste tipo de queijo também tem sido relatada por outros autores.

Pesquisas realizadas por Vieira<sup>39</sup> e Destro et al.<sup>15</sup> evidenciaram a ocorrência de *L. monocytogenes*, respectivamente, em 5 (25%) e 2 (10%) amostras de queijo industrializado, coletadas no comércio varejista de Campinas-SP. Os resultados obtidos por Oliveira<sup>25</sup>, demonstraram que uma (2%) amostra colhida no varejo de Goiânia-GO era positiva para este microrganismo.

No estudo conduzido por Carvalho<sup>11</sup>, verificou-se a presença de *L. monocytogenes* em 3 amostras de queijo Minas frescal fabricado com adição de ácido láctico (acidificação direta).

Segundo este mesmo autor, a presença de *Listeria innocua*, observada em queijos obtidos por processamento com cultura láctica, indica a possibilidade de também ocorrer *L. monocytogenes* em queijos submetidos a este tipo de processamento. No presente trabalho, *L. monocytogenes* foi detectada em queijo cuja rotulagem constava a utilização de cultura láctica (Tabela 1), concordando, por isso, com a afirmação feita por Carvalho<sup>11</sup>.

Por sua vez, nos estudos realizados por Sá et al.<sup>31</sup>, Peresi et al.<sup>28</sup> e Casarotti et al.<sup>12</sup> não foi detectada a presença de *L. monocytogenes* em amostras de queijo Minas Frescal, expostas à venda no comércio de Uberlândia-MG, São José do Rio Preto-SP e Piracicaba-SP, respectivamente.

Surtos de listeriose devidos ao consumo de queijos moles foram relatados na literatura<sup>4,13</sup>. Devido à severidade das infecções produzidas, principalmente nos grupos de risco, vários países têm adotado uma política severa para controle de *L. monocytogenes* em alimentos<sup>11</sup>.

Segundo Campos<sup>10</sup>, o uso de fermento láctico em queijo Minas frescal, mesmo em pequenas proporções (0,1% e 0,5%), confere uma ação protetora contra o crescimento de contaminantes. Naldini<sup>24</sup> e Dornellas<sup>17</sup> constataram que o queijo Minas Frescal obtido com acidificação direta é mais susceptível às contaminações microbianas, devido ao pH final mais elevado e às bactérias ácido lácticas não estarem presentes para competir com outros microrganismos. Os resultados obtidos por esses autores ratificam, portanto, a necessidade de padrões microbiológicos mais restritos para queijos sem a ação de bactérias lácticas, conforme estabelecido na Resolução RDC n° 12/2001<sup>8</sup>.

A legislação brasileira não estabelece limites de tolerância para coliformes totais em queijo Minas Frescal. Entretanto, pode ser observado na Tabela 1 que 15 (68,2%) amostras apresentaram população superior a  $2,4 \times 10^4$  NMP/g. Elevada contaminação por coliformes totais também foi obtida por Isepon et al.<sup>21</sup> e Oliveira et al.<sup>26</sup> em amostras de queijo Minas Frescal, colhidas, respectivamente, em fábricas de laticínios e no comércio varejista. Segundo Silva et al.<sup>35</sup>, a presença deste grupo de microrganismos em alimentos processados é considerada uma indicação útil de contaminação pós-sanitização ou pós-processo, evidenciando prática de higiene e sanificação aquém dos padrões requeridos para o processamento de alimentos.

Quanto à análise de rotulagem, a Figura 1 mostra que 36,4% (8) das amostras foram consideradas em desacordo com a legislação, por constar na rotulagem (lista de ingredientes) ácido láctico, aditivo não permitido para queijo de alta umidade.

Com a vigência da Instrução Normativa n° 4/2004<sup>9</sup>, o Minas Frescal passou a ser classificado como queijo de muito alta umidade. Assim, a presença desse aditivo não seria motivo de condenação. As vantagens e desvantagens da utilização do ácido láctico no processo de fabricação do queijo Minas Frescal já foram mencionadas anteriormente.

Os prazos de validade das amostras apresentaram uma faixa de variação bastante ampla conforme pode ser observado

na Tabela 2, evidenciando o fato destes prazos serem determinados pelas indústrias de laticínios, baseados em critérios próprios, já que na legislação brasileira não existe definição de prazo de validade.

Podemos ainda observar que, apesar dos valores mínimos e máximos serem semelhantes para os dois tipos de processo, os queijos produzidos com adição de ácido láctico apresentaram maior prazo de validade em valores medianos (30 dias) em relação ao outro processo (20 dias). Estes dados estão de acordo com os encontrados por Carvalho<sup>11</sup>, cujos queijos produzidos com adição de ácido láctico apresentaram também mediana de 30 dias para o prazo de validade.

Furtado e Lourenço Neto<sup>18</sup> atribuíram ao queijo Minas Frescal durabilidade média de 10 dias; Dornellas<sup>17</sup> concluiu em seu estudo que o limite de vida útil aceitável para o queijo de cultura láctica seria de 16 dias, valores estes abaixo dos prazos de validade observados neste trabalho.

### CONCLUSÕES

Os resultados obtidos, considerando-se a legislação em vigor no período de realização do Programa Paulista, demonstraram que 68,2% das amostras foram condenadas, sendo 31,8% devido aos parâmetros físico-químicos, 50,0% devido aos padrões microbiológicos e 36,4% por constar a presença de ácido láctico na rotulagem, indicando que a qualidade dos queijos Minas Frescal é insatisfatória.

Entretanto, quando os mesmos resultados foram avaliados considerando-se a legislação atualmente em vigor, verificou-se uma maior porcentagem de condenação (95,5%), sendo 95,5% quanto aos parâmetros físico-químicos e 54,5% quanto aos padrões microbiológicos.

O Minas Frescal, por se tratar de um queijo amplamente consumido pela população, deve apresentar um padrão de qualidade de excelência, exigindo, por isso, um maior interesse por parte dos fabricantes no sentido de padronização das técnicas empregadas no processamento e aplicação de boas práticas de fabricação. É de relevada importância a realização de programas de monitoramento, como o Programa Paulista, que objetiva detectar irregularidades na qualidade dos alimentos expostos ao consumo, para que medidas efetivas sejam tomadas pelos órgãos competentes.

### REFERÊNCIAS

1. American Public Health Association (APHA). **Compendium for the microbiological examination of foods**. Vanderzant, C., Splittstoesser, D.F. (Ed.), 3 ed. Washington, DC., 1992.
2. Araújo, V.S. et al. Isolamento e identificação de enteropatógenos e *Staphylococcus aureus* em queijo Minas frescal. Pesquisa de sorogrupos de *Escherichia coli* enteropatogênica clássica e perfil de resistência a antimicrobianos. In: **XX Congresso Brasileiro de Microbiologia**, 1999, p.378.

3. Ávila, C.R.; Gallo, C.R. Pesquisa de *Salmonella* spp. em leite cru, leite pasteurizado tipo C e queijo Minas Frescal comercializados no município de Piracicaba - SP. **Scientia Agricola**. [http://www.scielo.br]. 18 jun. 2004.
4. Bille, J. Epidemiology of human listeriosis in Europe with special reference to the Swiss outbreak. In: Miller, A.J.L.; Somkuti, G.A. **Foodborne Listeriosis**. New York: Elsevier, 1990. Chap. 12, p.71-4.
5. Brasil, Leis, decretos, etc. **Portaria nº 146/96 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Aprova os regulamentos técnicos de identidade e qualidade dos produtos lácteos. [http://oc4j.agricultura.gov.br/agrolegis/do/consultaLei?op=viewTextual&código=1218]. 21 jun. 2004.
6. Brasil, Leis, decretos, etc. **Portaria nº 352/97 do Ministério da Agricultura e do Abastecimento**. Aprova o regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de queijo Minas Frescal. [http://oc4j.agricultura.gov.br/agrolegis/do/consultaLei?op=viewTextual&código=1220]. 21 jun. 2004.
7. Brasil, Leis, decretos, etc. **Portaria nº 371/97 do Ministério da Agricultura e do Abastecimento**. Aprova o regulamento técnico para rotulagem de alimentos embalados. [http://oc4j.agricultura.gov.br/agrolegis/do/consultaLei?op=viewTextual&código=3195]. 27 jun. 2004.
8. Brasil, Leis, decretos, etc. **Resolução RDC nº 12/2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde**. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. [http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=144]. 21 jun. 2004.
9. Brasil, Leis, decretos, etc. **Instrução Normativa nº 4/2004 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Inclui o termo "Muito" na expressão "Alto Umidade" nos itens 2.2 (Classificação), 4.2.3 (Requisitos Físico-Químicos) e 5.1 (Aditivos), no regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade do queijo Minas frescal. [http://oc4j.agricultura.gov.br/agrolegis/do/consultaLei?op=viewTextual&código=5974]. 21 jun. 2004.
10. Campos, A.C. **Efeito do uso combinado de ácido láctico com diferentes proporções de fermento láctico mesofílico no rendimento, proteólise, qualidade microbiológica e propriedades mecânicas do queijo Minas Frescal**. Campinas, 2000. [Dissertação de Mestrado – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas].
11. Carvalho, J.D.G. **Avaliação da qualidade de queijos tipo Minas Frescal elaborados por diferentes processos tecnológicos e comercializados em Campinas-SP**. Campinas, 2003. [Dissertação de Mestrado – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas].
12. Casarotti, V.T.; Gallo, C.R.; Camargo, R. Ocorrência de *Listeria monocytogenes* em leite cru, leite pasteurizado tipo C e queijo Minas Frescal comercializados em Piracicaba-SP. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, 44(3): 158-63, 1994.
13. Center for Disease Control and Prevention (CDC). Epidemiologic notes and reports listeriosis outbreak associated with Mexican-style cheese - California. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, 34(24): 357-59, 1985.
14. Cerqueira, M.M.O.P. et al. Surto epidêmico de toxinfecção alimentar envolvendo queijo tipo Minas frescal em Pará de Minas/MG. In: **XIII Congresso Nacional de Laticínios**, 1995, p.95-7.
15. Destro, M.T.; Serrano, A.M.; Kabuki, D.Y. Isolation of *Listeria* species from some Brazilian meat and dairy products. **Food Control**, 2(2): 110-2, 1991.
16. Dias, R.S. et al. Surtos de toxinfecção alimentar provocados por queijos comercializados em Minas Gerais, no período de 1992 a 1994. In: **XIII Congresso Nacional de Laticínios**, 1995, p.143-4.
17. Dornellas, J.R. **Efeito do tipo de coagulante e acidificante no rendimento, proteólise e "shelf life" do queijo Minas Frescal**. Campinas, 1997. [Dissertação de Mestrado – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas].
18. Furtado, M.M.; Lourenço Neto, J.P.M. Queijo Minas Frescal. In: **Tecnologia de Queijos**. Manual Técnico para a Produção Industrial de Queijos. 1ª ed. São Paulo: Editora Dipemar; 1994. p.73-5.

19. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO). Leite Tipo "B", Tipo "C", UHT e Queijo Minas Frescal e Prato. 1999. [http://www.inmetro.gov.br/consumidor/produtos/leite/queijo.asp]. 06 ago. 2004.
20. Instituto Adolfo Lutz (IAL). **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v.1: métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 3ª ed. São Paulo, IMESP, 1985.
21. Isepon, J.S.; Santos, P.A.; Silva, M.A.P. Avaliação microbiológica de queijos Minas Frescal comercializados na cidade de Ilha Solteira-SP. **Hig. Aliment.**, 17(106): 89-94, 2003.
22. Magalhães, N.A. et al. Avaliação físico-química e microbiológica do leite pasteurizado integral/fazenda comercializado em Viçosa. **Rev. Inst. Latic. "Cândido Tostes"**, 50: 3-8, 1995.
23. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Embrapa Gado de Leite. **Tabela 04.04. Produção brasileira de queijos sob inspeção federal** – 1993/2000. [http://www.cnpq1.embrapa.br/produção/04industria/tabela04.04.php]. 01 jul. 2004.
24. Naldini, M.C.M. **Comportamento diferencial de *Listeria monocytogenes* em queijos Minas frescal elaborados pelo método convencional e por acidificação direta**. Campinas, 2002. [Dissertação de Mestrado – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas].
25. Oliveira, A.N. **Bactérias do gênero *Listeria* em leite e derivados no comércio varejista de Goiânia - Goiás**. Belo Horizonte, 1993. [Dissertação de Mestrado - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais].
26. Oliveira, C.A.F. et al. Características físico-químicas e microbiológicas de queijos Minas Frescal e mussarela, produzidos em algumas fábricas de laticínios do Estado de São Paulo. **Hig. Aliment.**, 12(55): 31-5, 1998.
27. Omairi, L. **Avaliação da qualidade e identidade do queijo Minas frescal comercializado na cidade de Campinas-SP**. Campinas, 2002. [Dissertação de Mestrado – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas].
28. Peresi, J.T.M. et al. Queijo Minas tipo Frescal artesanal e industrial: qualidade microscópica, microbiológica e teste de sensibilidade aos agentes antimicrobianos. **Hig. Aliment.**, 15(83): 63-70, 2001.
29. Pereira, M.L. et al. Enumeração de coliformes fecais e presença de *Salmonella* sp. em queijo Minas. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, 51(5): 427-31, 1999.
30. Pinto, P.S.A.; Germano, M.I.S.; Germano, P.M.L. Queijo Minas: problema emergente da Vigilância Sanitária. **Hig. Aliment.**, 10(44): 22-7, 1996.
31. Sá, M.A.R. et al. Perfil microbiológico do queijo Minas Frescal comercializado no município de Uberlândia - MG. **Hig. Aliment.**, 17(104/105): 169-70, 2003.
32. Sabioni, J.G. Intoxicação alimentar por queijo Minas contaminado com *Staphylococcus aureus*. **Rev. Saúde Pública**, 22(5): 458-61, 1988.
33. São Paulo, Leis, decretos, etc. Portaria CVS 7/2002 do Centro de Vigilância Sanitária da Secretaria de Estado da Saúde. Torna público o Programa de Análise Fiscal de Alimentos – Programa Paulista 2002. **Diário Oficial**, São Paulo, 15 maio 2002. Seção I, p. 17-20.
34. São Paulo, Leis, decretos, etc. Portaria Conjunta CVS-IAL 1/2003 do Centro de Vigilância Sanitária e Instituto Adolfo Lutz da Secretaria de Estado da Saúde. Institui o Programa de Análise Fiscal de Alimentos do Estado de São Paulo, denominado Programa Paulista Biênio 2003-2004 (PP0304). **Diário Oficial**, São Paulo, 29 nov. 2003. Seção I, p. 36-49.
35. Silva, N.; Junqueira, V.C.A.; Silveira, N.F.A. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos**, 2ª ed. São Paulo: Livraria Varela, 2001, 317p.
36. Tadini, C.C.; Curi, F.; Cardoso, A. M. Queso Minas Frescal com caseinato de cálcio: uma elaboração alternativa de produção de queso com menos grasa. **Alimentaria**, 35:83-8, 1997.
37. Tamada, R.Y. et al. Estudo microbiológico comparativo entre queijos do tipo Minas frescal industrializados e artesanais, comercializados na região de Botucatu, SP. In: **V Congresso Latino-Americano de Microbiologia e Higiene de Alimentos**, 1998, p.116.
38. Van Dender, A.G.F. ; Moreno, I. Estudos de processos alternativos para fabricação de queijo Minas Frescal . **Rev. Inst. Lat. Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.47, n.279/281, p.76-77, 1992.
39. Vieira, M.A.S.V. **Controle de *Listeria monocytogenes* Scott A em queijo Minas Frescal através de tratamento termoquímico**. Campinas, 2000. [Tese de Doutorado - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas].

# Validação de método multiresíduo para análise de pesticidas organohalogenados em maçãs

## Validation of multiresidue method for analysis of organohalogenates pesticides in apples

RIALA6/995

Marvina N. IMOTO<sup>1\*</sup>, Paulo S. G. FONTOURA<sup>2</sup>, Renato J. S. de FREITAS<sup>3</sup>

\* Endereço para correspondência: <sup>1\*</sup> Mestranda em Tecnologia de Alimentos do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos –Dep. De Eng. Química da Universidade Federal do Paraná – Caixa Postal 19011 –CEP 81531-990.Curitiba – Paraná,

e-mail: marvina@engquim.ufpr.br

<sup>2</sup> Professor, Mestre do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Dep. De Eng. Química da Universidade Federal do Paraná. Perito do Instituto de Criminalística do Paraná, Curitiba – Paraná

<sup>3</sup> Professor, Doutor do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos – UFPR, Curitiba –Paraná.

Recebido: 26/03/2004 - aceito para publicação: 08/11/2004

### RESUMO

Para a realização de programas de monitoramento de resíduos de pesticidas em alimentos, os métodos multiresíduos são ideais pela possibilidade de determinar simultaneamente diversos tipos de pesticidas em uma única extração. Entretanto, para a validação desses métodos, os principais critérios a serem vistos são: especificidade, seletividade, linearidade, limites de detecção, limites de quantificação, robustez, exatidão e precisão, sendo os dois últimos parâmetros os que possibilitam estimar os erros e as variações embutidos no processo analítico. Neste trabalho, foram conduzidos ensaios de recuperação de pesticidas organohalogenados através de fortificações realizadas em maçãs nos níveis 1LOQ e 5 LOQ de cada pesticida para verificação da precisão e exatidão do método. As determinações dos pesticidas foram feitas por cromatografia gasosa com detector de captura de elétrons, e, para a verificação dos parâmetros exatidão e precisão, os resultados obtidos evidenciaram que as recuperações ficaram entre 74% a 111%, e os coeficientes de variação entre 5,0 % e 14,0 %, estando os valores enquadrados dentro dos limites recomendados pela literatura para análise de resíduos de pesticidas.

**Palavras-Chave.** métodos analíticos; validação; cromatografia; pesticidas; maçãs

### ABSTRACT

To development programs of monitoring residues of pesticides in foods, the multiresidue methods are the choice, because many kind of pesticide are determined with only one extraction. However, to evaluate the analytical process, the main traits are: specificity, selectivity, linearity, limits of detection, limits of quantification, ruggedness, precision and accuracy, being the two last ones, the main parameters to estimate the errors and variations included in the process. In this work, recovery assays of some organohalogenate pesticides were made in apples in 1 LOQ and 5 LOQ of each pesticide to verify the accuracy and precision of method. The pesticides were determined by gas chromatographic with electron capture detector, and the results showed that, the recovery obtained were between 74% and 111%, and variation coefficients between 5 % and 14 %, evidenced that the values are in the range recommended by literature .

**Key-Words.** analytical methods; validation; chromatography; pesticides; apples.

## INTRODUÇÃO

Com o desenvolvimento de novos métodos aliados ao uso de equipamentos com tecnologias avançadas, os processos para análises de resíduos de pesticidas devem sempre incluir a validação dos métodos utilizados e não apenas sua otimização<sup>21</sup>.

Sob o ponto de vista prático, pode-se dizer que um método, após ser desenvolvido, deve ser submetido a um processo de avaliação que estime sua eficiência. Este processo de avaliação costuma ser chamado de validação. Um método será considerado validado se suas características estiverem em conformidade com os pré-requisitos exigidos. Existe, portanto, uma diferença entre avaliação de processo, que consiste na coleção dos dados experimentais, e a validação propriamente dita, que deve verificar a relação entre os resultados experimentais<sup>10</sup>.

No sentido rigoroso, entretanto, a validação de métodos representa uma parte do processo total que abrange também vários diferentes aspectos. Segundo Krull e Swartz, a validação é um processo formado por quatro fases, cada uma delas crítica ao sucesso total do processo: 1) validação do software; 2) qualificação do hardware; 3) validação do método; 4) adequação do sistema. O processo começa com um software validado. Então um método validado pode ser desenvolvido a partir de um sistema qualificado. Finalmente, todo o processo é integrado através de um sistema adequado.

Embora os órgãos regulamentadores façam referência às quatro abordagens<sup>1</sup>, neste trabalho o enfoque foi sobre validação de método, especificamente nos parâmetros exatidão e precisão.

De acordo com as atuais normas regulamentadoras para os métodos de ensaio e calibração, a validação de métodos é a confirmação por exame e fornecimento de evidência objetiva de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são atendidos<sup>2</sup>. Segundo as normas da NBR ISO/IEC 17025 - Requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração, os parâmetros recomendados para validação de métodos devem ser claramente declarados nos procedimentos documentados e incluir, quando aplicável, especificidade, seletividade, faixa de trabalho, linearidade, sensibilidade, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão e tendência (bias), precisão, robustez e incerteza de medição<sup>2</sup>.

Em programas de monitoramento de resíduos de pesticidas em alimentos, nos quais são analisados diversos tipos de pesticidas nas mais variadas matrizes, os métodos multiresíduos são os processos analíticos de escolha pela possibilidade de determinação de um grande número de pesticidas em uma determinada matriz, utilizando uma única etapa de extração. Existem vários tipos de métodos multiresíduos descritos na literatura<sup>19,20,24</sup>, os quais são mais ou menos eficientes de acordo com o pesticida, a matriz e o método utilizado, levando-se em conta as propriedades físico-químicas de cada ativo e as características de cada método.

As validações de métodos realizados em laboratórios são apropriadas em várias circunstâncias: para assegurar a viabilidade de um método de baixo custo, para a garantia da

confiabilidade do método em estudos colaborativos formais e para assegurar que as recomendações dos parâmetros de validação de métodos estão sendo usados corretamente<sup>23</sup>.

A validação de métodos multiresíduos para pesquisa de pesticidas em várias matrizes pode ser realizada facilmente em laboratório, mediante ensaios de recuperação a partir de amostras fortificadas com soluções padrões com concentrações conhecidas, provenientes de padrões primários certificados<sup>6</sup>, e na ausência destes com soluções padrões rastreáveis<sup>11</sup>.

Neste processo, a avaliação dos parâmetros precisão e exatidão é considerada a mais relevante porque permite estimar estatisticamente os erros e as variações existentes através dos resultados gerados. A exatidão pode ser estimada pelo erro absoluto e relativo, e a precisão pelas medidas de dispersão (bias), como desvio padrão, variância e coeficiente de variação, entre outras<sup>6</sup>. A precisão representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos, de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas<sup>23</sup> e costuma ser estimada em estudos intralaboratoriais<sup>9</sup> para a demonstração da repetitividade, que expressa a precisão do método realizada sob condições de análise iguais, em um pequeno intervalo de tempo, considerando-se o mesmo analista, equipamento e condições ambientais. Normalmente, a precisão é expressa através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD) ou coeficiente de variação obtidos entre os resultados dos ensaios repetitivos.

O objetivo deste trabalho foi avaliar os resultados obtidos nos parâmetros exatidão e precisão em ensaios conduzidos para recuperação de pesticidas organohalogenados em maçã por cromatografia gasosa com detector de captura de elétrons, utilizando a técnica de extração do método multiresíduo<sup>24</sup>. As fortificações da matriz no nível 1 LOQ equivalente a concentração de 0,02 mg/K, e no nível 5 LOQ com concentração equivalente a 0,1 mg/Kg da amostra, foram realizadas para verificação da recuperação dos pesticidas no limite de quantificação proposto pelo método da relação sinal/ruído na proporção 10:1 dos compostos na matriz, e verificação da performance do mesmo em uma faixa de concentração de padrões usual para este tipo de análise, respectivamente. Os dados obtidos das recuperações foram submetidos a um modelo estatístico (teste *t de Student*), aplicável para um número de amostras igual ou inferior a 20 para confirmação da exatidão do método em um determinado intervalo de confiança pré-estabelecido.

Para o estudo da precisão do método, foram verificados os coeficientes de variação obtidos nos ensaios de recuperações de cada pesticida e avaliados quanto à aceitabilidade do método, de acordo com as recomendações descritas na literatura para os níveis de concentrações trabalhados.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Amostras

As amostras utilizadas para realização dos ensaios foram maçãs orgânicas previamente analisadas e isentas de

agrotóxicos. Uma alíquota dessa amostra serviu como testemunha dos ensaios realizados para verificação dos interferentes da matriz na área de interesse.

### Padrões

Os padrões utilizados neste estudo foram padrões certificados, adquiridos de uma empresa alemã, Dr. Ehrenstorfer, sob a forma de padrões primários. Esses mesmos padrões foram pesados após cálculos para correção dos pesos em relação ao percentual de pureza dos mesmos, e diluídos em solventes orgânicos para obtenção de soluções estoques de cada padrão com concentrações por volta de 0,01%. A partir das soluções estoque foram preparados outras soluções intermediárias e de trabalho para a execução das curvas de calibração dos pesticidas organohalogenados.

Os compostos estudados para o processo foram:  $\beta$  HCH, Clorotalonil, Endosulfan I, Endosulfan II, Endosulfan sulfato, Tetradifona, Trifluralina e Vinclozolina. As estruturas químicas dos compostos ensaiados são mostradas na Figura 1.

### Método analítico

Para a realização dos ensaios de recuperação dos pesticidas organohalogenados com a utilização da técnica de extração do método multirésíduos, modelo europeu<sup>17</sup>, e apesar das recomendações da realização de testes de recuperações em três níveis 1 LOQ, 2 LOQ e 10 LOQ nos processos de validação de métodos, neste trabalho em que os objetivos foram a realização de ensaios experimentais para testes de recuperação dos pesticidas em estudo para determinação do limite de

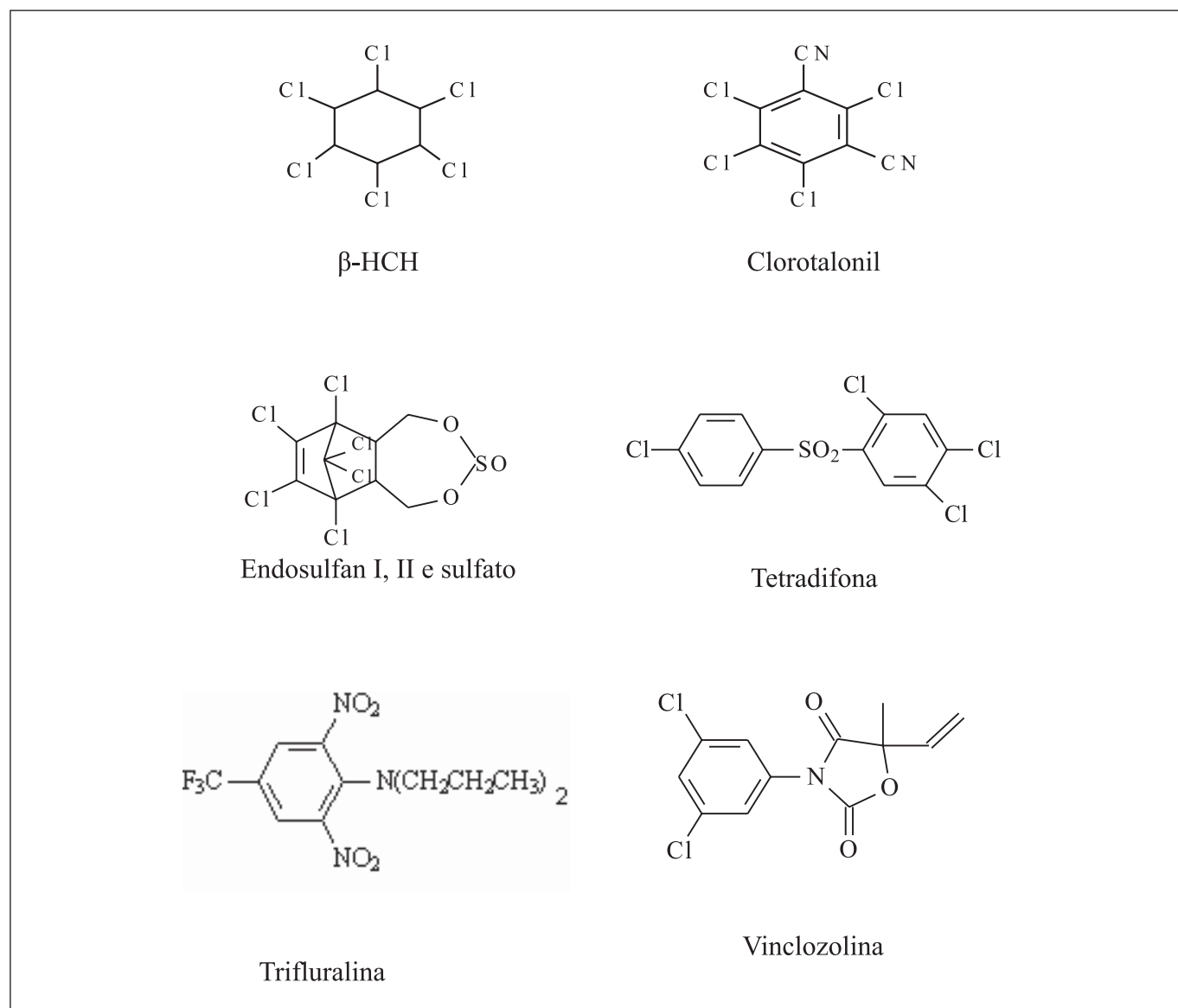


Figura 1. Estrutura química dos pesticidas recuperados em maçãs

quantificação proposto (1 LOQ = 0,02 mg/Kg), e a verificação da performance do método em um nível de concentração comum para este tipo de análise (5 LOQ = 0,1 mg/Kg), foram conduzidos fortificações da matriz com as misturas das soluções padrões somente em dois níveis, 1LOQ e 5LOQ, com cinco ensaios repetitivos em cada nível, no início e faixa final respectivamente, da faixa de trabalho do método. Dessa forma, foram conduzidos 10 ensaios com fortificações das matrizes com misturas de soluções padrões, seguidas dos processos de recuperação dos pesticidas pelo processo analítico de escolha.

As amostras foram cortadas em pequenos pedaços de cerca de dois centímetros, trituradas em processador de alimentos de laboratório até homogeneização completa e acondicionadas em frascos de vidro de boca larga com capacidade de 1kg. Da amostra homogeneizada, foram pesadas 11 alíquotas de 15 gramas cada, em bequer de forma alta com capacidade para 500 mL: 5 alíquotas para o nível de fortificação I, 5 alíquotas para o nível de fortificação II e 1 alíquota para a amostra Testemunha. As amostras, com exceção da Testemunha, foram fortificadas com 1,0 mL cada, com misturas das soluções padrões previamente preparadas em acetona grau resíduo, nas concentrações de 0,3 µg/ mL para cinco fortificações no nível 1LOQ e 1,5µg/ mL para cinco fortificações no nível 5LOQ.

As amostras assim fortificadas ficaram com concentrações finais de 0,02 mg/kg no nível 1LOQ e 0,10 mg/kg no nível 5LOQ de cada ativo em estudo. Após o processo de fortificação, as amostras ficaram no mínimo por três horas em capelas de exaustão, para a interação dos ativos com a matriz e evaporação do solvente utilizado na mistura dos padrões<sup>6,8</sup>.

Decorridos o tempo necessário, os pesticidas foram então extraídos com auxílio de um ultra Turrax, ajustado a 15.000 rpm, com 30 mL de acetona grau resíduo por 15 segundos, seguidos da adição de mais 60 mL da mistura dos solventes diclorometano e n-hexano grau resíduo, na proporção de 1:1, por mais 15 segundos. As duas amostras (Testemunha), bem como outra amostra contendo a mistura dos solventes utilizados (Branco) foram conduzidas da mesma forma nos ensaios, para verificação de possíveis contaminações e interferentes da matriz na área de interesse<sup>12</sup>.

As misturas, após homogeneização, foram filtradas em funil analítico contendo sulfato de sódio anidro, e dos extratos orgânicos, tomaram-se alíquotas de 0,3 mL para cada teste, para determinação das recuperações dos ativos em estudos. Os solventes das amostras foram evaporadas à temperatura ambiente até secar total e os resíduos foram novamente ressuspensos em mistura de isooctano-tolueno na proporção de 9:1 até o volume final de 1,0 mL. Foram injetados 1 µL de cada teste, em cromatógrafo gasoso equipado com detector de captura de elétrons.

As condições cromatográficas utilizadas foram as seguintes:

Equipamento: cromatógrafo gasoso marca Varian, com detector de captura de elétrons, com fonte de Ni<sub>63</sub>, modelo CP 3800, com injetor e amostrador automáticos.

Coluna: sílica fundida CP-8 (30 m x 0,25 mm x 1,5 µm de diâmetro de filme)

Injetor: temperatura 240°C

Modo de injeção: splitless

Detector: temperatura 300°C

Fluxo do gás de arraste: 1,5 mL/ min (Nitrogênio para ECD)

Rampa: 90°C por 3', 10°C/min até 180°C, 5°C/min até 230°C, 10°C/ min até 280°C mantendo por 10min. Tempo total da corrida = 55 minutos.

As determinações qualitativa e quantitativa dos resíduos recuperados foram obtidas pela média das três leituras consecutivas de cada ensaio nas curvas de calibração previamente realizadas com a mistura dos vários ativos em estudo no extrato orgânico obtido no processo de extração da amostra Testemunha para neutralizar o efeito matriz<sup>12,13</sup>. A identificação dos compostos foi feita pela comparação dos tempos de retenção dos picos obtidos nos ensaios com os respectivos padrões analíticos, e a determinação quantitativa dos compostos recuperados pelo método de padronização externa.

As concentrações dos pontos da curva de calibração analítica ficaram com as seguintes concentrações em ordem crescente, respectivamente: 0,005mg/kg; 0,01 mg/kg; 0,02 mg/kg (1 LOQ); 0,04 mg/kg; 0,06 mg/kg e 0,10 mg/kg (5 LOQ). As curvas de calibração com os fatores de correlação ( $r^2$ ) obtidos e ilustrados nas Figuras 2 a 9 fazem parte dos resultados.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A exatidão expressa a capacidade de um método analítico obter resultados próximos ao valor real e é estimada pelo cálculo do erro absoluto ou do erro relativo, sendo considerado a chave para a validação de um método<sup>4</sup>. Neste estudo, a exatidão foi avaliada pelos resultados obtidos nas recuperações das maçãs fortificadas e comparação estatística com os valores do padrão certificado.

Os valores das recuperações realizadas obtidos da média de três leituras e submetidos ao teste de hipóteses<sup>16</sup>, para verificação da exatidão do método são apresentados na Tabela 1.

Segundo vários autores<sup>11,14,15</sup>, para análise em nível de traços, costuma-se considerar como aceitável recuperações que estejam no intervalo de 70% a 120% do valor esperado, mesmo que no teste t se rejeite a hipótese nula  $H_0$  = recuperação 100%. Em análises de recuperações de pesticidas em baixos níveis de concentrações equivalentes aos limites de detecção e ao menor nível de quantificação (LOQ), o Codex Alimentarius<sup>8</sup> prevê recuperações em intervalos aceitáveis até entre 60% a 140%.

Para a confirmação da exatidão do método, os resultados das recuperações obtidos foram submetidos ao teste de hipóteses, em que, submetendo-se os resultados das recuperações obtidas nos ensaios ao teste *t de Student* que permite comparações entre séries simples para um determinado

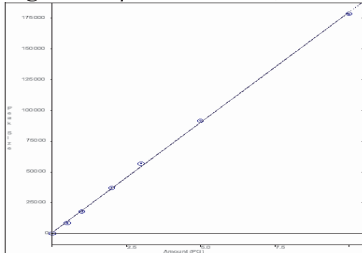
intervalo de confiança, foi possível avaliar os resultados quanto à exatidão do método. Assim, estabelecida como hipótese nula  $H_0$  = recuperação 100% e como hipótese alternativa  $H_1$  = recuperação ≠ de 100%, aplicou-se o teste *t de Student* com um intervalo de 99% de confiança e *n-1* graus de liberdade para cada ativo. Os valores obtidos do  $t_{calculado}$  mostraram-se abaixo do valor de  $t_{tabelado}$  para o intervalo de confiança estabelecido, aceitando-se a hipótese nula  $H_0$ , isto é, não existem diferenças

significativas entre as recuperações obtidas e o valor da recuperação 100% esperado.

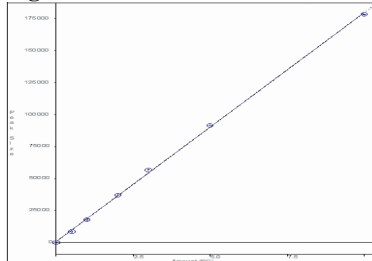
Para o cálculo do  $t_{calculado}$ , utilizou-se da seguinte equação:

$$t_{calculado} = \frac{\text{Rec \%} - 100 \%}{s / \sqrt{n - 1}}$$

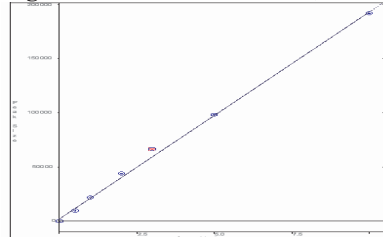
**Figura. 2.** β-HCH  $r^2 = 0,999904$



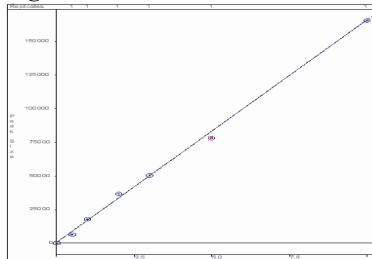
**Figura. 3.** Clorotalonil  $r^2 = 0,999494$



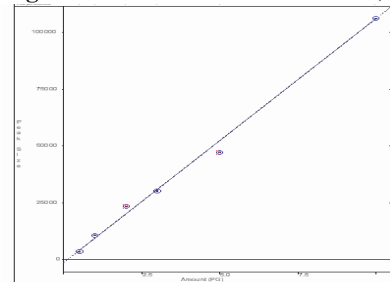
**Figura. 4.** Endosulfan I  $r^2 = 0,999111$



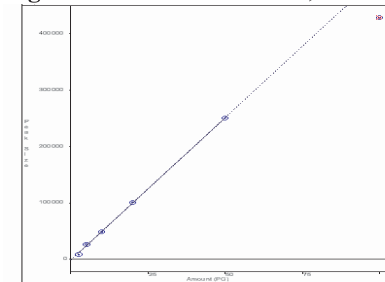
**Figura. 5.** Endosulfan II  $r^2 = 0,999163$



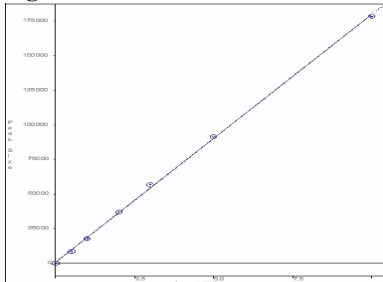
**Figura. 6.** Endosulfan sulfato  $r^2 = 0,999631$



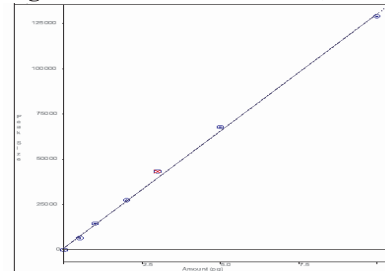
**Figura. 7.** Tetradifona  $r^2 = 0,999511$



**Figura. 8.** Trifluralina  $r^2 = 0,999393$



**Figura. 9.** Vinclozolina  $r^2 = 0,999277$



**Figuras 2 a 9.** Curvas de calibração dos pesticidas com os valores de coeficiente de correlação ( $r^2$ ) obtidos



**Tabela 1.** Valores de recuperações obtidos dos pesticidas

| Pesticidas           | n | Nível (mg/kg) | Recuperação média (%) | t <sub>calculado</sub> | S     | CV (%) |
|----------------------|---|---------------|-----------------------|------------------------|-------|--------|
| β-HCH                | 5 | 0,02          | 106                   | 1,20                   | 9,95  | 9,5    |
|                      | 5 | 0,1           | 83                    | -3,72                  | 9,12  | 11,0   |
| Clorotalonil         | 5 | 0,02          | 107                   | 1,36                   | 10,3  | 9,5    |
|                      | 5 | 0,1           | 111                   | 2,54                   | 8,64  | 7,8    |
| Endosulfan I         | 5 | 0,02          | 99                    | -0,15                  | 13,10 | 13,0   |
|                      | 5 | 0,1           | 95                    | -1,67                  | 5,97  | 6,3    |
| Endosulfan II        | 5 | 0,02          | 94                    | -1,02                  | 11,73 | 12,5   |
|                      | 5 | 0,1           | 93                    | -2,67                  | 5,24  | 5,5    |
| Endosulfan (sulfato) | 5 | 0,02          | 92                    | -1,37                  | 11,62 | 12,5   |
|                      | 5 | 0,1           | 93                    | -2,10                  | 6,65  | 7,3    |
| Tetradifona          | 5 | 0,02          | 74                    | -4,66                  | 9,87  | 13,5   |
|                      | 5 | 0,1           | -                     | -                      | -     | -      |
| Trifluralina         | 5 | 0,02          | 81                    | -3,39                  | 11,20 | 14,0   |
|                      | 5 | 0,1           | 92                    | -2,96                  | 5,40  | 6,0    |
| Vinclozolina         | 5 | 0,02          | 108                   | 1,05                   | 15,24 | 14,0   |
|                      | 5 | 0,1           | 103                   | 1,20                   | 4,97  | 5,0    |

n= numero de análises; S= Variância; CV= Coeficiente de Variação; t<sub>5</sub>, 99%= 4,032

Onde:

Rec= % recuperação média

100 =% recuperação esperada

s é o desvio padrão

n é o número de replicatas (Graus de Liberdade igual a

5 para este estudo)

A precisão de um método é definida como sua capacidade de fornecer resultados com baixa dispersão, ou seja, um método é considerado preciso quando ao analisar uma mesma amostra várias vezes, os resultados obtidos são bem próximos entre si e é estimada por medidas de dispersão, como desvio-padrão, variância e coeficiente de variação, entre outras.

Em análises de resíduos de pesticidas, considera-se que o método é preciso quando os coeficientes de variação apresentam-se menores que 20%. Este valor deve-se aos baixos níveis de concentração determinados<sup>5,13,15,18</sup>

O desvio padrão absoluto bem como o desvio padrão relativo ou coeficientes de variação obtidos a partir dos ensaios de recuperação são considerados adequados para análise de resíduos de pesticidas, quando valores iguais ou inferiores a 20% são encontrados, em que, dependendo dos níveis de concentração dos analitos ou massa a ser detectada, os desvios tornam-se maiores, nos quais as grandezas de variabilidade podem ser consideradas aceitáveis, conforme literaturas da área<sup>13, 18, 22,23</sup>. Na Tabela 2, são demonstrados os coeficientes de variação aceitáveis pela União Européia<sup>13</sup> e da AOAC<sup>5</sup>, em que, de acordo com o aumento das concentrações há uma diminuição dos desvios padrões relativos (CV%).

Para o estudo da precisão do método, foram verificados os parâmetros de repetitividade, obtidos nos graus de concordância entre os resultados das análises individuais dos procedimentos em que foram aplicados repetidamente às múltiplas análises, cinco em cada nível, da mesma amostra homogênea de maçãs, conduzidas em idênticas condições de teste, mesmo analista, mesmo equipamento, mesmo dia e mesmos reagentes. Como todos os valores do CV% dos ensaios de recuperação obtidos mostraram-se inferiores ao estabelecido na Tabela 2 nas concentrações ensaiadas entre 0,02 à 0,1 mg/Kg que equivaleriam a 10 à 100 µg/Kg com coeficientes de variação aceitáveis até 32%, o método avaliado nos ensaios para validação dos pesticidas βHCH, Clorotalonil, Endosulfam I, Endosulfam II, Sulfato de Endosulfam, Tetradifona, Trifluralina e Vinclozolina mediante ensaios de recuperação intralaboratorial foi considerado preciso na faixa de trabalho ensaiada, entre 0,02 à 0,1 mg/Kg de amostra, com

**Tabela 2.** Variabilidade por concentração (União Européia<sup>13</sup>)

| Concentração          | Coeficiente de variação (CV%) |
|-----------------------|-------------------------------|
| 1 µg/ Kg ( 1 ppb)     | 45                            |
| 10 µg/ Kg ( 10 ppb)   | 32                            |
| 100 µg/ Kg ( 100 ppb) | 23                            |
| 1 mg/ Kg ( 1 ppm)     | 16                            |

exceção do pesticida Tetradifona no nível 5 LOQ equivalente à concentração 0,1 mg/Kg, que teve esse ponto excluído da curva de calibração por encontrar-se fora do seu intervalo dinâmico.

## CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo ficaram dentro dos limites recomendados pela literatura para análise de resíduos de pesticidas apresentando uma boa exatidão e precisão para análise de pesticidas organohalogenados em maçãs nas condições experimentais. Este mesmo método poderá ser utilizado no desenvolvimento de novas pesquisas para validação de outros pesticidas de diferentes grupos químicos, levando-se em conta aspectos como custo, tempo, disponibilidade de pessoal e diversos materiais de referência a serem validados.

## REFERÊNCIAS

1. ABNT. NBR ISO 9001- **Sistemas de Gestão da Qualidade. Requisitos gerais**, Rio de Janeiro, 2000.
2. ABNT - NBR ISO/IEC 17025- **Requisitos gerais para competência de laboratórios de ensaio e calibração**, Rio de Janeiro, 2001.
3. ANVISA. **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA)**. [<http://anvisa.gov.br/toxicologia/index.htm>]. Acesso em 5 fevereiro de 2004.
4. Amarante Jr., O.P. et al. Validação de métodos analíticos: uma breve revisão. **Cad. Pesq.**, 12(1/2): 116-31, 2001.
5. AOAC / FAO/ IAEA/ IUPAC. **Guidelines for single laboratory validation of analytical methods for trace level concentrations of organic chemicals**. 2002, 8 p.
6. Brito, N. M. et al. Avaliação da Exatidão e Precisão de Métodos de Análise de Resíduos de Pesticidas Mediante Ensaio de Recuperação. **Pesticidas: R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente**, 12: 155-68, 2002.
7. Causon, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis: viewpoint and discussion. **J. Chromatogr. B.**, 689: 175, 1997.
8. Codex Alimentarius Commission/FAO/WHO. **In-House Method Validation**. Joint FAO/WHO Food Standards Programme. Codex Committée on methods of analysis and sampling. 23th session. Hungary, 2001.
9. Cowell, J. E.; Kunstman, J. L.; Nord, P. L. Validation of an analytical residue method for analysis of glyphosate and metabolite: an interlaboratory study. **J. Agric. Food Chem.**, 34(6): 955-60, 1986.
10. Feinberg, M.; Raguénés, N. Development and application of a standardized validation procedure for food chemistry laboratories. **Anal. Chim. Acta.**, 391: 239-52, 1999.
11. Gustavo-González, A.; Angeles-Herrador, M.; Asuero, A. G. Intra-laboratory testing of method accuracy from recovery assays. **Talanta**, 48: 729-36, 1999.
12. Hajslová, J. et al. Matrix-induced effects: a critical point in the gas chromatographic analysis of pesticides residues. **J. Chromatogr. A.**, 800: 283-95, 1998.
13. Horwitz, W.; Kamps, L.R.; Boyer, K.W., Quality assurance in the analysis of foods for trace constituents, **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, 63: 1344-55, 1980.
14. Hubert, P. H. et al. The SFSTP guide on the validation of chromatographic methods for drug bioanalysis: from the Washington Conference to the laboratory. **Anal. Chim. Acta.**, 391: 135-48, 1999.
15. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. **Validation of analytical procedures: methodology**. ICH, 1996.
16. Koehler, H. S. **Estatística experimental**. UFPR, Curitiba, 1996 (Apostila).
17. Krull, I.; Swartz, M. Validation viewpoint: quantitation in method validation. **LC-GC.**, 16(12): 1084-90, 1998.
18. Leite, F. **Validação em Análise Química**. Campinas - SP, 4ª edição, 2002.
19. Lee, S. M. et al. Multipesticide residue method for fruits and vegetables. **Fresenius. J. Anal. Chem.**, 339: 376-83, 1991.
20. Luke, M. A.; Froberg, J. E.; Matsumoto, H. T. Extraction and clean-up of organochlorine, organophosphate, organonitrogen and hydrocarbon pesticides in produce for determination by gas-liquid chromatography. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, 58(5): 1020-6, 1975.
21. Polesello, S. How to present an analytical method. **Food Chem.**, 58(1/2): 145-7, 1997.
22. Thier, H.P.; Zeumer, H. **Manual of pesticide analysis**. New York: Verlag Chemie, 1987. p.37-41
23. Thompson, M.; Ellison, L. R. S.; Wood, R. **Harmonized Guidelines for Single-Laboratory Validation of Methods of Analysis**. IUPAC, Hungary, 2002.
24. Zoonen, P. van et al. Multi-residue Method. Part 1. In: **Analytical methods for Pesticides Residues in Foodstuffs**, sixth edition, Netherlands, 1996, p. 1-8.

# Composição química de pratos à base de milho: comparação entre dados laboratoriais e de tabelas \*\*

## Chemical composition of maize dishes: comparison between laboratory and composition table data

RIALA6/996

Mara Reis SILVA<sup>1\*</sup>, Maria Margareth Veloso NAVES<sup>1</sup>, Amanda Goulart de OLIVEIRA<sup>1</sup>, Maria Sebastiana SILVA<sup>1</sup>

\* Endereço para correspondência: <sup>1</sup> Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Goiás, rua 227 s/nº quadra 68, Setor Universitário, Goiânia-GO, CEP 74605-080.

e-mail: marareis@fanut.ufg.br .

\*\* Resultados parciais da pesquisa foram apresentados na 54ª Reunião Anual da SBPC, Goiânia-GO, 2002.

### RESUMO

O presente estudo teve por objetivos determinar a composição química de pratos à base de milho e comparar os valores encontrados com aqueles existentes em tabelas e softwares disponíveis no Brasil. A composição centesimal de 12 preparações à base de milho foi determinada em laboratório (análise direta) e estimada utilizando-se tabelas brasileiras de composição química de alimentos e dois softwares nacionais (análise indireta). Os resultados foram avaliados por diferença percentual entre a média da análise direta e o valor único da análise indireta, e comparados através do teste t de Student com nível de significância de 5%. As diferenças no valor nutritivo dos pratos entre os dados de tabelas e os analisados em laboratório foram relevantes. As análises indiretas superestimaram os valores laboratoriais, sobretudo para lipídios, carboidratos e energia, e subestimaram os teores de proteína. Portanto, os materiais disponíveis sobre composição de alimentos devem ser utilizados com ressalva, reforçando-se, assim, a necessidade de elaboração de uma tabela de composição de alimentos a partir de dados de análises físico-químicas de alimentos e preparações usualmente consumidos no Brasil.

**Palavras-Chave.** milho, valor nutritivo, composição centesimal, composição química de alimentos.

### ABSTRACT

The objectives of this investigation were to determine the chemical composition of maize dishes and to compare it with the values derived from tables and software programs available in Brazil. The centesimal composition of 12 maize dishes was analyzed in a laboratory (direct analysis), and the values were estimated by means of Brazilian food composition tables and software programs (indirect analysis). The results were evaluated by calculating the percentage difference between the mean from direct analysis and the single value from indirect analysis, and were compared by means of Student's t Test with 5% confidence limits. Differences between table values and laboratory data for the foods nutritive value were statistically significant. The indirect analysis overestimated the laboratory values, mainly for lipids, carbohydrates and energy, but underestimated the protein contents. Therefore, tables for food composition should be used with caution. These results corroborate the necessity in preparing food composition tables from the direct analysis data on foods and dishes commonly eaten in Brazil.

**Key Words.** maize, nutritive value, centesimal composition, food chemical composition.

## INTRODUÇÃO

O milho e seus derivados constituem fontes importantes de energia e proteína para a alimentação humana, sendo no Brasil mais largamente consumidos na zona rural e na região nordeste<sup>4</sup>. Apesar do milho não ser o cereal-base da alimentação da maioria dos brasileiros, constitui um alimento de grande importância para a nossa cultura e culinária, sendo tradicionalmente utilizado em uma variedade de pratos doces e salgados, além de ser empregado em diversos produtos industrializados<sup>13,14</sup>.

O milho é um alimento essencialmente energético, uma vez que cerca de 70% do grão é composto por carboidratos, além de ser uma fonte considerável de proteína<sup>5,7</sup>. O cereal destaca-se também por conter quantidades significativas de fibras alimentares, ácidos graxos poliinsaturados e carotenóides<sup>10,11,14</sup>.

A composição química dos alimentos é uma ferramenta básica para o estabelecimento de diversas ações em saúde, desde a prescrição dietética individual, até estudos sobre o padrão de consumo de alimentos. Atualmente, existem no Brasil diversas tabelas e *softwares* de composição de alimentos à disposição dos profissionais especializados para a realização de avaliações dietéticas. Entretanto, os dados disponíveis são, em geral, antigos, desatualizados, compilados de tabelas estrangeiras e apresentam distorções que precisam ser identificadas e ponderadas<sup>18,19</sup>. Observa-se, ainda, que existem variações entre dados de composição química de alimentos obtidos por análise direta (em laboratório) e por análise indireta (por meio de tabelas e *softwares*), especialmente em alimentos processados, tendo sido recomendada a análise direta de preparações prontas<sup>15,20</sup>.

Nesse contexto, destacam-se os pratos à base de milho, cujos dados são escassos ou mesmo inexistentes nas tabelas disponíveis. Devido a isto e ao papel relevante do milho na nossa cultura e gastronomia, objetivou-se no presente trabalho determinar a composição química de pratos à base de milho e comparar os valores encontrados com aqueles existentes em tabelas e *softwares* disponíveis no Brasil.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Ingredientes e preparações

Para a elaboração das preparações à base de milho, os ingredientes necessários foram selecionados e adquiridos em comércio local (supermercados e feiras livres) de Goiânia-GO.

Foram elaboradas doze preparações à base de milho consideradas de consumo mais habitual na região (angu de milho, bolo de fubá, broa de fubá, canjica de milho, curau de milho, pamonha à moda, pamonha à moda frita, pamonha assada, pamonha de doce, pamonha de doce frita, pamonha de sal e pamonha de sal frita), no Laboratório de Técnica Dietética da Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Goiás. Alguns pratos, tais como o angu de milho, as pamonhas de doce, de

doce frita e de sal frita, foram processados conforme descrito em Naves *et al.*<sup>12</sup>, sendo os demais elaborados conforme método de preparo mais utilizado na região.

As preparações prontas para o consumo foram acondicionadas em sacos de plástico identificados e armazenados a -20°C, até o momento da realização das análises físico-químicas. Os ingredientes e respectivas quantidades utilizadas nas preparações à base de milho estão apresentados na Tabela 1.

### Análises físico-químicas (análise direta)

A composição centesimal dos pratos típicos foi determinada em triplicata, através das análises de umidade, conforme técnica descrita pelo Instituto Adolfo Lutz<sup>6</sup>; nitrogênio total, segundo o método de Kjeldahl<sup>1</sup> e conversão em proteína bruta utilizando-se o fator correspondente ao tipo de alimento; lipídios totais, extraídos por meio da técnica de Bligh e Dyer<sup>2</sup> e posteriormente determinados por gravimetria; fibra alimentar total, conforme técnica enzimica-gravimétrica descrita por Prosky *et al.*<sup>17</sup> e resíduo mineral fixo, por meio de incineração em mufla à 550°C<sup>1</sup>. Os carboidratos foram estimados por diferença, subtraindo-se de 100 os valores obtidos para umidade, proteínas, lipídios, resíduo mineral fixo e fibra alimentar total. O valor energético total (VET) das preparações à base de milho foi estimado considerando-se os fatores de conversão de Atwater de 4, 4 e 9 para proteína, carboidrato e lipídio, respectivamente.

### Estimativa do conteúdo de energia e nutrientes (análise indireta)

A composição em energia e nutrientes das preparações foi estimada utilizando-se tabelas de composição química de alimentos. Para a estimativa do conteúdo de energia e nutrientes (exceto a fibra alimentar), utilizou-se a tabela do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE)<sup>7</sup>, por ser uma das principais fontes nacionais sobre composição de alimentos. O conteúdo de fibra alimentar total foi estimado a partir dos dados da Tabela Brasileira de Composição de Alimentos<sup>9</sup> e de Mendez *et al.*<sup>11</sup>. Os valores da composição química do milho branco foram retirados da tabela de Franco<sup>5</sup>. Além de estimativa do conteúdo de energia e nutrientes através de tabelas, utilizou-se dois programas nacionais (*softwares*) de análise de dietas para microcomputador, denominados no presente estudo de *software* 1 (Diet PRO)<sup>3</sup> e *software* 2 (Virtual Nutri)<sup>16</sup>, sendo que para fibra alimentar usou-se apenas o *software* 2.

Em todas as preparações, o valor nutritivo foi estimado considerando-se a composição química dos alimentos crus usados em cada prato, uma vez que os dados apresentados em tabelas de composição e programas de cálculo de dietas referem-se, em geral, ao alimento *in natura*. Para efetuar a correção das quantidades de cada ingrediente da preparação pronta em ingrediente cru, determinou-se o índice de rendimento das preparações por meio da relação entre o peso do alimento preparado e o peso do alimento cru (sem considerar a água de adição).

**Tabela 1.** Ingredientes e respectivas quantidades (g) usadas no preparo dos pratos tradicionais à base de milho.

| Ingrediente           | Pratos à base de milho |              |              |                  |                |                |                      |                |                |                       |                |                      |  |
|-----------------------|------------------------|--------------|--------------|------------------|----------------|----------------|----------------------|----------------|----------------|-----------------------|----------------|----------------------|--|
|                       | Angu de milho          | Bolo de fubá | Broa de fubá | Canjica de milho | Curau de milho | Pamonha à Moda | Pamonha à moda frita | Pamonha assada | Pamonhade doce | Pamonha de doce frita | Pamonha de sal | Pamonha de sal frita |  |
| Açúcar cristal        | -                      | 165,0        | 75,0         | 162,0            | 250,0          | 2,5            | 2,5                  | 300,0          | 600,0          | 600,0                 | 5,0            | 5,0                  |  |
| Água                  | 1200,0                 | -            | 175,0        | -                | -              | -              | -                    | -              | -              | -                     | -              | -                    |  |
| Amendoim cru          | -                      | -            | -            | 85,5             | -              | -              | -                    | -              | -              | -                     | -              | -                    |  |
| Banha de porco        | -                      | -            | -            | -                | -              | 187,5          | 187,5                | -              | 400,0          | 400,0                 | 400,0          | 400,0                |  |
| Canela em pó          | -                      | -            | -            | 2,5              | -              | -              | -                    | 7,0            | -              | -                     | -              | -                    |  |
| Coco ralado           | -                      | -            | -            | 50,0             | -              | -              | -                    | -              | -              | -                     | -              | -                    |  |
| Cravo                 | -                      | -            | -            | -                | -              | -              | -                    | 2,0            | -              | -                     | -              | -                    |  |
| Erva-doce             | -                      | -            | 2,5          | -                | -              | -              | -                    | -              | -              | -                     | -              | -                    |  |
| Farinha de trigo      | -                      | 105,0        | -            | -                | -              | -              | -                    | -              | -              | -                     | -              | -                    |  |
| Fermento químico (pó) | -                      | 20,0         | -            | -                | -              | -              | -                    | 11,0           | -              | -                     | -              | -                    |  |
| Fubá de milho         | -                      | 100,0        | 120,0        | -                | -              | -              | -                    | -              | -              | -                     | -              | -                    |  |
| Leite                 | -                      | 180,5        | 174,0        | 687,0            | 800,0          | -              | -                    | -              | -              | -                     | -              | -                    |  |
| Lingüiça de porco     | -                      | -            | -            | -                | -              | 278,0          | 278,0                | -              | -              | -                     | -              | -                    |  |
| Manteiga de leite     | -                      | 120,0        | -            | -                | -              | -              | -                    | 140,0          | -              | -                     | -              | -                    |  |
| Massa de milho        | 500,0                  | -            | -            | -                | 500,0          | 1000,0         | 1000,0               | 900,0          | 2000,0         | 2000,0                | 2000,0         | 2000,0               |  |
| Milho branco          | -                      | -            | -            | 250,0            | -              | -              | -                    | -              | -              | -                     | -              | -                    |  |
| Óleo de soja          | -                      | -            | 76,0         | -                | -              | -              | 534,0                | -              | -              | 500,0                 | -              | 486,0                |  |
| Ovo                   | -                      | 110,0        | 225,0        | -                | -              | -              | -                    | 106,0          | -              | -                     | -              | -                    |  |
| Queijo minas curado   | -                      | -            | -            | -                | -              | -              | -                    | 90,0           | -              | -                     | -              | -                    |  |
| Queijo minas fresco   | -                      | -            | -            | -                | -              | 100,0          | 100,0                | -              | 200,0          | 200,0                 | 200,0          | 200,0                |  |
| Sal                   | -                      | 1,5          | 1,0          | 1,0              | 3,0            | 20,0           | 20,0                 | 1,0            | 10,0           | 10,0                  | 40,0           | 40,0                 |  |

### Análise comparativa dos dados

Os dados laboratoriais foram comparados com os estimados por meio de tabelas de composição de alimentos, através da diferença entre o valor médio de energia e de nutriente de cada preparação em estudo (análise direta) e o valor encontrado nas tabelas ou softwares (análise indireta).

Para analisar as diferenças existentes entre os valores obtidos por meio de análise direta e aqueles por análise indireta, foi aplicado o teste *t* de Student, com nível de significância de 5%. Os valores da análise indireta foram considerados únicos e constantes em relação ao valor médio da análise direta, da qual eram conhecidos o número de amostras analisadas e os desvios-padrões de cada preparação<sup>22</sup>. A fórmula apresentada a seguir foi utilizada para o cálculo do teste *t*.

$$t = \frac{\bar{X}_{AFQ} - Y}{s/\sqrt{n}}, \text{ onde:}$$

$\bar{X}_{AFQ}$  = média da análise físico-química;  
Y = valor único e constante da tabela ou software;  
*t* = valor de *t*;  
S = desvio-padrão;  
n = número de amostra.

A magnitude relativa da diferença entre análise direta e análise indireta dos valores de energia e de nutrientes foi estimada conforme a seguinte fórmula:

$$\Delta\% = \frac{(\bar{X}_{AFQ} - Y)}{\bar{X}_{AFQ}} \times 100, \text{ onde:}$$

$\Delta\%$  = Diferença percentual;  
 $\bar{X}_{AFQ}$  = média da análise físico-química;  
Y = valor único e constante da tabela ou software.

## RESULTADOS

A composição em nutrientes e valor energético das preparações à base de milho estão descritos na Tabela 2. Os índices de rendimento constatados no presente estudo e usados nas análises indiretas para a correção do peso do alimento cozido em peso do alimento cru foram, em ordem decrescente: angu de milho 2,52; canjica de milho 1,15; pamonha de sal 0,98; bolo de fubá 0,89; pamonha à moda e doce frita 0,88; curau de milho 0,87; broa de fubá 0,82; pamonha assada 0,81; pamonha de sal frita 0,78; pamonha de doce 0,77 e pamonha à moda frita 0,70.

O angu de milho foi a preparação com menor valor energético (38,63 kcal/100g), o que já era esperado, devido ao seu elevado teor de umidade (cerca de 90g/100g) e baixa concentração em macronutrientes. Ao contrário, a broa de fubá destacou-se pelo seu alto valor energético (391,91 kcal/100g) e conteúdo em carboidratos e lipídios (47,07 e 18,27g/100g, respectivamente). As pamonhas também apresentaram teores

elevados de lipídios (cerca de 10 a 23g/100g), sendo que as pamonhas fritas foram as preparações com maior quantidade de lipídios dentre todas analisadas, evidenciando uma elevada densidade energética devido às quantidades consideráveis de banha de porco e óleo vegetal utilizados nessas preparações (Tabela 1).

Por outro lado, observou-se baixas quantidades de fibra alimentar total nos pratos à base de milho, aproximadamente 1,0g/100g, com exceção da canjica de milho e bolo de fubá, cujos valores foram acima de 2,0 g/100g.

Constatou-se, ainda, que as preparações estudadas continham pequenas quantidades de cinzas, entretanto alguns pratos destacaram-se com valores acima de 2g/100g (bolo de fubá e as pamonhas à moda, à moda frita e de sal frita).

Na Figura 1 estão representadas as diferenças percentuais encontradas entre os valores das análises diretas e indiretas para energia e macronutrientes.

Observou-se que os dados das análises indiretas foram significativamente superiores aos valores encontrados nas análises diretas, havendo superestima de valores de até 110%. Como a diferença positiva entre os dados analisados e os tabelados não ultrapassou 40%, a composição química foi superestimada nas tabelas, na maioria dos casos. Destaca-se que os valores de energia de 11 preparações (93%) foram superestimados na tabela e nos dois softwares. Em relação aos valores de lipídios e carboidratos, todas as análises indiretas superestimaram 83% dos dados para ambos, sendo o software 2 o que apresentou os maiores percentuais de diferença para carboidratos e lipídios. Os valores para proteína, por sua vez, foram superestimados na tabela e no software 2 em 58% dos casos, sendo o único macronutriente que apresentou subestima considerável nas 3 fontes indiretas pesquisadas.

Constatou-se que os valores de umidade foram subestimados em todas as análises indiretas, exceto para broa de fubá e pamonha assada (Tabela 2). Em relação ao teor de cinzas, todos os dados obtidos na tabela estavam superestimados, ao passo que no software 2 houve subestima em 92% dos casos. O conteúdo de fibra alimentar foi superestimado nas tabelas em 83% das preparações, atingindo percentuais de diferença de até 200%, superiores aos dos demais nutrientes. O software 2 apresentou valores mais próximos da análise direta, superestimando o conteúdo de fibras em apenas 50% das preparações.

## DISCUSSÃO

Dados sobre índice de rendimento de preparações usualmente consumidas são escassos na literatura brasileira, levando a uma enorme dificuldade na avaliação dietética de indivíduos e de populações, visto que as tabelas de composição de alimentos não possuem grande variedade de preparações. Assim, o profissional de nutrição necessita desagregar os ingredientes da receita para estimar as quantidades de cada

**Tabela 2.** Composição centesimal e valor energético (análises direta e indireta) de pratos tradicionais à base de milho.

| Prato                 | Análise | Composição centesimal (g/100g) e energia (kcal/100g) |         |       |        |        |       |       |
|-----------------------|---------|--|---------|-------|--------|--------|-------|-------|
|                       |         | Umid   | Ener    | Prot  | Lip    | Carb   | Cinz  | FA    |
| Angu de milho         | AFQ     | 89,85  | 38,63   | 1,15  | 0,53   | 7,32   | 0,26  | 0,89  |
|                       | TAB     | 85,88*   | 51,19*  | 1,31* | 0,32*  | 11,03* | 0,32* | 1,14* |
|                       | S 1     | 87,07*   | 50,99*  | 1,30* | 0,32*  | 10,99* | 0,32* | -     |
|                       | S 2     | 83,32*   | 50,99*  | 1,30* | 0,32*  | 10,99* | 3,47* | 0,59* |
| Bolo de fubá          | AFQ     | 35,30  | 287,56  | 5,50  | 9,32   | 45,42  | 2,37  | 2,09  |
|                       | TAB     | 25,41*   | 358,45* | 6,12  | 16,61* | 47,26  | 2,76* | 1,84  |
|                       | S 1     | 27,99*   | 357,87* | 5,94  | 16,67* | 46,61* | 2,79* | -     |
|                       | S 2     | 30,53*   | 360,38* | 5,29  | 16,75* | 47,04* | 0,20* | 0,19* |
| Broa de fubá          | AFQ     | 22,23  | 391,91  | 9,81  | 18,27  | 47,07  | 0,95  | 1,67  |
|                       | TAB     | 31,44*   | 350,52* | 9,27* | 17,46* | 39,68* | 1,00* | 1,15* |
|                       | S 1     | 32,79*   | 348,76* | 9,23* | 17,45* | 39,70* | 0,83* | -     |
|                       | S 2     | 65,27*   | 342,47* | 8,33* | 16,46* | 39,88* | 0,34* | 0,26* |
| Canjica de milho      | AFQ     | 64,55  | 146,10  | 4,01  | 3,94   | 24,37  | 0,65  | 2,45  |
|                       | TAB     | 45,42*   | 183,82* | 5,65* | 8,16*  | 32,65* | 0,76* | 7,36* |
|                       | S 1     | 48,19*   | 227,16* | 5,36* | 4,57*  | 41,41* | 0,47* | -     |
|                       | S 2     | 35,73*   | 272,96* | 6,67* | 4,67*  | 50,80* | 0,22* | 1,91  |
| Curau de milho        | AFQ     | 66,17  | 142,97  | 2,82  | 2,54   | 27,21  | 0,88  | 0,38  |
|                       | TAB     | 60,97*   | 155,34* | 3,33* | 2,13*  | 31,58* | 1,01* | 0,98* |
|                       | S 1     | 62,08*   | 155,17* | 3,25* | 2,15*  | 31,61* | 0,91* | -     |
|                       | S 2     | 62,56*   | 154,91* | 3,17* | 2,12*  | 31,47* | 0,17* | 0,51* |
| Pamonha à moda        | AFQ     | 57,52  | 234,10  | 5,21  | 15,38  | 18,72  | 2,18  | 0,99  |
|                       | TAB     | 47,65*   | 295,49* | 6,11* | 21,31* | 20,01* | 2,89* | 2,03* |
|                       | S 1     | 50,31*   | 294,48* | 6,10* | 21,29* | 20,04* | 2,26* | -     |
|                       | S 2     | 48,86*   | 309,53* | 7,66* | 22,10* | 20,02* | 0,30* | 1,06  |
| Pamonha à moda frita  | AFQ     | 46,56  | 303,78  | 6,67  | 20,77  | 22,55  | 2,29  | 1,17  |
|                       | TAB     | 18,65*   | 514,62* | 7,47* | 43,40* | 24,46* | 3,53* | 2,49* |
|                       | S 1     | 21,92*   | 531,39* | 7,45* | 43,38* | 24,49* | 2,76* | -     |
|                       | S 2     | 21,43*   | 522,59* | 9,39* | 43,01* | 24,51* | 0,37* | 1,29* |
| Pamonha assada        | AFQ     | 37,18  | 295,98  | 5,29  | 10,81  | 44,39  | 1,42  | 0,91  |
|                       | TAB     | 33,12*   | 309,63* | 6,14* | 12,63* | 44,42  | 1,67* | 2,02* |
|                       | S 1     | 37,12  | 299,11  | 4,90* | 12,15* | 44,26  | 1,57* | -     |
|                       | S 2     | 37,54*   | 300,46* | 4,80* | 12,15* | 44,81* | 0,54* | 0,16* |
| Pamonha de doce       | AFQ     | 47,45  | 258,03  | 3,32  | 11,01  | 36,42  | 0,79  | 1,01  |
|                       | TAB     | 25,99*   | 372,73* | 4,12* | 19,18* | 47,14* | 1,31* | 2,26* |
|                       | S 1     | 28,33*   | 372,60* | 4,11* | 19,12* | 47,17* | 1,27* | -     |
|                       | S 2     | 28,10*   | 372,16* | 4,11* | 19,12* | 47,30* | 0,19* | 1,18* |
| Pamonha de doce frita | AFQ     | 34,97  | 345,41  | 3,65  | 18,11  | 41,95  | 0,94  | 0,39  |
|                       | TAB     | 26,71*   | 401,48  | 3,60  | 25,31* | 41,25  | 1,15* | 1,98* |
|                       | S 1     | 28,69*   | 400,98  | 3,60  | 25,33* | 41,27  | 1,11* | -     |
|                       | S 2     | 28,57*   | 392,80  | 3,60  | 25,25* | 41,38  | 0,17* | 1,03* |
| Pamonha de sal        | AFQ     | 57,59  | 231,27  | 4,16  | 14,95  | 20,01  | 1,95  | 1,34  |
|                       | TAB     | 51,30*   | 269,19* | 3,99  | 18,96* | 21,06* | 2,53* | 2,16* |
|                       | S 1     | 53,47*   | 268,81* | 4,08  | 18,92* | 21,05* | 2,48* | -     |
|                       | S 2     | 54,74*   | 268,82* | 3,98  | 18,92* | 21,05* | 0,19* | 1,12* |
| Pamonha de sal frita  | AFQ     | 43,28  | 325,63  | 5,43  | 22,66  | 25,00  | 2,41  | 1,23  |
|                       | TAB     | 24,71*   | 462,88* | 5,01* | 37,92* | 26,46  | 3,18* | 2,72* |
|                       | S 1     | 27,55*   | 462,41* | 5,00* | 37,88* | 26,45  | 3,12* | -     |
|                       | S 2     | 28,92*   | 454,51* | 5,00* | 37,88* | 26,45  | 0,24* | 1,41* |

Umid = Umidade; Ener = Energia; Prot = Proteína; Lip = Lipídios; Carb = carboidratos; Cinz = Cinzas; FA = Fibra alimentar. AFQ = Análise físico-química; TAB = tabela (IBGE)<sup>7</sup>, exceto para fibra alimentar<sup>9,11</sup> e dados da composição centesimal do milho branco da canjica de milho<sup>5</sup>; S1 = software 1 (Diet PRO)<sup>3</sup>; S2 = software 2 (Virtual Nutri)<sup>16</sup>.

\* Valores estatisticamente diferentes das médias da análise direta pelo teste *t* ( $p < 0,05$ ).

alimento usando o índice de rendimento da preparação. Nesse processo, pode ocorrer o aumento ou a redução da composição nutricional em função da quantidade de água de adição, como constatado no presente estudo para o angu de milho e a pamonha à moda frita (Tabela 2).

A grande maioria das preparações apresentou diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) na comparação entre os resultados analisados em laboratório e os dados disponíveis nas tabelas e *softwares*, sobretudo para lipídios, que atingiram diferenças percentuais de -110 a 17% (Figura 1). Essa tendência da análise indireta em superestimar o conteúdo de lipídios de alimentos processados já foi relatada na literatura<sup>18,20</sup>. A gordura residual em recipientes e utensílios usados no preparo dos alimentos, a incorporação da gordura de preparo ao alimento, bem como o método analítico empregado, são alguns fatores que podem explicar tais diferenças<sup>18</sup>. Para a proteína, os resultados da análise indireta superestimaram em no máximo 65% os valores da análise direta. Ao contrário, este macronutriente foi o mais subestimado pela análise indireta, atingindo diferenças de 40% (Figura 1).

Entre as tabelas de composição de alimentos e os *softwares* utilizados neste estudo, verificou-se que a maioria constitui-se de dados compilados de fontes internacionais. O uso de dados de origem estrangeira apresenta algumas limitações para estudos dietéticos, sobretudo por não conter alimentos e preparações usualmente consumidos no Brasil<sup>8,15</sup>. Por outro lado, a ausência de informações sobre técnicas de análises químicas, como os critérios e formas de amostragem, torna ainda mais limitante o uso de tabelas. Segundo Southgate e Greenfield<sup>21</sup>, o

número de amostras e o desvio-padrão são fundamentais para a avaliação dos dados das análises indiretas.

Em relação ao significado nutricional das constatações do presente estudo, vale destacar a tendência das tabelas de composição química de alimentos em superestimar valores de energia, de lipídios e de carboidratos, assim como de fibra alimentar, o que pode limitar e comprometer as ações voltadas para a prevenção e tratamento de distúrbios que envolvem o controle do balanço energético, especialmente obesidade e diabetes melito.

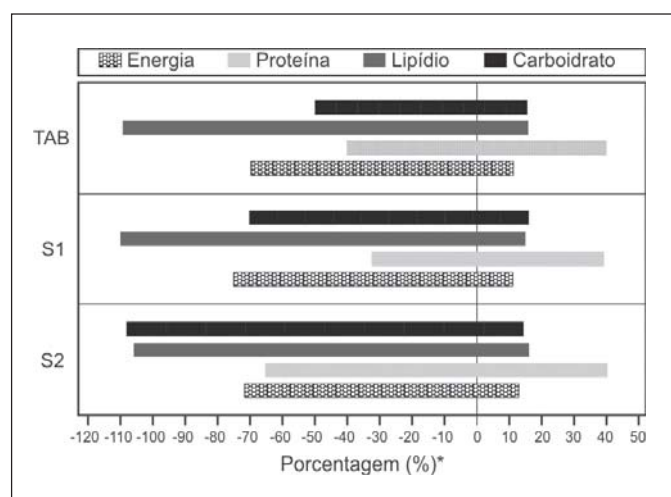
Conclui-se que as diferenças entre os dados de tabelas e os analisados em laboratório, em relação ao valor nutritivo de alimentos preparados, são relevantes e, portanto, os materiais disponíveis sobre composição de alimentos devem ser utilizados com ressalva. Sendo assim, reforça-se a necessidade de elaboração de uma tabela de composição de alimentos a partir de dados de análises físico-químicas de alimentos e preparações usualmente consumidos no Brasil.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a colaboração de Priscilla R. M. da Silva, na coleta de dados, assim como o apoio financeiro do Centro Colaborador em Alimentação e Nutrição da Região Centro-Oeste (convênio Ministério da Saúde/Universidade Federal de Goiás) e do CNPq (bolsa Pibic).

## REFERÊNCIAS

1. Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis**. 15<sup>th</sup> ed. Arlington: AOAC; 1990. 1298p.
2. Bligh, E.G.; Dyer, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Can. J. Biochem. Physiol.**, 37: 911-7, 1959.
3. Bressan, J.; Esteves, E. **Diet PRO**: sistema de suporte à avaliação nutricional e prescrição de dietas (software, versão 2.0 para Windows). Viçosa: Agromídia; [2002].
4. Dutra-de-Oliveira, J. E.; Cunha, S. F. C.; Marchini, J. S. Hábitos e consumo de alimentos. In: Dutra-de-Oliveira, J. E.; Cunha, S. F. C.; Marchini, J. S. **A desnutrição dos pobres e dos ricos**: dados sobre a alimentação no Brasil. São Paulo: Sarvier; 1996. p.15-30.
5. Franco, G. **Tabela de composição química de alimentos**. 9<sup>th</sup> ed. São Paulo: Atheneu; 2003.
6. Instituto Adolfo Lutz. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**: métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 2<sup>nd</sup> ed. São Paulo: IAL; 1985.
7. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Estudo Nacional da Despesa Familiar (ENDEF). **Tabela de composição de alimentos**. 5<sup>th</sup> ed. Rio de Janeiro: IBGE; 1999.
8. Lajolo, F.M.; Menezes, E.W. Composição de alimentos: uma análise retrospectiva e contextualização da questão. **Bol. SBCTA**, 31: 90-2, 1997.
9. Lajolo, F. M.; Menezes, E. W. **Tabela brasileira de composição de alimentos**: projeto integrado de composição de alimentos, [http://www.fcf.usp.br/tabela]. 30 out. 2002.
10. Mangels, A.R. et al. Carotenoid content of fruits and vegetables: an evaluation of analytic data. **J. Am. Diet. Assoc.**, 93: 284-96, 1993.
11. Mendez, M.H.M. et al. **Tabela de composição de alimentos**. Niterói: EDUFF; 1995.



**Figura 1.** Diferenças percentuais entre análises direta e indireta de pratos tradicionais à base de milho, para energia e macronutrientes.

\* Valores negativos indicam superestimação dos dados tabelados em relação aos laboratoriais, e os positivos, subestimação.

S1 = software 1 (Diet PRO)<sup>3</sup>; S2 = software 2 (Virtual Nutri)<sup>16</sup>; TAB = tabela (IBGE)<sup>7</sup>, exceto para dados da composição centesimal do milho branco da canjica de milho<sup>5</sup>.



12. Naves, M.M.V. et al. Goiás. In: Fisberg, M.; Wehba, J.; Cozzolino, S.M.F., editors. **Um, dois, feijão com arroz**: a alimentação no Brasil de norte a sul. São Paulo: Atheneu; 2002. p.18-39.
13. Naves, M. M. V. et al. **Culinária goiana**: valor nutritivo de pratos tradicionais. Goiânia: Kelps; 2004. 82p.
14. Philippi, S.T. Cereais, massas e pães. In: Philippi, S.T. **Nutrição e técnica dietética**. Barueri: Manole; 2003. p. 37-56.
15. Philippi, S.T.; Rigo, N.; Lorenzano, C. Estudo comparativo entre tabelas de composição química dos alimentos para avaliação de dietas. **Rev. Nutr. PUCCAMP**, 8: 200-13, 1995.
16. Philippi, S.T.; Szarfac, S.C.; Latterza, A. R. **Virtual Nutri** (software, versão 1.0 para Windows). São Paulo: Departamento de Nutrição da Faculdade de Saúde Pública da USP; 1996.
17. Prosky, L. et al. Determination of insoluble, soluble and total dietary fiber in foods products: interlaboratory study. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, 71: 1017-23, 1988.
18. Ribeiro, M.A.; Stamford, T.L.M.; Cabral Filho, J.E. Valor nutritivo de refeições coletivas: tabelas de composição de alimentos versus análises em laboratório. **Rev. Saúde Pública**, 29: 120-6, 1995.
19. Ribeiro, P. et al. Tabelas de composição química de alimentos: análise comparativa com resultados laboratoriais. **Rev. Saúde Pública**, 37: 216-25, 2003.
20. Silva, M.R. et al. Composição em nutrientes e valor energético de pratos tradicionais de Goiás. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, 23 (Supl.): 140-5, 2003.
21. Southgate, D.A.T.; Greenfield, H. Principles for the preparation of nutritional data bases and food composition tables. **World Rev. Nutr. Diet.**, 68: 27-48, 1992.
22. Spiegel, M.R. **Estatística**. 3<sup>th</sup> ed. São Paulo: Makron Books; 1993. (Trad. of Schaum's outline of theory and problems of statistics).

# Nitritos e nitratos em hortícolas produzidas pelos sistemas de cultivo convencional, orgânico e hidropônico na Região Metropolitana de Curitiba\*\*

Nitrites and nitrates in horticultures produced by the conventional, organic and hydroponic cultivation systems in the Metropolitan Region of Curitiba

RIALA6/997

Sônia C. STERTZ<sup>1\*</sup>, Patricia T. P. S. PENTEADO<sup>2</sup>, Renato João S. de FREITAS<sup>1</sup>

\* Endereço para correspondência: Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos - Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná - Caixa Postal 19011 - CEP 81531-990 - Curitiba, PR.

e-mail: stertz@engquim.ufpr.br

<sup>1,2</sup> Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR

\*\*Parte da tese de doutorado, apresentada pela primeira autora, à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos - Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.

## RESUMO

Os nitritos e nitratos acumulam-se naturalmente nos vegetais pelo efeito de diversos fatores, como temperatura, pluviometria, irrigação, regime de fertilização nitrogenada e insolação, podendo ocasionar riscos à saúde humana, relacionados à possibilidade de ocorrência da metahemoglobinemia e da formação de N-nitrosaminas com efeitos carcinogênicos, teratogênicos e mutagênicos. O objetivo deste trabalho foi avaliar o teor de nitritos e nitratos presentes em hortícolas convencionais (C), orgânicas (O) e hidropônicas (H), produzidas e/ou comercializadas na Região Metropolitana de Curitiba. Foram coletadas 141 amostras de hortícolas incluindo C, O e H e determinados os teores de nitritos e nitratos por cromatografia iônica de alta eficiência. As culturas que apresentaram as maiores concentrações (em mg/kg) de nitritos e nitratos foram: agrião C, O e H (498,37; 3259,59 e 2623,6); alface C, O e H (798,86; 459,98 e 1778,64); e espinafre C e O (1376,53 e 877,73). Consequentemente, foram as que apresentaram as maiores restrições ao consumo, variando de cerca de 81 e 100 g para o agrião orgânico e hidropônico, 330 e 148 g para a alface convencional e hidropônica e 192 a 301 g para o espinafre convencional e hidropônico, considerando a IDA para nitritos e nitratos fixada pela Comunidade Européia e FAO/WHO, para uma pessoa com 70 kg. Os menores valores foram obtidos nas culturas de batata C e O (75,83 e 15,52). O estudo indicou grande variação entre as culturas, o que sugere a necessidade de monitoramento e técnicas de manejo mais apropriadas para cada tipo de hortícola.

**Palavras-Chave.** nitritos, nitratos, nitrosaminas, alimentos orgânicos, alimentos hidropônicos, HPIC.

## ABSTRACT

Nitrites and nitrates are naturally accumulated in vegetables because of the effect produced by several factors as temperature, quantity of rainfall, irrigation, nitrogen fertilization regime, and sunstroke. Occurrence of contamination with chemical compounds may possibly cause risks to human health, related to the possibility of N-Nitrosamines formation, which may induce metahemoglobinemia, and because of their cancerogenic, teratogenic, and mutagenic effects. The goal of this study was to evaluate the drift of nitrites and nitrates present in conventional (C), organic (O) and hydroponic (H) horticultures produced and/or commercialized in the metropolitan region of Curitiba. A total of 141 samples of C, O and H horticultures were collected, and nitrites and nitrates contents were determined by means of HPIC. The highest concentration levels (in mg/kg) of nitrites and nitrates were detected in: C, O and H watercress (498.37, 3259.59, 2623.60, respectively); C, O and H lettuce (798.86, 459.98, 1778.64, respectively); C and O spinach (1376.53, 877.73, respectively). Consequently, according to the nitrites and nitrates contents established by DDI, EC, and FAO/WHO for a person weighting 70 kg, the analyzed horticultures presented highly restricting values for human consumption, that is: 81g and 100g in organic and hydroponic watercress,

respectively; 330g and 148g in organic and hydroponic lettuce, respectively; 192g and 301g in conventional and hydroponic spinach, respectively. The lowest values were obtained in C and O potato cultures (75.83 and 15.52, respectively). The present study indicated a great variation of these substances among the cultures, which suggests the necessity of monitoring and the most adequate handling techniques for each type of horticultural.

**Key Words.** nitrites, nitrates, nitrosamines, organic foods, hydroponic foods, HPIC.

## INTRODUÇÃO

A alta concentração de nitritos e nitratos em vegetais e seus possíveis efeitos sobre a saúde humana, principalmente em crianças, tem despertado a atenção de pesquisadores e órgãos de proteção à saúde durante muitos anos<sup>15,26,39</sup>.

Em 1990 e 1995, a European Commission's (EC) Scientific Committee for Food (SCF) e em 1996, o Joint Expert Committee on Food Additives FAO/WHO (JECFA FAO/WHO) consideraram a presença de nitrito e nitrato nos alimentos e suas implicações para a saúde humana, fixando uma Ingestão Diária Admissível (IDA) para os nitratos (3,7 mg/kg de peso corporal (pc) de íon nitrato e 5 mg/kg pc de nitrato de sódio) e para os nitritos (0,07 mg/kg pc de íon nitrito e 0,08 mg/kg pc de nitrito de sódio). Para uma pessoa com 70 kg corresponde a um aporte diário máximo admissível de 259 mg de íon nitrato e 4,9 mg de íon nitrito<sup>22,23,25</sup>.

Os Limites Máximos Tolerados (LMT) para nitratos em vegetais não estão bem definidos e são muito divergentes. Alguns autores reportam esses limites variando (em mg/kg de massa fresca) de 1000 na Itália, 2000 na Alemanha, 2500 a 4500 para alface e 2000 a 3000 para espinafre na França. Já na Jugoslávia, foi estabelecido o máximo de 50 mg/kg de  $KNO_3$  para alimentos infantis preparados com vegetais<sup>1,39,56</sup>. Entretanto, há que ser considerado a Ingestão Diária Aceitável (IDA), o tipo, a quantidade e o sistema de cultivo do alimento ingerido, além da idade do consumidor, entre outros fatores<sup>1,38,56</sup>.

No Brasil, ainda não existe uma legislação específica que regulamente os Limites Máximos Permitidos ou a Ingestão Diária Aceitável para nitritos e nitratos em alimentos de origem vegetal, apenas para produtos cárneos (150 e 300 mg/kg, respectivamente)<sup>6</sup> e águas de abastecimento (1 e 10 mg/kg, respectivamente)<sup>10</sup>.

Os nitritos e nitratos são de ocorrência natural em todas as plantas, como fonte essencial de nitrogênio e necessários para o seu crescimento normal. Dados obtidos em alguns estudos mostram que folhas, caules e flores de vegetais são ricos em nitratos, havendo hortaliças, como beterraba, rabanete, espinafre e alface, que apresentam particularmente altas concentrações<sup>42,54</sup>.

Os nitratos acumulam-se nas plantas pelo efeito de diversos fatores, como temperatura, pluviometria, irrigação, regime de fertilização nitrogenada e insolação. Estes dois últimos são fatores determinantes da acumulação de nitratos nas hortícolas, que contribuem com 80 a 87% do aporte de nitratos na alimentação humana<sup>1,29</sup>.

O perigo do nitrato à saúde humana reside na probabilidade de sua redução, antes ou após a ingestão dos

alimentos, e principalmente nos compostos que pode originar no tubo digestivo. As hortaliças tendem a acumular nitrato ( $NO_3^-$ ) nos seus tecidos, que sendo ingerido com os alimentos, no trato digestivo, pode ser reduzido a nitrito ( $NO_2^-$ ), entrando na corrente sanguínea, oxida o ferro ( $Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+}$ ) da hemoglobina, produzindo a metahemoglobina. Esta forma de hemoglobina é inativa e incapaz de transportar o oxigênio para a respiração normal das células nos tecidos, causando a chamada metaemoglobinemia. Esse risco é maior em crianças, devido a baixa acidez do estômago das mesmas. Existe também a possibilidade de formação de N-nitrosaminas, substâncias consideradas carcinogênicas, mutagênicas e teratogênicas, a partir da reação de nitritos e nitratos com aminas secundárias, em condições semelhantes às vigentes em estômagos de mamíferos<sup>1,31,35,38</sup>.

Lara et al.<sup>31</sup> investigaram a presença de nitratos em 85 amostras de alimentos infantis, espinafre fresco e cozido, para verificação dos níveis nesta hortaliça. Os resultados mostraram um alto nível de nitrato em produtos à base de espinafre, atingindo 2.314 mg/kg no creme de espinafre, 486 mg/kg nas folhas de espinafre cozido, 2.028 mg/kg na água de cocção e 2.629 no espinafre fresco, expressos em  $NaNO_3$ . Foi proposto pelos autores, e aceito pela empresa responsável pela comercialização dos cremes de espinafre, a retirada dos mesmos de sua linha de fabricação.

Visando atender à demanda alimentar da população e às tendências do mercado atual, a ciência agrícola tem trabalhado com novas formas de cultivo de hortícolas, como a agricultura orgânica e a hidropônica, entre outras<sup>4,12,30</sup>.

A **hidroponia**, de origem grega (*hidro* = água; *ponos* = trabalho) pode ser definida como o método capaz de desenvolver plantas na ausência do solo ou, simplesmente, cultivar sem solo. Os nutrientes que a planta precisa para seu desenvolvimento e produção são fornecidos somente através da água. Este significado opõe-se à agricultura **convencional**, que poderia ser denominada de geoponia (*geo* = terra), ou agroponia, que significa "trabalho da terra" ou simplesmente agricultura<sup>12,27</sup>.

Tanto no sistema de cultivo convencional como no hidropônico, é permitido o uso de agrotóxicos e fertilizantes químicos altamente solúveis, o que pode alterar a composição e qualidade dos alimentos, além da contaminação ambiental, do produtor e do consumidor. Em relação ao sistema de cultivo hidropônico, o mesmo apresenta custos iniciais elevados, necessidade de prevenção contra falta de energia elétrica, indispensáveis conhecimentos técnicos e de fisiologia vegetal para o acompanhamento freqüente do funcionamento do sistema

e da solução nutritiva, o que, supõe-se, têm desencorajado muitos produtores<sup>12,27,36</sup>.

Segundo a Instrução Normativa nº 007 de 17 de maio de 1999, o sistema de cultivo **orgânico** está baseado nos princípios do desenvolvimento sustentável: ecologicamente correto, economicamente viável e socialmente justo. O controle de pragas é feito preventivamente e há utilização apenas de adubo orgânico. O termo “agricultura orgânica” é atualmente utilizado com um sentido mais amplo, abrangendo os sistemas de agricultura orgânica, biodinâmica, natural, biológica, ecológica, permacultura, regenerativa, agroecológica e, às vezes, agricultura sustentável (BRASIL, 1999)<sup>5</sup>. Essas normas foram atualizadas pelo Ministério da Agricultura no dia 10 de Janeiro de 2002, através da Instrução Normativa nº 006 e no dia 23 de dezembro de 2003, através da Lei nº 10.831<sup>5,8,9</sup>.

No âmbito internacional, a FAO/WHO elaboraram a Norma Codex de Rotulagem de Produtos Organicamente Cultivados e os EUA também apresentaram a Política Norteamericana para Alimentos Orgânicos. Na Europa, foi elaborado em 1991 o Regulamento nº 2092/91 para a produção biológica de produtos agrícolas, sendo efetuada uma última alteração em 19/02/2000<sup>13,21,24</sup>.

Estudos que comparam alimentos obtidos pelos sistemas de cultivo convencional, orgânico e hidropônico em relação ao seu valor nutricional, qualidade sensorial e segurança alimentar têm sido realizados. Com exceção do conteúdo de nitratos, vitamina C e sólidos totais, não há evidências fortes de que alimentos orgânicos, convencionais e hidropônicos diferem em suas concentrações de nutrientes, havendo necessidade de novos estudos<sup>4,32,36</sup>.

Miyazawa et al.<sup>36</sup> avaliaram 101 amostras de alface obtidas através de três diferentes sistemas de cultivos. O teor de nitratos nas folhas de alface variou entre 250 a 11600 mg/kg (matéria seca) e acompanhou a ordem de concentração conforme o sistema de cultivo: orgânico < convencional < hidropônico. Segundo os autores, a crescente tecnificação da agricultura gerou distúrbios nas plantas, que não são adaptadas a intensas adubações para o aumento da produtividade, principalmente em hortaliças folhosas (espinafre, brócolis, couve, alface, agrião). O uso excessivo de fertilizante com base nitrogenada, associado à freqüente irrigação, acumula nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) e nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) nos tecidos das plantas, e no caso do nitrato o acúmulo é maior em baixa luminosidade (dias nublados e curtos, sombras e pela manhã). Os fatores genéticos são responsáveis pelas variações entre espécies e cultivares expostas à mesma condição de cultivo, espaçamento adensado, pragas e doenças.

Estes estudos indicam que ainda que o nitrato possa ocorrer naturalmente nos vegetais, pode haver o aumento e/ou acúmulo por fatores ambientais e genéticos, entre outros, relacionados ao próprio vegetal, porém trazendo riscos à saúde.

A agricultura da Região Metropolitana de Curitiba (RMC) está voltada basicamente para a produção de hortícolas, respondendo por 50% da produção do Estado do Paraná (cerca

de 784 mil toneladas). Ainda, parte destes alimentos apresentam resíduos de agrotóxicos<sup>7,31,40,41, 42,46,49,50,57</sup>

Neste contexto de produção agrícola, em especial nos últimos sete anos, o número de produtores e a demanda por produtos orgânicos aumentaram no Paraná e, principalmente, na RMC. Segundo a EMATER-PR<sup>20</sup>, isto pode ser evidenciado pelo crescimento do número de produtores superior a 500%, assim como pela proporção de 50% dos 3908 produtores orgânicos com certificação, em 2003, e os demais em fase de conversão entre os sistemas de cultivo convencional ao orgânico.

A cromatografia iônica é apropriada para uma análise rápida e simultânea de ânions em amostras de vegetais (hortícolas em geral), uma vez que a relativa facilidade de operação e preparo mínimo da amostra conduzem à sua aplicação na análise de rotina. Este método analítico está ganhando uma ampla aceitação como um método útil e adequado para a determinação de ânions (Cl<sup>-</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> e SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) em amostras do meio ambiente e na pesquisa agrícola. Essas amostras eram tradicionalmente analisadas por métodos espectrofotométricos ou eletroquímicos, mas estes podem sofrer interferência de outras espécies presentes além de consumirem muito tempo<sup>11,18,58</sup>.

Neste sentido, o objetivo do presente trabalho foi avaliar os teores de nitritos e nitratos em hortícolas produzidas na RMC pelos sistemas de cultivo convencional, orgânico e hidropônico por cromatografia iônica de alta eficiência.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material

#### Amostras

Entre vários tipos de hortícolas produzidas e/ou comercializadas na RMC foram selecionadas: agrião d'água, cv. Folha Larga (*Nasturtium officinale* R. Be., Brassicaceae), alface cressa, cv. Verônica (*Lactuca sativa* L., Compositaceae), batata, cv. Mona Lisa (*Solanum tuberosum* L., Solanaceae), cenoura, cv. Brasília (*Daucus carota* L., Umbelliferae), couve-flor cv. Terezópolis (*Brassica oleracea* L., Cruciferae), espinafre, cv. Nova Zelândia (*Tetragonia tetragonoides* (Pall.) O. Kuntze (T. expansa), Aizoaceae), morango, cv. Tundlas e Camarosa (*Fragaria ananassa* Duch., Rosaceae), pepino caipira, cv. Prima pax (*Cucumis sativus* L., Cucurbitaceae), tomate cereja, cv. Cindy (*Lycopersicon esculentum* var. *cerasiforme* (Duval) A. Gray., Solanaceae) e tomate salada, cv. Caqui ou Carmen (*Lycopersicon esculentum* var. L., Solanaceae).

A seleção das amostras baseou-se nos seguintes critérios: culturas convencionais com maiores índices de contaminação com agrotóxicos em monitoramentos efetuados pela Secretaria da Saúde do Estado do Paraná no período de 1982 a 2000 e culturas convencionais, orgânicas e hidropônicas mais comercializadas na RMC<sup>17,20,27,46,49,57</sup>.

No período de abril/2001 a janeiro/2002, foram coletadas 141 amostras de hortícolas (62 convencionais, 62 orgânicas e

17 hidropônicas), adquiridas em supermercados, feiras, CEASA-PR, associações de produtores (AOPA, APAC) e diretamente com produtores, em estágio de maturação comercial, de acordo com os Procedimentos de Retirada de Amostras<sup>2,14</sup>.

## Métodos

### Preparo das amostras

Os lotes das amostras, com cerca de 5 quilos cada, foram coletados e transportados para o laboratório de Química Analítica Aplicada/UFPR, dentro de caixas de isopor contendo gelo, em um período máximo de três horas após a coleta.

As amostras foram ligeiramente lavadas com água corrente e água destilada (para eliminar sujidades) e secas ligeiramente com guardanapo de papel (para retirar o excesso de umidade). Em seguida, foram levadas à estufa com circulação forçada de ar (Marconi MA 035), na temperatura de 55-60° C, durante 12 horas ou até peso constante. Após homogeneizadas e trituradas em um multiprocessador de alimentos (Wallita mega master pro), em baixa rotação (3000 rpm) por dois minutos, foram passadas em tamis de 2 mm de diâmetro.

### Determinação da umidade

A umidade das amostras foi determinada em estufa (Marconi MA 035) com circulação forçada de ar, com temperatura de 55-60° C durante 12 horas, ou até peso constante, conforme método 925.10 da AOAC<sup>3</sup>.

### Preparo da amostra para análise

Pesou-se 0,5g de amostra seca e transferiu-se para um balão volumétrico de 100 mL com auxílio de água destilada e deionizada. Deixou-se em contato por 1 hora agitando-se ocasionalmente. Completou-se o volume e filtrou-se em papel filtro faixa preta (Whatmann 389).

### Determinação de nitritos e nitratos por HPIC

Os teores de nitritos e nitratos foram determinados conforme metodologia 4110 B, descrita no Standard Methods<sup>47</sup>.

Procedeu-se à leitura direta em um Cromatógrafo Iônico de Alta Eficiência (HPIC), Dionex modelo DX-500, consistindo de coluna Ion-Pac AS14A (4x250mm); pré-coluna AG-14 (4x50mm); detector de condutividade modelo ED 40; amostrador automático modelo AS 40, observando-se as recomendações do manual do usuário da DIONEX<sup>19</sup>, bem como os parâmetros de calibração e validação da metodologia utilizada.

As condições de operação foram as seguintes: eluição isocrática; fluxo 1,2mL/minuto; volume de injeção 50 µL; limite de detecção 0,05mg/L; limite de quantificação 0,05mg/L; faixa de recuperação 97-104%; eluente mistura de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (8mmol/L) e NaHCO<sub>3</sub> (1mmol/L).

### Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente utilizando-se o programa MSoffice Microsoft Excel<sup>34</sup> para o cálculo das médias, desvio padrão e coeficiente de variância.

Com o auxílio do programa Minitab<sup>37</sup>, os dados foram submetidos à análise de variância e teste F para verificar a ocorrência de diferenças estatisticamente significativas (pd<sup>\*\*</sup>0,05) entre os sistemas de cultivo avaliados, para cada tipo de cultura. As médias foram comparadas pelo Teste de Tukey para identificar as diferenças entre os tratamentos orgânico, convencional e hidropônico.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A determinação de nitritos e nitratos, mesmo que limitada à produção regional, serve não apenas para agregar informações sobre os teores destes compostos em diferentes hortícolas, mas também avaliar, comparativamente, os sistemas de cultivo e indicar a segurança no consumo das mesmas.

Os teores de nitritos e nitratos em diversas hortícolas produzidas em condições de sistema convencional (C), orgânico (O) e hidropônico (H) produzidas e/ou comercializadas na RMC são apresentados na Tabela 1.

A Tabela 1 mostra que a maioria das amostras não apresentou diferença estatística significativa (pd<sup>\*\*</sup>0,05), quando comparados os sistemas de cultivo convencional e orgânico, porém diferindo das amostras obtidas pelo sistema de cultivo hidropônico. Apesar disto, de um modo geral, os dados encontrados no presente trabalho apresentaram grande amplitude entre os valores mínimo e máximo, o que pode justificar os altos valores no desvio padrão. Em alguns casos, o desvio padrão excede a média, fato que explica a não ocorrência de diferença estatística significativa (ns) entre algumas das culturas analisadas, quando comparadas em relação ao sistema de cultivo.

Alguns estudos<sup>11,16,28,29,58</sup> que compararam hortícolas (espinafre, agrião, alface, batata, tomate e cenoura) cultivadas nos sistemas convencional e orgânico, tratadas com diferentes tipos de fertilizantes, em relação aos teores de nitrogênio e nitrato, não mostraram diferenças estatisticamente significativas, devido à considerável variabilidade de valores encontrados. Entretanto, outros autores apontam níveis mais baixos de nitratos para os produtos orgânicos, principalmente nas culturas de alface, batata, cenoura e espinafre<sup>4,32,33, 44,51,53</sup>.

Outros dados de literatura mostram grandes variações nos níveis de nitratos obtidos nas amostras de hortícolas, como espinafre (82 mg/kg a 3784 mg/kg), alface (396 mg/kg a 5735 mg/kg) e cenoura (18 mg/kg a 947 mg/kg) analisadas por diferentes pesquisadores, devendo ser considerados fatores, como amostras obtidas através de diferentes tipos de cultivo e variações edafoclimáticas<sup>36,54</sup>.

Ainda na Tabela 1 observa-se que as culturas de agrião, couve-flor, cenoura e pepino apresentaram concentrações médias maiores de nitratos no sistema orgânico; as culturas de alface, batata, morango no sistema convencional e concentrações similares nas culturas de espinafre e tomates provenientes dos sistemas orgânico e convencional. Quando

**Tabela 1.** Teores de nitritos, nitratos e umidade em hortícolas obtidas pelos sistemas de cultivo convencional, orgânico e hidropônico na Região Metropolitana de Curitiba

| Culturas      | Convencional                 |    | Orgânico                     |    | Hidropônico                   |                               |
|---------------|------------------------------|----|------------------------------|----|-------------------------------|-------------------------------|
|               | Determinações                | n  | Média±DP                     | n  | Média±DP                      | Média                         |
| Agrião        | NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> | 06 | 481,0±683,28 <sup>ns</sup>   | 06 | 585,86±680,20 <sup>ns</sup>   | 941,20±641,87 <sup>ns</sup>   |
|               | NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> |    | 17,32±6,66 <sup>ns</sup>     |    | 2673,74±4152,86 <sup>ns</sup> | 1682,42±2446,88 <sup>ns</sup> |
|               | S                            |    | 498,32±683,08 <sup>ns</sup>  |    | 3259,60±4485,62 <sup>ns</sup> | 2623,62±2421,26 <sup>ns</sup> |
|               | Umidade                      |    | 92,32±2,06 <sup>ns</sup>     |    | 92,33±2,10 <sup>ns</sup>      | 94,18±1,25 <sup>ns</sup>      |
| Alface        | NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> | 06 | 368,53±449,63 <sup>ns</sup>  | 06 | 196,14±334,36 <sup>ns</sup>   | 670,94±424,87 <sup>ns</sup>   |
|               | NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> |    | 430,34±386,59 <sup>ns</sup>  |    | 263,83±162,66 <sup>ns</sup>   | 1107,70±1424,96 <sup>ns</sup> |
|               | S                            |    | 798,86±679,78 <sup>a</sup>   |    | 459,97±347,61 <sup>a</sup>    | 1778,64±1308,61 <sup>b</sup>  |
|               | Umidade                      |    | 94,18±0,57 <sup>ns</sup>     |    | 94,46±0,49 <sup>ns</sup>      | 94,77±1,01 <sup>ns</sup>      |
| Batata        | NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> | 06 | 3,03±3,37 <sup>ns</sup>      | 06 | 0,00±0,00 <sup>ns</sup>       | -                             |
|               | NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> |    | 72,80±140,20 <sup>ns</sup>   |    | 15,52±5,83 <sup>ns</sup>      | -                             |
|               | S                            |    | 75,83±138,72 <sup>ns</sup>   |    | 15,52±5,83 <sup>ns</sup>      | -                             |
|               | Umidade                      |    | 82,22±0,59 <sup>a</sup>      |    | 78,74±3,01 <sup>b</sup>       | -                             |
| Cenoura       | NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> | 06 | 69,62±123,34 <sup>ns</sup>   | 06 | 230,64±373,99 <sup>ns</sup>   | -                             |
|               | NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> |    | 640,73±512,19 <sup>ns</sup>  |    | 796,04±369,71 <sup>ns</sup>   | -                             |
|               | S                            |    | 710,35±487,91 <sup>ns</sup>  |    | 1026,68±689,09 <sup>ns</sup>  | -                             |
|               | Umidade                      |    | 90,46±0,67 <sup>ns</sup>     |    | 90,30±2,31 <sup>ns</sup>      | -                             |
| Couve-flor    | NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> | 06 | 45,95±61,13 <sup>ns</sup>    | 07 | 8,57±13,78 <sup>ns</sup>      | -                             |
|               | NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> |    | 54,23±92,72 <sup>ns</sup>    |    | 196,54±212,45 <sup>ns</sup>   | -                             |
|               | S                            |    | 100,18±146,11 <sup>ns</sup>  |    | 205,11±207,66 <sup>ns</sup>   | -                             |
|               | Umidade                      |    | 90,93±0,88 <sup>ns</sup>     |    | 90,86±1,84 <sup>ns</sup>      | -                             |
| Espinafre     | NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> | 07 | 1109,78±358,54 <sup>a</sup>  | 06 | 596,66±363,07 <sup>b</sup>    | -                             |
|               | NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> |    | 266,75±311,01 <sup>ns</sup>  |    | 281,07±614,96 <sup>ns</sup>   | -                             |
|               | S                            |    | 1376,53±237,22 <sup>ns</sup> |    | 877,73±786,61 <sup>ns</sup>   | -                             |
|               | Umidade                      |    | 92,17±2,23 <sup>ns</sup>     |    | 93,02±1,18 <sup>ns</sup>      | -                             |
| Morango       | NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> | 07 | 32,85±29,25 <sup>ns</sup>    | 06 | 40,45±30,66 <sup>ns</sup>     | -                             |
|               | NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> |    | 153,37±111,82 <sup>ns</sup>  |    | 89,09±51,36 <sup>ns</sup>     | -                             |
|               | S                            |    | 186,22±100,61 <sup>ns</sup>  |    | 129,54±53,96 <sup>ns</sup>    | -                             |
|               | Umidade                      |    | 90,68±1,17 <sup>ns</sup>     |    | 90,42±1,20 <sup>ns</sup>      | -                             |
| Pepino        | NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> | 06 | 37,02±86,26 <sup>ns</sup>    | 06 | 14,35±30,12 <sup>ns</sup>     | -                             |
|               | NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> |    | 246,92±198,13 <sup>ns</sup>  |    | 427,38±411,79 <sup>ns</sup>   | -                             |
|               | S                            |    | 283,94±226,60 <sup>ns</sup>  |    | 441,73±439,00 <sup>ns</sup>   | -                             |
|               | Umidade                      |    | 95,76±0,33 <sup>ns</sup>     |    | 95,86±0,80 <sup>ns</sup>      | -                             |
| Tomate cereja | NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> | 06 | 85,04±208,30 <sup>ns</sup>   | 06 | 0,73±1,79 <sup>ns</sup>       | 4,04±4,51 <sup>ns</sup>       |
|               | NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> |    | 183,68±114,18 <sup>ns</sup>  |    | 181,18±94,78 <sup>ns</sup>    | 258,51±178,29 <sup>ns</sup>   |
|               | S                            |    | 268,72±162,60 <sup>ns</sup>  |    | 181,91±96,07 <sup>ns</sup>    | 262,55±181,80 <sup>ns</sup>   |
|               | Umidade                      |    | 91,01±1,16 <sup>ns</sup>     |    | 92,08±0,71 <sup>ns</sup>      | 91,55±0,70 <sup>ns</sup>      |
| Tomate salada | NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> | 06 | 57,34±136,47 <sup>ns</sup>   | 07 | 1,91±1,46 <sup>ns</sup>       | 7,08±6,38 <sup>ns</sup>       |
|               | NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> |    | 90,06±198,77 <sup>ns</sup>   |    | 98,32±92,56 <sup>ns</sup>     | 179,43±0,39 <sup>ns</sup>     |
|               | S                            |    | 147,40±220,38 <sup>ns</sup>  |    | 100,23±93,10 <sup>ns</sup>    | 186,51±5,99 <sup>ns</sup>     |
|               | Umidade                      |    | 93,52±0,42 <sup>ns</sup>     |    | 94,88±1,37 <sup>ns</sup>      | 94,16±0,80 <sup>ns</sup>      |
| TOTAL         | NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> | 62 | 229,02±442,35 <sup>a</sup>   | 62 | 167,53±347,48 <sup>a</sup>    | 405,82±583,37 <sup>b</sup>    |
|               | NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> |    | 215,59±295,94 <sup>a</sup>   |    | 502,27±1428,61 <sup>a</sup>   | 807,02±1694,97 <sup>b</sup>   |
|               | S                            |    | 444,61±530,98 <sup>a</sup>   |    | 669,80±1617,08 <sup>a</sup>   | 1212,84±1833,25 <sup>b</sup>  |
|               | Umidade                      |    | 91,32±3,60 <sup>a</sup>      |    | 91,29±4,80 <sup>a</sup>       | 93,49±1,50 <sup>b</sup>       |

NOTA: S= soma dos teores de nitritos e nitratos; n= número de amostras analisadas; DP = desvio padrão, \*valores apresentados em base úmida, em mg/kg; a, b - médias na mesma linha com letras iguais não diferem estatisticamente entre si no nível de 5% (p≤0,05); ns - não significativo; - não determinado (hortícolas não disponíveis no sistema de cultivo hidropônico na RMC)

comparados os três sistemas, as culturas do sistema hidropônico apresentaram as maiores médias para os teores de nitrato, exceto na cultura de agrião do sistema orgânico.

As culturas que apresentaram as maiores concentrações (em mg/kg) de nitritos e nitratos foram: agrião C, O e H (498,37; 3259,59 e 2623,6); alface C, O e H (798,86; 459,98 e 1778,64); espinafre C e O (1376,53 e 877,73) e cenoura C e O (710,35 e 1026,68), sendo sugerido sua inclusão em programas de monitoramento.

Em alguns casos (agrião, alface e espinafre), os teores de nitritos apresentaram-se elevados, chegando a superar os teores de nitratos nas respectivas culturas. Para Petersen e Stoltze<sup>43</sup>, geralmente os nitritos ocorrem nos alimentos em concentrações mais baixas do que os nitratos, embora condições impróprias de transporte e estocagem possam elevar sua concentração.

O fato de a maioria das hortaliças hidropônicas e convencionais ter apresentado teores mais elevados de nitritos e nitratos (Tabela 1) tem sido atribuído por alguns autores à maior disponibilidade de nitrogênio nesses sistemas. No sistema de cultivo hidropônico, o fertilizante nitrogenado é fornecido nas formas de nitrato, amônio e uréia. O nitrato dissolvido na água facilita a absorção pela raiz, absorvendo uma quantidade muito acima da capacidade da planta de reduzir o nitrato para amônia, acumulando o excedente no tecido vegetal. O sistema de cultivo convencional também utiliza fertilizantes químicos de média e alta solubilidade e concentração. Já no sistema de cultivo **orgânico**, são utilizadas menores quantidades de fertilizantes com menor concentração e disponibilidade de nitrogênio, como adubos orgânicos à base de resíduos animais e vegetais (esterços, compostos, restos de folhas, vegetais, lixo orgânico, etc.), além de rochas moídas, que permitem uma lenta liberação de nutrientes e baixa lixiviação<sup>1,36,48,52</sup>.

Considerando que para a Comissão Européia<sup>22,23</sup> e FAO/WHO<sup>25</sup> uma pessoa com 70 kg corresponde a IDA de 263,90 mg de íons nitrato e nitrito, a Tabela 2 apresenta a IDA para cada tipo de cultura/cultivo, calculados a partir da Tabela 1. Observa-se que as culturas de agrião, alface e espinafre são as que apresentaram as maiores restrições ao consumo, variando de cerca de 81 e 100 g para o agrião orgânico e hidropônico, 330 e 148 g para a alface convencional e hidropônica e 192 a 301 g para o espinafre convencional e hidropônico, respectivamente. Para crianças devem ser considerados 10% dos valores apresentados.

Os resultados apresentados vêm justificar a preocupação da National Academy of Science – NAS<sup>29</sup> e da Agence Française de Securite Sanitaire des Aliments - AFSSA<sup>1</sup> que estimaram ser os vegetais os responsáveis por 80-87% dos nitratos em uma dieta normal, recomendando a necessidade de procedimentos que diminuam os níveis de nitratos nos alimentos e, principalmente, nos vegetais componentes da dieta de bebês. Algumas medidas poderiam contribuir para a diminuição dos teores de nitratos nas hortícolas, como a melhoria da fertilização nitrogenada através do limite dos adubos orgânicos ricos em

**Tabela 2.** Ingestão Diária Aceitável – (IDA) – considerando cada cultura analisada em relação aos nitritos e nitratos

| Culturas      | Sistema de Cultivo |          |             |
|---------------|--------------------|----------|-------------|
|               | Convencional       | Orgânico | Hidropônico |
| agrião        | 529,58             | 80,96    | 100,59      |
| alface        | 330,35             | 573,73   | 148,37      |
| batata        | 3480,15            | 17033,87 | -           |
| cenoura       | 371,51             | 257,04   | -           |
| couve-flor    | 2634,26            | 1286,63  | -           |
| espinafre     | 191,71             | 300,66   | -           |
| morango       | 1417,14            | 2037,21  | -           |
| pepino        | 929,42             | 597,42   | -           |
| tomate cereja | 982,06             | 1450,72  | 1005,14     |
| tomate salada | 1790,37            | 2632,94  | 1414,94     |

NOTA: Valores apresentados em g de amostra fresca.

IDA - fixada pela EC (1992, 1998) e FAO/WHO (1996); quantidade que pode ser consumida por um indivíduo com 70 kg para atingir 100% da IDA em relação à soma de nitritos e nitratos.

nitrogênio de rápida assimilação, o monitoramento da mineralização do nitrogênio, além da limitação dos plantios em estufa. Recomenda-se também a utilização de bactérias que degradam o nitrato junto aos efluentes da indústria, em especial da agroquímica. A *Pseudomonas halodenitrificans* pode degradar ininterruptamente mais de 40 kg diários de nitratos por metro cúbico de efluente, transformando-os em nitrogênio molecular, um elemento gasoso inerte<sup>1,29,45</sup>.

Para a AFSSA<sup>1</sup>, os métodos de agricultura biológica/orgânica permitem a redução de 30 a 50% nos teores de nitratos das hortícolas, em relação aos métodos convencionais, sendo que os métodos de fertilização (essencialmente orgânicos) autorizados para esse tipo de cultura<sup>5,8,9</sup> explicam as diferenças observadas. Essa redução parece interessante, uma vez que a ingestão diária total de nitratos na França é pouco inferior à dose diária aceitável e que as recomendações nutricionais atuais apontam para um aumento no consumo de hortícolas, devido a seus efeitos potencialmente protetores (doenças cardiovasculares, câncer), ricos em fibras, vitaminas e outros micronutrientes.

A comparação dos sistemas de cultivo pode ser afirmada apenas para as condições do estudo, visto a diversidade e complexidade de fatores que influenciam a absorção do nitrogênio pelas plantas e sua conseqüente transformação em nitritos e nitratos<sup>1,4,28</sup>.

## CONCLUSÕES

Observou-se uma predominância de amostras obtidas pelo cultivo orgânico com menores teores de nitritos e nitratos,

quando comparadas às do sistema convencional e hidropônico.

A concentração de nitritos e nitratos nas culturas analisadas apresentaram a seguinte relação: alface, tomate cereja e tomate salada - O<C<H; espinafre, morango e batata - O<C; agrião - C<H<O; couve-flor, cenoura e pepino - C<O.

As culturas que apresentaram as maiores concentrações (em mg/kg) de nitritos e nitratos foram: agrião C, O e H (498,37; 3259,59 e 2623,6); alface C, O e H (798,86; 459,98 e 1778,64); espinafre C e O (1376,53 e 877,73) e cenoura C e O (710,35 e 1026,68).

As culturas de agrião, alface e espinafre foram as que apresentaram as maiores restrições ao consumo, variando de cerca de 81 e 100 g para o agrião orgânico e hidropônico, 330 e 148 g para a alface convencional e hidropônica e 192 a 301 g para o espinafre convencional e hidropônico, respectivamente, considerando a IDA para nitritos e nitratos fixada pela Comissão Europeia e FAO/WHO, para uma pessoa com 70 kg.

O estudo indicou grande variação e altos teores de nitritos e nitratos entre as hortícolas, o que sugere necessidade de monitoramento cuidadoso e técnicas de manejo mais apropriadas para cada tipo de cultura (notadamente da fertilização nitrogenada), objetivando reduzir os teores nesses alimentos e examinando-os à luz de conclusões e reavaliações em curso sobre a toxicidade dos nitritos e nitratos em humanos.

#### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio financeiro fornecido pela Fundação Araucária-PR – Projeto 567.

#### REFERÊNCIAS

1. AFSSA. Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments. **Evaluation nutritionnelle et sanitaire des aliments issus de l'agriculture biologique**. [http://www.afssa.fr/dossiers/index.asp?id\_dossier=4267.htm]. 30 out 2003.
2. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Ministério da Saúde. **Procedimentos de Retirada de Amostras**, Anexo V da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. [http://www.anvisa.gov.br/alimentos/tox/manual/anexo\_05.htm]. 16 dez 2001.
3. AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 17<sup>th</sup>. ed., Volume I e II, Gaithersburg, 2000.
4. Bourn, D.; Prescott, J. A Comparison of the Nutritional Value, Sensory Qualities, and Food Safety of Organically and Conventionally Produced Foods. **Crit Rev Food Sci**, 42: 1-34, 2002.
5. Brasil. **Normas disciplinadoras para a produção, tipificação, processamento, envase, distribuição, identificação e certificação da qualidade de produtos orgânicos, sejam de origem animal ou vegetal**. IN nº 007 de 17 de maio de 1999, DOU de 19 de maio de 1999a.
6. \_\_\_\_\_. **Atribuição de Aditivos, Categoria 8 – Carnes e Produtos Carnêos**. Portaria nº 1004 de 11.12.1998 da SVS/MS. Diário Oficial, 54-E, 22 de março de 1999b.
7. \_\_\_\_\_. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Ministério da Saúde. **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos – Relatório Anual 2001-2002**. [www.anvisa.gov.br/alimentos.htm]. 10 dez. 2003a. 18 p.
8. \_\_\_\_\_. Presidência da República. Lei nº 10.831, de 23 de dezembro de 2003. **Dispõe sobre termos credenciamento, inspeção e certificação de Produção Orgânica**. Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil, 24 de dezembro de 2003, seção 1, página 8. 2003b.
9. \_\_\_\_\_. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 6, de 10 de Janeiro de 2002. **Dispõe sobre termos credenciamento, inspeção e certificação de Produção Orgânica**. Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil, 16 de janeiro de 2002. [http://acd.ufrj.br/consumo/legislacao/n\_ma\_in06\_02.htm]. 2 fev. 2004.
10. \_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. **Procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade**. Portaria nº 518/GM em 25 de março de 2004.
11. Bosch, N.B.; Mata, M.G.; Peñuela, M.J.; Galán, T.R.; Ruiz, B.L. Determination of nitrite levels in refrigerated and frozen spinach by ion chromatography. **J. Chromatogr. A** 706: 221-8, 1995.
12. Carmo Jr., R. R. **O que é a hidroponia?**, [http://www.hidroponica.cjb.net]. 1 nov 2003.
13. CCE. **Regulamento (CEE) nº 2092/91, de 24 de junho de 1991**. Modo de produção biológico de produtos agrícolas e à sua indicação nos produtos agrícolas e nos gêneros alimentícios. Jornal oficial no. L 198 de 22/07/1991 p. 0001 – 0015. Última alteração: 300R0331 (JO L 048 19.02.00 p.1). [http://www.ibd.com.br/legislacao/CE2092.htm]. 20 mar 2004.
14. CCE. Comissão das Comunidades Europeias. Recomendação da Comissão, de 3 de Março de 1999. Jornal Oficial nº L 128 de 21/05/1999 p. 0025 – 0055, [http://europa.eu.int/eur-lex/pt/lif/dat/1999/pt\_399HO333.html]. 10 fev 2003.
15. Cheng, C.F.; Tsang, C.W. Simultaneous determination of nitrite, nitrate and ascorbic acid in canned vegetable juices by reverse-phase ion-interaction HPLC. **Food Addit. Contam.** 15: 753-8, 1998.
16. Clark, M.S. et al. Nitrogen, weeds and water as yield-limiting factors in conventional, lowinput, and organic tomato systems. **Agric. Ecosyst. Environ.** 73: 257-70, 1999.
17. Darolt, M. R. **As Dimensões da Sustentabilidade: Um Estudo da Agricultura Orgânica na Região Metropolitana de Curitiba**. Curitiba, 2000. [Tese Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Meio Ambiente e Desenvolvimento – Universidade Federal do Paraná].
18. Dionex, Technical Note 112: **Determination of Nitrate and Nitrite in Meat Using High-Performance Anion-Exchange Chromatography**, Sunnyvale, CA. p. 1-4, 1998. (Disponível na biblioteca da ACATEC).
19. Dionex Corporation. **AS14A Manual**. Doc. No. 031678-01, 34 p. Sunnyvale, CA, 1999.
20. EMATER. Empresa Paranaense de Assistência Técnica e Extensão Rural. **Relatório Técnico: Processo de Agricultura Orgânica**, Curitiba, 26p. 2003.
21. EUA. Política Norteamericana em Orgânicos. **Proposta de normatização para rotulagem, produção e comercialização de produtos ditos orgânicos** [http://acd.ufrj.br/consumo/legislacao/leituras/lo\_politica\_eeuu.htm]. 2 fev. 2004.
22. EC. European Commission, **Scientific Committee for Food**, Report of the Scientific Committee for Food on Nitrate and Nitrite (26<sup>th</sup> series). [Opinion expressed on 19 October 1990], 1992.
23. EC. European Commission, **Reports of the Scientific Committee for Food** (38<sup>th</sup> series). Opinion on Nitrates and Nitrites, Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities), p.1-33, 1998.
24. FAO/WHO. **Norma CODEX de Rotulagem de produtos organicamente cultivados** Draft Guidelines for the Production, Processing, Labelling and Marketing of Organically Produced Foods (Agenda Item 4). [http://acd.ufrj.br/consumo/legislacao/n\_cx\_al99\_22a.htm]. 2 fev. 2004.
25. JECFA FAO/WHO. Joint Expert Committee on Food Additives FAO/WHO. **Toxicological evaluation of certain food additives and contaminants in food**. WHO Food Additives Series 35, Geneva, WHO, 1996.



26. Gangolli, S.D. et al. Assesmente: nitrate, nitrite and N-nitrosocompounds. *European Journal of Pharmacology, Environmental Toxicology and Pharmacology*, 292: 1-38, 1994.
27. Hamerschmidt, I. **Hidroponia ao Alcance de Todos**. EMATER-PR. Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento (apostila p/curso técnico). 27 p., 1997.
28. Hornick, S.B. Factors affecting the nutritional quality of crops. **Am. J. Altern. Agric.** 7: 63-8, 1992.
29. Huarte-Mendicoa, J.C.; Stiasarán, I.; Bello, J. Nitrate and Nitrite levels in fresh and frozen broccoli. Effect of freezing and cooking. **Food Chem.** 58: 39-42, 1997.
30. Khatounian, C.A. **A reconstrução ecológica da agricultura**. Botucatu: Agroecológica; 2001. 348 p.
31. Lara, W.H.; Takahashi, M.Y.; Yabiku, H.Y. Níveis de nitrato em alimentos infantis. **Rev Inst Adolfo Lutz**, 40(2):147-52, 1980.
32. Leclerc, J. et al. Vitamin and mineral contents of carrot and celeriac under mineral or organic fertilization. **Biol. Agric. Hort.** 7: 349-61, 1991.
33. Lieblein, G. **Quality and yield of carrots: effects of composted manure and mineral fertilizer**. Norway, 1993. [PhD Thesis - Department of Horticulture, Agricultural University of Norway].
34. Microsoft Corporation. **MSoffice Microsoft Excel 97**. Redmond, WA, c 1995-1997. CDROM 6 MB.
35. Mirvish, S.S. Role of N-nitroso compounds (NOC) and N-nitrosation in etiology of gastric, esophageal, nasopharyngeal and bladder cancer and contribution to cancer of known exposures to NOC. **Cancer Letters**, 93: 17-48, 1995.
36. Miyazawa, M.; Khatounian, C.A.; Odenath-Penha, L.A. Teor de nitrato nas folhas de alface produzida em cultivo convencional, orgânico e hidropônico. **Agroecologia Hoje**. 9: 23, 2001.
37. Minitab. **Reference Manual Release 7**. Minitab Inc, 3081, Enterprise Drive, State College PA, 16801 US, Elinor Cruze and Jim Weldon. 6-10, 6-11, 1989.
38. OHSE, S. **Qualidade nutricional e acúmulo de nitrato em alface hidropônica**. In: Hidroponia da alface. SANTOS, O. (editor) Impr. Univ. UFSM: Santa Maria, RS. p. 10-24. 2000.
39. Olmedo, R. G.; Bosch, N. B. Ingestion de nitratos procedentes de productos hortaliças, y su incidencia toxicológica. **Alimentaria**, 25: 76-8, 1998.
40. Paraná a. **Hortaliças Paraná – Evolução da Área Colhida e da Produção Obtida – 93/94 – 00/01**. Estima. 08/2002. [http://www.pr.gov.br/seab/deral/ehpr.xls]. 10 out 2003.
41. Paraná b. **Frutas Paraná – Evolução da Área Colhida e da Produção Obtida – 1992 a 2001**. [http://www.pr.gov.br/seab/deral/ehpr.xls]. 10 out 2003.
42. Paraná c. Secretaria de Estado da Saúde. Relatório do Programa de Análise de **Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos no Estado do Paraná**, junho de 2001 a junho de 2002/ Secretaria de Estado da Saúde, Curitiba: SESA, 2003. 55 p.
43. Petersen, A.; Soltze, S. Nitrate and nitrite in vegetables on the Danish market: content and intake. **Food Addit. Contam.** UK, 16:(7) 291-9, 1999.
44. Raupp, J. Examination of some microbiological and biochemical parameters and tests of product quality used in a long-term fertilization trial. **Am. J. Altern. Agric.** 13: 138-44, 1998.
45. Roux, J.C.; Verméglio, A; Besnainou, B. Despoluição: os microorganismos ganham terreno. **França-Flash Meio Ambiente**, 9: 6-7, 2000.
46. Scucato, E.S.; Yoshiyara, A.C.P.; Stertz, S.C. Resíduos de Agrotóxicos em Hortifrutícolas. **Anais do XII Encontro Nacional de Analistas de Alimentos**, p 255, Maceió, 2001.
47. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 20<sup>th</sup> ed. American Public Health Association, Washington, 1998.
48. Starling, W.; Richard, M.C. Quality organically grown wheat and barley. **Asp Appl Biol**, 25: 193-8, 1990.
49. Stertz, S.C.; Scucato, E.S.; Belger, M. Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos Comercializados no Estado do Paraná de 1993 a 1999. **Anais do XVII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Fortaleza, 2000.
50. Stertz, S.C.; Train, J.M.; Freitas, R.J.S. Resíduos de Agrotóxicos em Hortícolas Orgânicas, Convencionais e Hidropônicas Produzidas e/ou Comercializadas na Região Metropolitana de Curitiba - RMC. **Anais do 13º Encontro Nacional de Analistas de Alimentos. “Novas Tecnologias em Alimentos: impactos e riscos à saúde”**, Rio de Janeiro. 22 a 25 de junho de 2003.
51. Stopes, C. et al. The nitrate content of vegetable and salad crops offered to the consumer as from “organic” or “conventional” production systems. **Biol. Agric. Hort.** 5: 215-21, 1988.
52. Storey, T.; Hogan, R.; Humpheys, J. The growth, yield and quality of winter wheat and winter oats grown under an organic conversion. **Asp. Appl. Biol.**, 36: 199-204, 1993.
53. Vogtmann, H. et al. Enhanced food quality: effects of composts on the quality of plant foods. **Comp. Sci. Utiliz.** 1: 82-100, 1993.
54. Walker, R. Naturally Occuring Nitrate/Nitrite in Foods. **J. Sci. Food. Agric.** 26: 1735-42, 1975.
55. Ysart, G.; Clifford, R.; Harrison, N. Monitoring for nitrate in UK-grown lettuce and spinach, **Food Addit. Contam.**, 16:(7) 301-6, 1999.
56. Zago, V.C.P. et al. Aplicação de esterco bovino e uréia na couve e seus reflexos nos teores de nitrato e na qualidade. **Hortic. Bras.** 17:(3) 207-211, 1999.
57. Zandoná, M. S.; Zappia, V.R.S.. Resíduos de Agrotóxicos em alimentos: resultado de cinco anos de monitoramento realizado pela Secretaria de Saúde do Paraná, **Pesticidas: R Téc Cient**, Curitiba, 3:(3) 49-95, 1993.
58. Zhou, M.; Guo, D. Simultaneous determination of chloride, nitrate and sulphate in vegetable samples by single-column ion chromatography. **Microchemical Journal**, 65: 221-6, 2000.

# Contaminação das águas subterrâneas por nitrato em Presidente Prudente – SP, Brasil\*\*

## Nitrate contamination in groundwater in Presidente Prudente-SP, Brazil

RIALA6/998

Manoel Carlos T. F. de GODOY<sup>1</sup>, Marcos Norberto BOIN<sup>2</sup>, Daniele Cristina SANAIOTTI<sup>3</sup>, Joel B. da SILVA<sup>4</sup>

\* Endereço para correspondência: <sup>1</sup> Professor Assistente Doutor, Departamento de Geografia, Faculdade de Ciências e Tecnologia, UNESP, Rua Roberto Simonsen, 305 CEP 19060-900, Presidente Prudente/SP  
e-mail: godoy@prudente.unesp.br

<sup>2</sup> Assistente Técnico, PHD, Promotoria da Justiça do Meio Ambiente – Presidente Prudente

<sup>3</sup> Discente do Curso de Geografia, Faculdade de Ciências e Tecnologia, UNESP

<sup>4</sup> Auxiliar de Laboratório, Instituto Adolfo Lutz, Laboratório I, Presidente Prudente/SP

\*\* Trabalho apresentado no 13<sup>o</sup>. Congresso Brasileiro de Águas subterrâneas (ABAS), 19 a 22 de outubro de 2004, Cuiabá/MT

### RESUMO

A pesquisa teve como objetivo delimitar zonas de contaminação das águas subterrâneas por nitrato na área urbana de Presidente Prudente-SP, Brasil, verificar a sua possível relação com a expansão da urbanização e apontar prováveis causas do fenômeno a ser caracterizado. Os trabalhos executados incluíram a consulta aos arquivos do Instituto Adolfo Lutz com referência a análises físico-químicas de águas subterrâneas, a localização dos pontos de coleta de amostras pelo sistema de coordenadas UTM, o tratamento geoestatístico dos dados das análises por meio do Programa *Surfer- Surface Mapping System*, com a interpolação por *Krigagem linear*. Este mapeamento realça a localização da contaminação em áreas bem definidas, estando os poços contaminados em zona inscrita na área de ocupação urbana anterior ao ano de 1962. Como fontes da contaminação, a pesquisa executada distingue o vazamento de esgoto doméstico, a lixiviação de fossas e a lixiviação de depósitos variados de resíduos sólidos. Os resultados das análises evidenciam também a opção de vários exploradores de águas subterrâneas da cidade pela redução do teor de nitrato por meio de resina de troca iônica, cujo emprego se tem mostrado eficiente.

**Palavras-Chave.** nitrato, águas subterrâneas, urbanização, Presidente Prudente, filtro de resina

### ABSTRACT

The aims of this study were to define the territorial limits of groundwater nitrate contamination in urban area of Presidente Prudente, SP - Brazil, to find out a correlation between this occurrence and the urbanization development, and also to point out the potential sources of contamination. The investigation was based on retrospective groundwater physical-chemical analysis from the data recorded in Instituto Adolfo Lutz archives, and on the geostatistical treatment of analyses data by means of Surfer-Surface Mapping System associated with the values interpolation by linear krigage method. These mapping data showed that nitrate contamination zones were well defined, being located within the limits of an area which was urbanized until 1962, and different sources of the contamination were indicated, including leaking sewers, leaching from old pit-latrines and from diverse kinds of waste sites. The results also showed the incapability of being remedied and evidenced the option made by several private groundwater exploiters in removing the exceeding nitrate content from the wells water, by installing an ion-exchange resin system, which was proved to be effective.

**Key- Words.** groundwater, nitrate, urbanization, ion-exchange resin, Presidente Prudente

## INTRODUÇÃO

O presente artigo refere-se a uma pesquisa executada na cidade de Presidente Prudente, com o fim de delimitar zonas de contaminação das águas subterrâneas por nitrato e caracterizar a associação destas zonas com a expansão da área urbana. Nesta cidade os sinais desta contaminação tornaram-se mais freqüentes a partir de 1990, com a intensificação da captação de água através de poços tubulares em sua área urbana e peri-urbana. As informações, esparsas, mas significativas, sobre o fenômeno levaram pesquisadores a refletirem sobre questões básicas associadas a ele, tais como a sua gravidade, as prováveis fontes de contaminação, a possibilidade de sua expansão em área, providências factíveis para a remediação do dano representado por ele e a proteção aos aquíferos e à saúde da população.

Uma particularidade da questão, frente à revelação do fenômeno e ao crescimento significativo da demanda das águas subterrâneas na cidade, é a providência do tratamento da água após a captação. Trata-se de instalação de equipamento destinado à redução do teor de  $\text{NO}_3^-$  por resina de troca iônica. Dependendo do grau de consumo de água, o investimento neste tratamento é encarado como a medida alternativa à desativação dos poços instalados e em funcionamento.

A pesquisa é inovadora no Brasil no tocante à delimitação de zonas de contaminação dos aquíferos subterrâneos por nitrato em cidade de porte médio. Deve ser ressaltado nela o fato de ter sido empregado um método que possibilita a definição de zonas identificadas por uma gama de valores distinguidos em ordem crescente, de modo a evidenciar as áreas críticas no tocante à presença da contaminação. Os resultados da pesquisa terão o papel de alertar sobre este problema o departamento responsável pela gestão de recursos hídricos no estado de São Paulo e os órgãos encarregados da vigilância sanitária em níveis estadual e municipal, informando as autoridades competentes da possibilidade de reduzir, através de um equipamento apropriado, o grau de contaminação por nitrato nas águas captadas no município de Presidente Prudente e região.

A associação da contaminação das águas subterrâneas por nitrato com o adensamento demográfico da urbanização é tema de numerosos trabalhos científicos. Em pesquisa referente à qualidade das águas subterrâneas na cidade de Nottingham, Reino Unido, Lerner et al<sup>9</sup> correlacionam as altas concentrações de nitrato ao crescimento da cidade. Nesse caso estudado, é apontado mais de um agente da contaminação, sendo incluídos em tal condição os vazamentos das redes públicas de abastecimento de água e de coleta de esgoto, a lixiviação de aterros sanitários e de depósitos de resíduos industriais.

Em Liverpool, Reino Unido, em pesquisa que incluiu análises com isótopo de nitrogênio, Whitehead et al<sup>14</sup> identificam a rede de esgoto, cuja implantação foi iniciada no século XVIII, como a fonte predominante da contaminação do principal aquífero situado abaixo da cidade.

Em estudo sobre os impactos da urbanização na qualidade das águas subterrâneas, em Tel-Aviv, Israel,

Zilberbrand et al<sup>15</sup> enfatizam a contribuição de antigas fossas sanitárias para o processo de contaminação por nitrato.

No Brasil têm merecido particular atenção os casos de contaminação na Região Oeste do estado de São Paulo, especialmente em aquíferos do Grupo Bauru. Em São José do Rio Preto, de acordo com Castro et al<sup>4</sup>, a partir de 1962 os recursos hídricos subterrâneos conquistaram uma condição de fonte significativa de água para diversos usos. Análises químicas de água captada de poços tubulares revelaram progressivo aumento do teor de nitratos na zona urbana. Como fontes prováveis da contaminação, são apontados os despejos de esgoto próximos aos poços que apresentam os mais altos valores de concentração de  $\text{NO}_3^-$ .

Godoy<sup>6</sup>, em pesquisa realizada através de uma estação piloto em Presidente Prudente, estudou a contaminação por nitrato do aquífero freático que foi derivada de vazamento de coletor de esgoto e de acúmulo de restos vegetais em torno e no interior de uma cacimba. No tocante à contaminação pelo vazamento de esgoto, é correlacionado o aumento progressivo no teor de  $\text{NO}_3^-$  à variação positiva dos teores de  $\text{Cl}^-$  e  $\text{Na}^+$ . É caracterizada também a alta suscetibilidade à contaminação do aquífero livre da Formação Adamantina e o papel das condições físicas e químicas das zonas saturada e insaturada, as quais, em Presidente Prudente, favorecem a introdução de nitratos no aquífero livre.

Segundo relatório da CETESB<sup>5</sup>, os casos registrados de contaminação por nitratos no estado de São Paulo referem-se predominantemente a amostras coletadas na sua porção ocidental, em aquíferos do Grupo Bauru.

Quanto ao emprego da resina de troca iônica, conforme esclarece Gregg<sup>7</sup>, já na década de 1970 era pesquisada a viabilidade de sua aplicação ao tratamento da água destinada ao abastecimento público de um distrito pertencente à cidade de Garden, no Condado de Nassau – USA. O sistema empregado para este fim foi adaptado de processo desenvolvido originalmente para a desmineralização de efluentes industriais. Shenkein e Condoluto<sup>12</sup> descrevem o processo já instalado nessa mesma comunidade, ressaltando a sua eficiência e a sua aceitação como a alternativa ao abandono de poços já instalados e em funcionamento.

Tanto nos Estados Unidos quanto no Reino Unido e na China, o desenvolvimento de sistemas aplicáveis à diminuição do teor de nitrato em águas captadas de aquíferos subterrâneos para o fim de abastecimento público é considerada uma necessidade urgente, devido à ocorrência patente e definitiva de contaminação das águas subterrâneas em regiões, condados e cidades importantes<sup>10,11,13</sup>.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material

A cidade de Presidente Prudente está localizada na porção ocidental do estado de São Paulo, a aproximadamente

560km de distância da capital do estado por via rodoviária (Figura 1). De acordo com o censo demográfico de 2000<sup>2</sup>, o município reúne uma população de 189.186 habitantes, concentrando 185.229 em sua área urbana.

Quanto à caracterização geológica das reservas de águas subterrâneas referentes à área da pesquisa, o mapeamento geológico do estado de São Paulo executado pelo Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo-IPT<sup>8</sup> localiza a Região de Presidente Prudente em domínios da Formação Adamantina, do Grupo Bauru, Cretáceo Superior da Bacia Sedimentar do Paraná. Conformem descrevem Almeida e Melo<sup>1</sup>, esta unidade estratigráfica é caracterizada litologicamente pela ocorrência de bancos de arenito de granulação fina a muito fina, de cor róseo a castanho, com espessuras variáveis entre 2 e 20 m e alternados com lamitos, siltitos e arenitos lamíticos, de cor castanho avermelhado a cinza castanho. Na área da pesquisa, abaixo da Formação Adamantina, está localizada a Formação Santo Anastácio, também do Grupo Bauru, constituída principalmente de arenitos de cor vermelha, marrom avermelhada ou arroxeadada, de granulação fina a média, com seleção de regular a ruim em geral, com grãos arredondados a sub-arredondados e cobertos por película limonítica e presença freqüente de nódulos carbonáticos ou cavidades preenchidas por carbonato de cálcio.

No tocante à avaliação da qualidade das águas subterrâneas referentes à área pesquisada, as informações que fundamentaram a pesquisa resumida neste artigo foram obtidas através de laudos de análise físico-químicas, reunidos no arquivo do Instituto Adolfo Lutz – Laboratório I/ Presidente Prudente.

### Métodos

Foram considerados como representativos, com base no critério de atualidade das coletas, os laudos referentes a 134 poços, datados principalmente dos anos de 2002 e 2003. Uma vez



Figura 1. Localização da cidade de Presidente Prudente.

identificados os pontos de coleta em folhas topográficas em escala 1:10.000, procedeu-se à determinação, nas próprias plantas, de sua localização de acordo como o sistema de coordenadas UTM.

Com base nos resultados fornecidos pelos laudos de análise e na localização por coordenadas dos respectivos pontos de coleta de água, foram traçadas cartas de isolinhas referentes a diversos parâmetros de análise, aplicando-se para esta finalidade o programa de geoestatística *SURFER – Surface Mapping System – Versão 6.01 – 1995*, da *Golden Software Inc*, em associação com o método de interpolação da *Krigagem Linear*. No presente artigo, são selecionadas as representações correspondentes aos conteúdos de nitrato, expressos como nitrogênio nítrico (Figura 3) e de cloretos (Figura 4).

Além das cartas de isolinhas, foram confeccionadas cartas temáticas referentes à ocupação urbana e a possíveis fontes de contaminação. Uma destas representações (Figura 2) assinala os pontos onde o teor de N nítrico ultrapassou o valor de 10 mg/L e mapeia, de acordo com documentos dos arquivos da Prefeitura Municipal, as áreas urbanizadas em junho de 1962 e em junho de 2004 em Presidente Prudente. Outra carta (Figura 5) tem como tema a expansão da rede coletora de esgoto na cidade e uma quarta carta (Figura 6) representa a localização de algumas possíveis cargas contaminantes. Esta última representação inclui a localização de lixões soterrados, entulhos diversos, resíduos de antigas serrarias, cemitérios e áreas onde foram usadas fossas por um período superior a 10 anos.

Paralelamente a essa investigação relacionada ao fenômeno da contaminação, foram obtidas informações referentes à aplicação prática na cidade de técnicas destinadas à redução do teor de nitrato nas águas captadas.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A pesquisa constata o comprometimento da potabilidade em 38 dos 134 poços selecionados, sendo detectados neles um teor acima de 10 mg/L, que é o valor máximo permitido no Brasil, de acordo com a Portaria do Ministério da Saúde Nº 518 de 25 de Março de 2004<sup>3</sup>. Este número de 38 poços representa uma proporção de 28,36%, o que caracteriza uma situação preocupante quanto à qualidade da água captada. Estes poços contaminados, com exceção de apenas uma unidade, estão localizados dentro da área já efetivamente ocupada com a urbanização em 1962 (Figura 4).

A distribuição de teor de N nítrico, representada em isolinhas (Figura 3), diferencia uma zona caracterizada por valores relativamente altos, cujo contorno é alongado na direção 19º NE-SW, concordante com a orientação de duas artérias principais da malha urbana da cidade. O limite externo desta zona, formado por isolinhas de 5 mg/L, delimita uma área de 16,61 km<sup>2</sup>, que circunda uma outra área, com 8,27 km<sup>2</sup> de extensão, correspondente aos valores maiores que 10 mg/L, podendo ser observado que o alongamento das duas áreas segue de modo geral esta mesma direção acima referida.

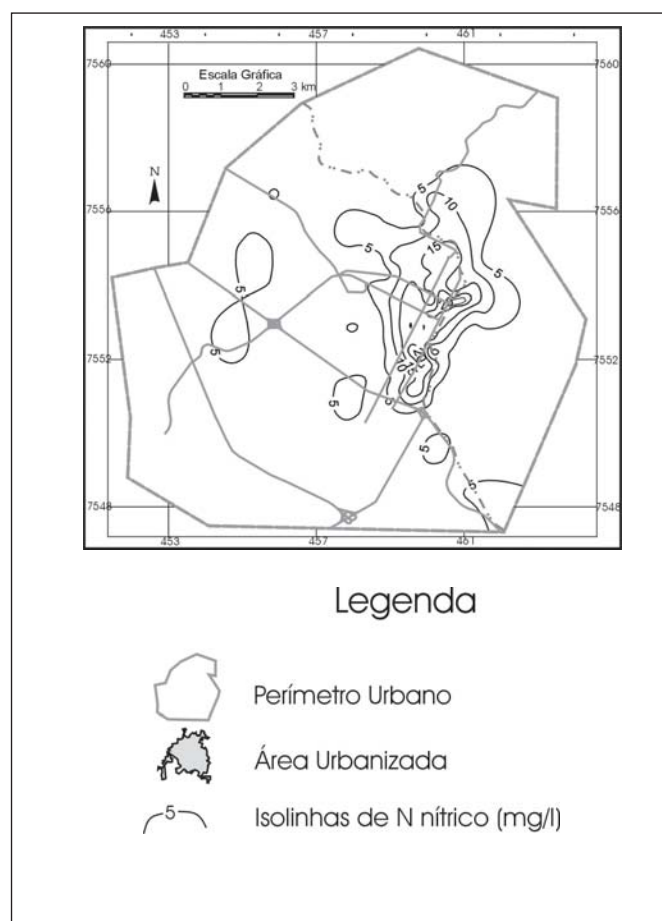
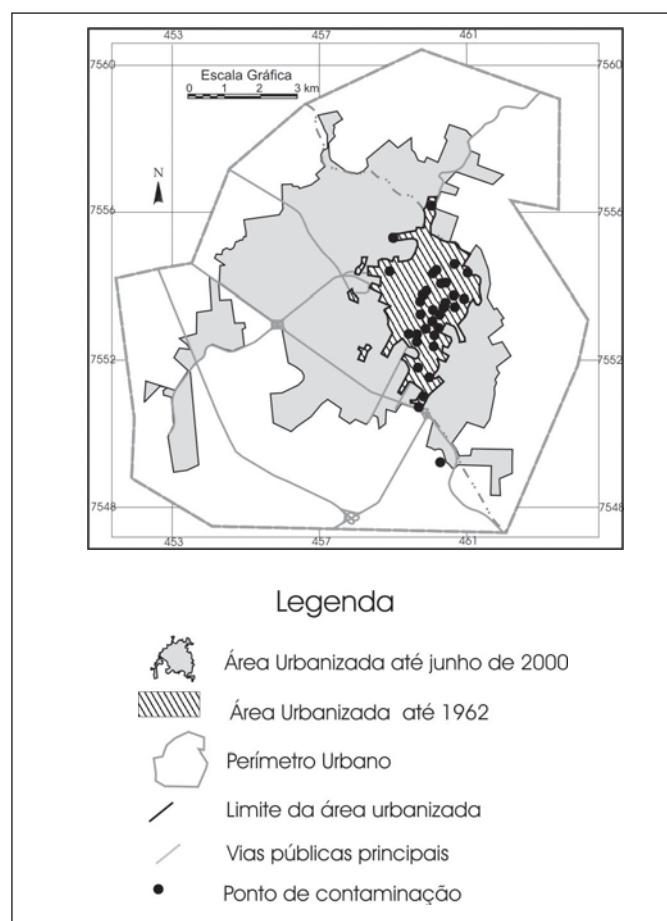


Figura 2. Locais com contaminação e área urbanizada até 1962

Figura 3. Isolinhas para o teor de N nítrico (mg/L)

A comparação entre a localização da área de contaminação identificada nas Figuras 2, com o mapa referente à evolução da implantação da infraestrutura de esgoto na cidade (Figura 5) tende a reforçar a hipótese de contaminação por vazamento da rede de esgoto instalada antes de 1968. É observada também, na comparação entre as figuras 3 e 4 uma correspondência da zona onde se concentram os valores superiores a 10 mg/L do teor de N nítrico e os valores mais elevados de teor de  $Cl^-$ , constituindo este fato mais um argumento em favor desta interpretação. No entanto, na área delimitada pela isolinha de 5 mg/L ou em suas redondezas, outras virtuais cargas contaminantes são reconhecidas, distinguindo-se lixões enterrados, entulhos, locais de fossas, resíduos de indústria madeireira e cemitérios.

Independentemente de qualquer interpretação sobre a fonte da contaminação, importa a verificação da impossibilidade de sua remediação. Na zona definida de 8,27 km<sup>2</sup> ou 8.270.000 m<sup>2</sup> imprópria à captação de águas subterrâneas, é reconhecido um padrão de contaminação com ampla distribuição em área, sendo impraticável a localização das cargas contaminantes de

forma adequada à sua neutralização. Deste modo, não se vislumbra a possibilidade de reduzir o teor de nitrato no próprio aquífero. Na área delimitada pela isolinha de 5 mg/L, de 16.610.000 m<sup>2</sup>, não se pode descartar a possibilidade do futuro aumento do grau de contaminação, considerando-se o fator de envelhecimento dos condutos da rede coletora de esgoto.

Para se entender o significado desta ocorrência de excesso de nitrato constatada na pesquisa, deve ser ressaltado que as duas áreas, principalmente a mais interna, concentram atividades comerciais, industriais, hoteleiras e hospitalares de importância vital para a cidade.

O alastramento da contaminação é favorecido por um fator de construção inadequada ou imprudente de poços tubulares, cuja presença não é rara em Presidente Prudente. Uma das características da Formação Adamantina é a existência dentro dela de aquíferos suspensos. Poços não revestidos ou dotados de revestimento de aço já corroído e poços abandonados para o fim de retomada de perfuração constituem atalhos efetivos para a passagem da água impurificada destes aquíferos e do aquífero freático para as zonas inferiores,

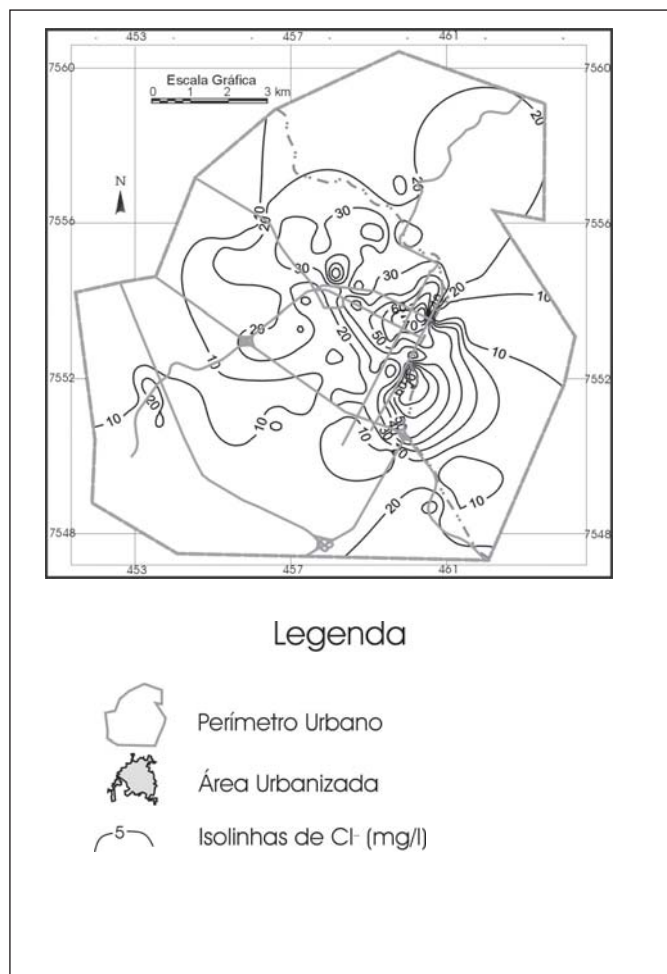


Figura 4. Isolinhas para o teor de  $Cl^-$  (mg/L)

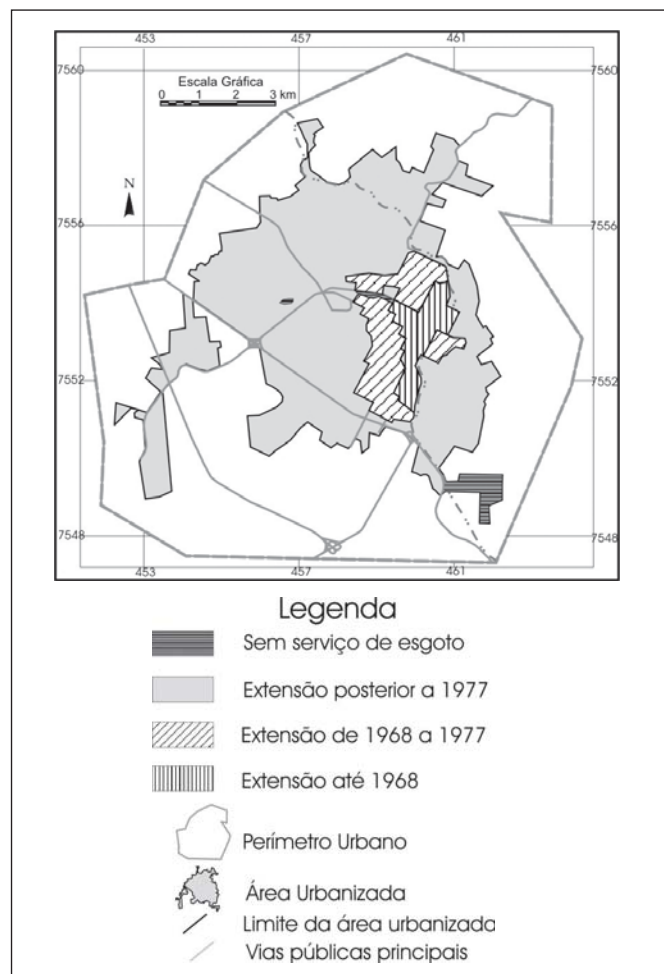


Figura 5. Evolução da implantação da rede de esgoto

correspondentes ao aquífero semi-confinado Santo Anastácio, que, além de oferecer maiores vazões do que o aquífero Adamantina sobreposto a ele, é naturalmente mais protegido contra a contaminação do que este último. Não é raro também, em poços totalmente revestidos, a instalação de filtros nos níveis dos aquíferos suspensos, deste modo havendo condições também para a mistura de água através do próprio poço.

Quanto ao tratamento para redução do teor de nitrato, pelas informações colhidas junto a empresas prestadoras deste serviço, é aplicado o método do filtro de resina, pelo qual se processa a troca do íon  $NO_3^-$  pelo íon  $Cl^-$ . A restauração do filtro é efetuada com uma operação de lavagem, seguida da reposição de solução concentrada em 10% de NaCl em água. A instalação do filtro é renovada a cada período de cinco anos. Abaixo estão resumidas as condições de funcionamento e o preço de instalação de filtro, conforme os termos de orçamento elaborado em junho de 2004, para dois casos de solicitação do serviço, de acordo com a informação da firma Sanebrás Ltda.,

de Presidente Prudente:

1) Teor de  $NO_3^-$  de 40 mg/L em captação de 96  $m^3$ /dia, com uso de 900L de resina e regeneração da resina de 4 em 4 dias: R\$20.495,00 ou US\$6,445.00 (cotação de junho de 2004);

2) Teor de  $NO_3^-$  de 80 mg/L em captação de 144  $m^3$ /dia, com uso de 1150 L de resina e regeneração da resina de 4 em 4 dias: R\$61.488,48 ou US\$19,336.00 (cotação de junho de 2004).

Quanto à aplicação prática do processo, na Tabela 1 estão relacionados alguns exemplos referentes a instalações em funcionamento em Presidente Prudente-SP.

Os dados da Tabela 1 apresentam a obtenção de resultados satisfatórios com a aplicação do sistema, não se podendo contestar a sua eficiência. Entretanto, deve ser salientado que, no caso da captação de 144  $m^3$ /dia, o investimento para a instalação do sistema ultrapassa aquele referente a um poço, inteiramente revestido, que possibilita esta vazão diária. Considerando-se os fatores hidrogeológicos e os preços cobrados pelas empresas perfuradoras que atuam

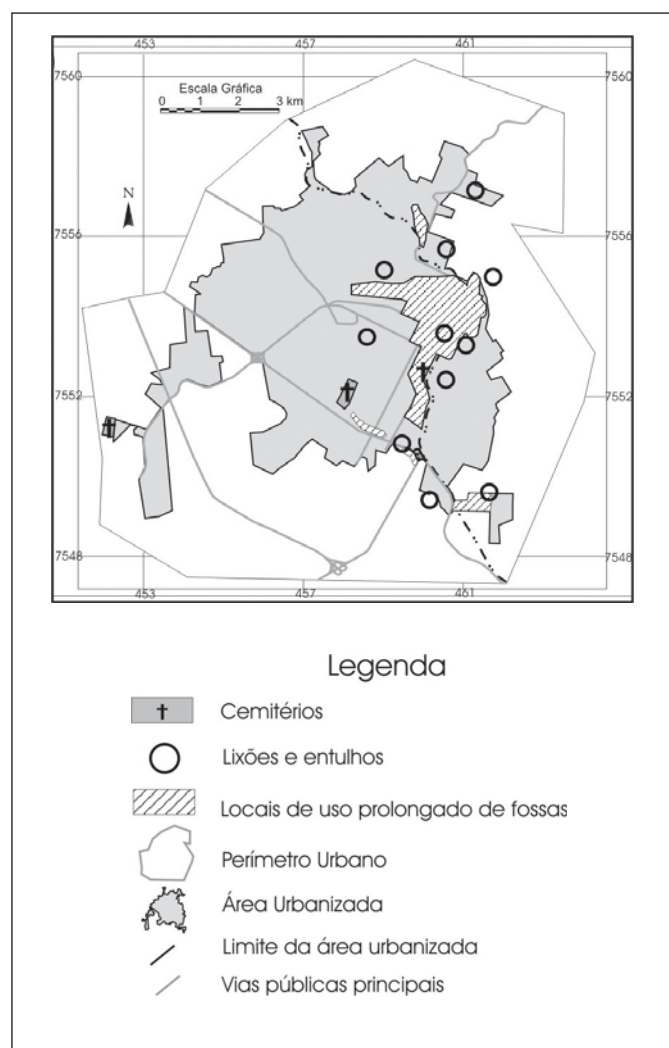


Figura 6. Localização de possíveis fontes de contaminação por  $\text{NO}_3^-$

em Presidente Prudente, em junho 2004 o investimento calculado para um poço capaz de atender a esta demanda variava entre R\$30.000,00 e R\$40.000,00.

## CONCLUSÕES

A contaminação por nitrato nas águas subterrâneas em Presidente Prudente é um dano ambiental significativo, devido à localização bem definida de uma zona imprópria para a captação de recursos hídricos subterrâneos e à importância assumida por estes recursos nesta cidade. A área não recomendável para captação, que mede 8.270.000 m<sup>2</sup>, é identificada como zona de localização preferencial de atividades comerciais, industriais, hoteleiras e hospitalares de importância capital para a cidade.

Uma área de 16.610.000 m<sup>2</sup>, circundante desta área mais problemática, assim como outras pequenas áreas, delimitadas pela isolinha correspondente ao teor de 5 mg/L de N nítrico, devem ser consideradas como zonas de risco para a exploração de águas subterrâneas.

As providências para enfrentamento do problema estão restritas por enquanto à iniciativa própria de cada um dos exploradores das águas subterrâneas, consistindo no uso, reconhecidamente dispendioso, de sistemas redutores do teor de nitrato. Como se pode depreender de propostas de fornecedores deste equipamento, em determinados casos a sua aquisição e instalação exigem investimento superior ao da própria construção do poço ao qual ele deve estar associado. Este fato deve ser enquadrado dentro de uma questão crescentemente importante na problemática da deterioração dos recursos naturais, que é a do custo exigido para a reparação dos danos causados pelo ser humano na sua relação com o meio ambiente.

## AGRADECIMENTOS

Ao Instituto Adolfo Lutz, Laboratório I de Presidente Prudente, na pessoa da Diretora Técnica do Serviço de Saúde, a Sra. Mariza Menezes Romão, pela valiosa colaboração prestada através da permissão de acesso dos pesquisadores aos seus arquivos.

À firma *Sanebrás Ltda.* de Presidente Prudente-SP, na pessoa do Prof. Sérgio Freitas, pelas informações referentes à aplicação do equipamento de resina de troca iônica.

## REFERÊNCIAS

- Almeida, F.F.M.; Melo, M.S. A Bacia do Paraná e o vulcanismo mesozóico. In: Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo – IPT. *Mapa Geológico do Estado de São Paulo*, São Paulo, IPT, v.1, p.46-81, 1981.
- Brasil – Ministério do Planejamento e Gestão – Fundação IBGE – *Censo/População/Municípios* Disponível em <www.ibge.gov.br>, Acesso em 08/06/2004.

Tabela 1. Alguns resultados da aplicação do método da resina de troca iônica

| Poço | Teor de N nítrico (mg/L) |                   |
|------|--------------------------|-------------------|
|      | Antes do tratamento      | Após o tratamento |
| 1    | 22,00                    | 4,50              |
| 2    | 20,00                    | 3,95              |
| 3    | 21,20                    | 1,90              |
| 4    | 15,00                    | 1,67              |
| 5    | 20,50                    | 0,15              |
| 6    | 28,20                    | 1,20              |
| 7    | 14,25                    | 4,55              |
| 8    | 19,00                    | 3,22              |

3. Brasil – Ministério da Saúde - Portaria Nº. 518 de 25 de Março de 2004, Brasília (**Diário Oficial da União**) de 26/03/2004.
4. Castro, S.C. et al Contaminação por água subterrânea em São José do Rio Preto (SP): Contaminação por nitratos, in: **VII Congresso Brasileiro de Águas Subterrâneas, Belo Horizonte**, ABAS, Belo Horizonte, 103-107, 1992.
5. CETESB. **Relatório de Qualidade das Águas Subterrâneas no Estado de São Paulo 1998-2000**, São Paulo: CETESB, 2001, 96p.+anexos
6. Godoy, M.C.T.F. **Estudo Hidrogeológico das Zonas Não Saturada e Saturada da Formação Adamantina em Presidente Prudente, Estado de São Paulo**, São Paulo, 1999 {Tese de Doutorado no Instituto de Geociências, Universidade de São Paulo}
7. Gregg, J.C. **Ion-Exchange System to Treat High-Nitrate Well Water**, Public Works, 103(9), p. 81, 1972.
8. IPT - Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo **Mapa Geológico do Estado de São Paulo**. São Paulo, IPT. (Escala 1:500.000), 1981
9. Lerner,D. et al **Loading of non-agricultural nitrogen in urban groundwater**, IAHS-AISH Publication. 259; 117-123. 1999.
10. Magette, W.L.; Pacheco, P.A.; Whearton, F.W. **Ion exchange treatment of subsurface drainage water**, Agricultural Water Management, Amsterdam, Elsevier Publishers, BV., 18: 121-133, 1990
11. Nixon, N. **English water utility tackles nitrate removal**, Water Engineering and Management, UK, 139: 27-28, 1992
12. Sheinker, M.; Codoluto, J.P. **Making water supply nitrate removal practicable**, Public Works,108 (6): 71-73, 1977.
13. Wenly, G.; Wensheng, H.; Höll, W.H. **Combined nitrate and hardness elimination from drinking water by the CARIX process**, J Water SRT- Aqua, 43(2):95-101,1994
14. Whitehead, E.; Hiscock, K.; Dennis, P. **Evidence for sewage contamination of the Sherwood Sandstone aquifer beneath Liverpool, UK**, IAHS-AISH Publication. 259:179-185. 1999.
15. Zilberbrand, M.; Rosenthal, E.; Shachnai, E. **Impact of urbanization on hydrochemical evolution of groundwater and on unsaturated-zone gas composition in the coastal city of Tel Aviv, Israel**. Journal of Contaminant Hydrology. 50(3-4):175-208, 2001.



# Qualidade microbiológica da água utilizada nas barracas de praia da orla de Salvador-BA

## Quality of water used in the beach huts of Salvador-Bahia seashore microbiological aspects

RIALA6/999

Carine de Sousa ANDRADE<sup>1</sup>; Clícia Capibaribe LEITE<sup>2</sup>; Matilde Dantas da SILVA<sup>3</sup>; Patrícia Nascimento de ASSIS<sup>3</sup>; Aláíse Gil GUIMARÃES<sup>2\*</sup>

\* Endereço para correspondência: <sup>2</sup> Universidade Federal da Bahia. Faculdade de Farmácia. Rua Barão de Jeremoabo s/n, Campus de Ondina, Salvador – BA. CEP: 40170-290.

e- mail: alaise@ufba.br

<sup>1</sup> Iniciação Científica PIBIC/CNPq. Escola de Nutrição – Universidade Federal da Bahia.

<sup>3</sup> Laboratório de Microbiologia de Alimentos. Faculdade de Farmácia. Universidade Federal da Bahia.

### RESUMO

A água, importante fonte de abastecimento para o consumo humano, pode atuar como importante veículo na transmissão de doenças quando se apresenta contaminada. O objetivo do estudo foi avaliar a qualidade microbiológica da água tratada e não tratada utilizada nas barracas de praia da orla de Salvador – Bahia, visto a elevada frequência de turistas e da população local. Foram analisadas 100 amostras, sendo 63 de água tratada e 37 de não tratada, com base na determinação de coliformes totais e termotolerantes, segundo a técnica dos Tubos Múltiplos – NMP (APHA). A identificação de *Escherichia coli* deu-se por meio do teste IMVIC. Os resultados revelaram que entre as amostras de água tratada, 41,27% apresentaram-se positivas para coliformes totais e 31,75% para coliformes termotolerantes. Das amostras de água não tratada, 86,49% estavam contaminadas por coliformes totais e termotolerantes e em 13,00% do total de amostras foi confirmada a presença de *Escherichia coli*. Os dados obtidos indicam que a água utilizada nas barracas de praia, amostrada neste estudo, pode funcionar como veículo de transmissão de doenças para a população que a utiliza.

**Palavras-Chave.** qualidade bacteriológica da água; bactérias do grupo coliforme; *Escherichia coli*; barracas de praia de Salvador-BA

### ABSTRACT

The water as a foremost source of supply for the human consumption, can also play a role as an important vehicle for disease transmission, when it is contaminated. The objective of the present investigation was to evaluate the quality, particularly the microbiological aspects, of treated and not treated water used in the beach huts lodged along the Salvador seashore. The beaches are constantly frequented by visitors and tourists, and even by local population, therefore the use of contaminated water could represent a risk to their health. A total of 100 samples, being 63 of treated water and 37 of untreated water, were analyzed determining the total and fecal coliforms by means of the Most Probable Number technique – MPN, and the identification of *Escherichia coli* was carried out using IMVIC test. The results showed that among the treated water samples 41.27% was positive for total coliforms and 31.75% for fecal coliforms. Among the untreated water samples 86.49% were contaminated by both total and fecal coliforms, and in 13% of total analyzed samples the presence of *E.coli* was confirmed. According to the data observed from the microbiological analysis of the water samples collected in the beach huts these samples can be a vehicle for waterborne disease transmission for the people who sojourn that seashore.

**Key Words.** fecal coliform, *E.coli*, water quality

## INTRODUÇÃO

A água é um recurso natural imprescindível às diversas atividades do homem e indispensável à sua sobrevivência, provindo de mananciais de superfície ou subterrâneo. Esses últimos representam cerca de 29,9% da água doce do planeta, caracterizando uma importante fonte suplementar ao abastecimento público<sup>12,13</sup>.

A água subterrânea é considerada, mundialmente, uma importante fonte de consumo, principalmente às populações que não têm acesso à rede pública de abastecimento ou àquelas com acesso, mas com frequência irregular<sup>8</sup>.

O comportamento indevido do homem na natureza pode causar alterações no sistema natural e conseqüentemente poluir os recursos hídricos<sup>12</sup>. A poluição dos lençóis freáticos, rios e lagos ocorre por precipitação de poluentes atmosféricos, por escoamento superficial carreando excrementos de animais, fertilizantes e pesticidas, por infiltração e percolação de águas originadas de efluentes, de fossa séptica, de lagoas de estabilização e de aterros sanitários<sup>13</sup>.

A água poluída pode atuar como um importante veículo na transmissão de inúmeras doenças, seja em decorrência de excretas humanas ou de outros animais, ou pela presença de substâncias químicas nocivas à saúde da população<sup>5</sup>. Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), 80% das doenças que ocorrem nos países em desenvolvimento são ocasionadas pela contaminação da água. Sabe-se que a cada ano, 15 milhões de crianças de 0 a 5 anos morrem direta ou indiretamente pela falta ou deficiência dos sistemas de abastecimento de água e esgotos. Por isso, a avaliação da qualidade microbiológica da água é de fundamental importância à saúde pública<sup>9</sup>.

O monitoramento da qualidade microbiológica da água destinada ao consumo humano por meio da pesquisa de agentes contaminantes, principalmente os microrganismos de origem entérica, representa a possibilidade da diminuição de inúmeros surtos de doenças como cólera, febre tifóide e paratífóide, diarreias infecciosas, enterites gastrointestinais, hepatite infecciosa e da disseminação de helmintos, vírus e protozoários como *Giardia lamblia* e *Entamoeba histolytica*<sup>9</sup>.

Em relação às características microbiológicas, uma água de abastecimento público só é considerada potável quando resulta em ausência de coliformes totais em 100 mL de amostra, de acordo com a Portaria nº 518 do Ministério da Saúde<sup>4</sup>. O grupo dos coliformes abrange um grande número de espécies de enterobactérias incluídas nos gêneros *Escherichia*, *Klebsiella*, *Citrobacter* e *Enterobacter*. Os microrganismos deste grupo atuam principalmente como indicadores de poluição fecal, ocorrendo na microbiota intestinal do homem e de animais de sangue quente, além de alguns gêneros habitarem também outros ambientes como vegetais e o solo<sup>9,12</sup>.

Os microrganismos de origem unicamente fecal, não se multiplicam facilmente no ambiente externo, porém são capazes de sobreviver de modo semelhante às bactérias patogênicas. A

sua presença na água pode caracterizar uma contaminação recente e muitas vezes constante, uma vez que essas bactérias não sobrevivem por muito tempo fora do seu habitat natural<sup>9</sup>.

A principal representante do grupo dos coliformes fecais, atualmente chamado de coliformes termotolerantes a 45°C, é a *Escherichia coli* e vem sendo utilizada como indicador de contaminação fecal desde 1892<sup>12</sup>. A sua presença na água sugere contaminação por material de origem fecal e a possível existência de microrganismos patogênicos.

Nas praias da orla de Salvador-BA, muitas barracas, devido ao fornecimento irregular de água pelo sistema de abastecimento público, optaram pela utilização da água de poço como forma alternativa, e o efeito da mistura da água de poço e de fontes superficiais pode influenciar a qualidade da água na rede. A irregularidade do abastecimento, a ocorrência de vazamentos e o contato da rede com o esgoto modificam a água tratada com a introdução de agentes patogênicos na rede de distribuição.

Diante do exposto o objetivo deste estudo foi avaliar a qualidade microbiológica da água tratada e não tratada utilizada nas barracas das praias da orla de Salvador – Bahia, uma vez que essas barracas são freqüentadas por turistas e por grande parte da população local.

## MATERIAL E MÉTODOS

Verificou-se junto a Secretaria Municipal de Serviços Públicos, o número total de 691 barracas cadastradas existentes na cidade e a localização por praia. O estudo foi realizado em 100 barracas de praia da orla de Salvador – BA, situadas em praias mais freqüentadas e no período de outubro de 2002 a junho de 2003 selecionadas aleatoriamente entre as cadastradas.

Um questionário foi elaborado e aplicado aos proprietários com o objetivo de conhecer a procedência da água utilizada nas barracas amostradas.

As amostras foram coletadas assepticamente em frascos estéreis, acondicionadas em caixas isotérmicas e transportadas para análise imediata no Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Farmácia – UFBA. De acordo com a Portaria nº 1469 do Ministério da Saúde<sup>3</sup>, vigente no período, a água de abastecimento público é considerada bacteriológicamente potável quando apresenta ausência de coliformes totais em 100 mL de amostra.

Foram coletadas 100 amostras de água, sendo 63 provenientes de água tratada da rede de abastecimento público e 37 de não tratada proveniente de poços artesianos particulares. Para as amostras de água tratada foram adicionados previamente a esterilização dos frascos, 0,1 mL de tiosulfato de sódio a 0,1%.

Para determinação de coliformes totais e termotolerantes a 45°C, utilizou-se a técnica dos Tubos Múltiplos - Número Mais Provável (NMP), (recomendada pelo Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater), que é baseada

na fermentação da lactose com produção de ácido e gás. Para a realização da prova presuntiva de coliformes totais empregou-se Caldo Lauril Sulfato Triptose em concentração dupla com incubação a 35°C por 48 horas. A partir dos tubos positivos, com produção de gás, foram realizadas inoculações em Caldo Verde Brilhante Bile (BVB) para a confirmação de coliformes totais, com incubação a 35°C por 48 horas, e em Caldo EC para determinação da prova confirmatória de coliformes termotolerantes, com incubação a 44,5°C por 24 horas<sup>14</sup>. A estimativa do número de coliformes por 100mL de água, foi obtida pela distribuição de tubos positivos e negativos, utilizando-se a tabela do Número Mais Provável com série de 10 tubos<sup>1</sup>.

Para a pesquisa de *Escherichia coli* foi retirada uma alçada de cada tubo de Caldo EC positivo (com produção de gás), e inoculada em placas contendo Ágar Eosina Azul de Metileno (EMB), incubadas a 35°C por 24 horas. As colônias típicas foram isoladas e identificadas pelas provas bioquímicas de Indol, Vermelho de Metila, Voges-Proskauer e Citrato de Simmons (teste do IMVIC)<sup>14</sup>.

## RESULTADOS

Os resultados obtidos encontram-se nas Figuras 1 e 2 e na Tabela 1. De acordo com a Figura 1, observou-se que 41,27% das amostras (26 barracas) de água tratada apresentaram número de coliformes totais acima dos estabelecido pela legislação e 86,49% (32 barracas) das águas não tratadas revelaram contaminação por coliformes totais e termotolerantes.

No que se refere à frequência de coliformes totais, coliformes termotolerantes (45°C) e *Escherichia coli* no conjunto amostras de água tratada e não tratada (Tabela 1), verificou-se que 58,0%, de um total de 100 amostras, foram positivas para coliformes totais e 52,0% para coliformes termotolerantes. Quanto às amostras de água tratada, provenientes de reservatórios, 58,4% mostraram-se

contaminadas por coliformes totais e 44,5% por termotolerantes. Para as águas não tratadas provenientes de reservatório e de torneira de poços foram observados que 95,2% e 75,0% delas estavam fora dos limites estabelecidos pela legislação, respectivamente.

Foram também encontrados resultados positivos para *Escherichia coli* em 13,0% do total de amostras analisadas (Tabela 1). Observou-se que amostras de águas não tratadas provenientes de reservatórios apresentaram o maior índice de contaminação por *E. coli* (33,3%).

Analisando os resultados de NMP/100mL (Figura 2), verificou-se que houve predominância de resultados em NMP/100mL nas faixas <1,1 e >23,0. Na faixa de <1,1/100mL estão situadas as amostras cuja presença de coliformes não foi detectada pelo método utilizado. Os resultados amostras de água contaminadas apresentaram-se mais frequentes valor de >23,0 NMP/100mL tanto para coliformes totais quanto para termotolerantes.

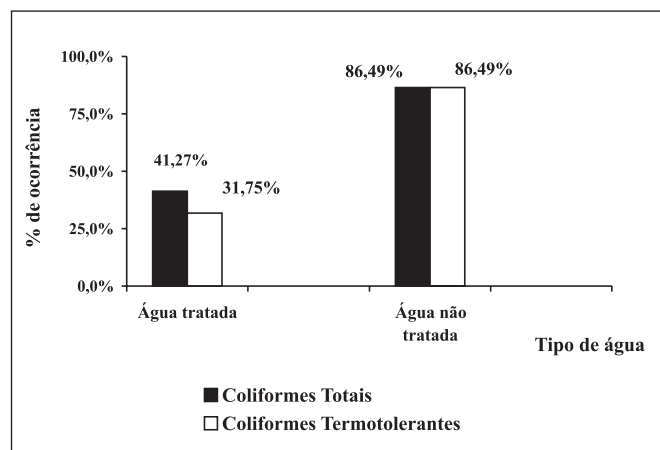
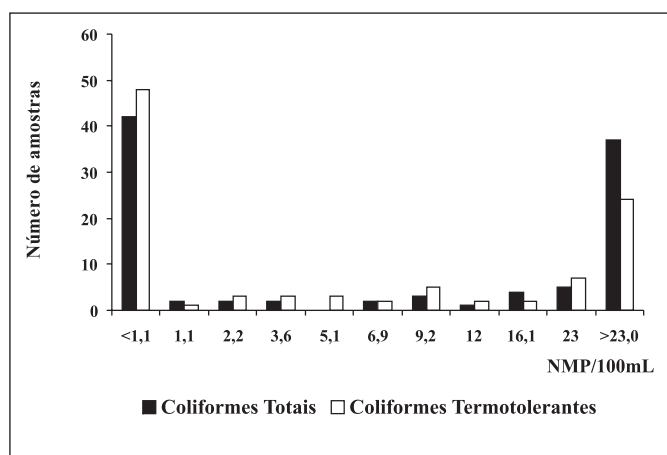


Figura 1. Número percentual de ocorrência de Coliformes Totais e Coliformes Termotolerantes em amostras de água tratada e não tratada

Tabela 1. Frequência de Coliformes Totais, Coliformes Termotolerantes (45°C) e *Escherichia coli* em amostras de água tratada e não tratada, colhidas em 100 barracas de praia de Salvador-BA, 2003.

| Tipos de água/pontos de coleta | Total de amostras n | Coliformes totais n (%) | Agente bacteriano                |                      |
|--------------------------------|---------------------|-------------------------|----------------------------------|----------------------|
|                                |                     |                         | Coliformes termotolerantes n (%) | <i>E. coli</i> n (%) |
| <b>Tratada</b>                 |                     |                         |                                  |                      |
| Reservatório                   | 36                  | 21 (58,4)               | 16 (44,5)                        | 02 (5,6)             |
| Torneira                       | 27                  | 05 (18,5)               | 04 (14,8)                        | 00                   |
| <b>Não tratada</b>             |                     |                         |                                  |                      |
| Reservatório                   | 21                  | 20 (95,2)               | 20 (95,2)                        | 07 (33,3)            |
| Torneira                       | 16                  | 12 (75,0)               | 12 (75,0)                        | 04 (25,0)            |
| <b>Total</b>                   | <b>100</b>          | <b>58 (58,00)</b>       | <b>52 (52,0)</b>                 | <b>13 (13,0)</b>     |



**Figura 2.** Distribuição da frequência de resultados de NMP/100mL para coliformes totais e coliformes termotolerantes no total das amostras analisadas.

## DISCUSSÃO

Levando-se em consideração os índices estabelecidos pela legislação vigente, constatou-se que 41,27% das amostras de água tratada estavam impróprias para o consumo humano. Esta situação mostrou-se agravada no que se refere à água não tratada, uma vez que esta apresentou uma elevada contaminação por coliformes totais e termotolerantes, indicando o possível contato de material fecal e a eventual presença de bactérias enteropatogênicas.

A elevada contaminação das águas tratadas provenientes de reservatórios sugerem um tratamento insuficiente ou possivelmente a ocorrência de infiltrações nas tubulações, cloração inadequada ou ainda falta de higienização dos reservatórios. As águas não tratadas revelam uma alta presença de coliformes totais e termotolerantes, com números mais elevados naquelas oriundas de reservatório, indicando que estes podem ser provenientes tanto da própria água do poço como dos próprios reservatórios. A predominância do número de amostras com valores de NMP >23,0 /100mL sugerem alto índice de contaminação dessas águas.

Nogueira et al<sup>11</sup>, estudando a qualidade microbiológica da água potável de comunidades urbanas e rurais de Maringá-PR, encontraram em águas não tratadas um percentual de contaminação de 46% para coliformes totais e 15% para coliformes termotolerantes, e em águas tratadas revelaram contaminação de 17% e 8% para coliformes totais e termotolerantes, respectivamente. Em estudo realizado por Freitas et al<sup>8</sup>, em duas regiões do Estado do Rio de Janeiro, foi observado que 55% das amostras de águas provenientes de poços artesianos apresentavam coliformes termotolerantes e para as amostras de água distribuídas pela rede de abastecimento público constatou-se que 6,6% estavam fora dos padrões. Os resultados encontrados por esses autores e os revelados neste estudo, indicam que a água não tratada apresenta alto índice de contaminação, tanto para coliformes totais como para termotolerantes.

Giombelli et al<sup>9</sup>, apontaram que 94,05% das amostras de água de poços e fontes consumidas pela população de dois municípios na região do Alto Uruguai Catarinense estavam contaminadas por coliformes totais e 90,50% por coliformes termotolerantes. Esses valores são próximos aos encontrados no presente estudo, indicando elevada contaminação em águas não tratadas.

O comprometimento da qualidade da água de consumo pode estar relacionado à intermitência no seu fornecimento, com as condições da rede de esgoto e das instalações hidráulicas da rede de distribuição de água<sup>2</sup>.

Em estudo realizado sobre a qualidade microbiológica da água de três poços artesianos na cidade de São José do Rio Preto-SP<sup>10</sup>, apenas 2,8% das amostras confirmaram a presença de *Escherichia coli*. De acordo com Egwari e Aboaba<sup>7</sup>, a freqüente presença de *E. coli* em fontes de água, justifica seu uso como um indicador biológico da contaminação da água, mesmo quando outros patógenos não foram isolados.

A contaminação da água pode ocorrer no próprio estabelecimento por falta de manutenção do reservatório, pela sua localização, pela ausência de cuidados com o manuseio e higiene e pela falta de informação dos proprietários quanto à necessidade de utilizar água tratada sem outras misturas (poço ou mananciais), uma vez que estas podem introduzir agentes patogênicos à água. Isso também foi observado por d'Aguila et al.<sup>6</sup>, em estudo realizado no município de Nova Iguaçu, que afirmaram que a falta de manutenção e limpeza dos reservatórios contribuíram para a contaminação da água utilizada.

Os níveis de contaminação verificados neste estudo podem estar associados às deficiências do sistema distribuidor, levando os proprietários das barracas que não possuem acesso à rede a armazenarem água e buscarem fontes alternativas de abastecimento nem sempre potáveis.

## CONCLUSÕES

Mediante os resultados obtidos conclui-se que as amostras de águas tratadas e não tratadas analisadas neste estudo possuíam elevada contaminação por bactérias do grupo coliforme estando, portanto, impróprias para o consumo humano. A presença de *Escherichia coli* nas amostras de água sugere contaminação por material de origem fecal e a possível existência de microrganismos patogênicos, expondo a população consumidora a diversos riscos à saúde.

Esses riscos poderiam ser minimizados se houvesse regularidade no abastecimento de água potável para as barracas de praia e se a manutenção do sistema de distribuição fosse melhorada, visto que foi observado que a maior quantidade de amostras de água fora dos padrões eram provenientes de reservatório. Por isso, faz-se necessário exigir do poder público medidas para a ampliação, implantação e manutenção do sistema de abastecimento de água, fornecer informações aos proprietários das barracas de praia sobre a importância de uma

adequada higienização e manutenção dos reservatórios e sugerir a implantação de boas práticas de produção tendo como objetivo a qualidade do produto oferecido e garantia da saúde da população.

### AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pelo financiamento da Bolsa de Iniciação Científica e a equipe do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Farmácia – UFBA.

### REFERÊNCIAS

1. American Public Health of Water and Wastewater. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 20ª Edição. Washington: American Public Health Association, 1998. 1220p.
2. Borja, P.C.; Moraes, L.R.S. **Indicadores de saúde ambiental com enfoque para a área de saneamento. Parte 2 – Estudo de caso**. [http://www.ansp.fiocruz.br/documentos/funasa/monografia/indicadores\_ambientais\_para\_saneamento\_I.pdf]. 04 setembro 2003.
3. BRASIL. Portaria 1469 – **Ministério da Saúde, 29 de dezembro de 2000**. [http://www.anvisa.gov.br/base/visadoc/port/port[2699-1-0].htm] 18 agosto 2003.
4. BRASIL. Portaria 518 - **Ministério da Saúde, 25 de março de 2004**.:[ http://www.crq4.org.br/downloads/portaria518\_04.pdf] 16 setembro 2004.
5. Cavalcante, C.E.M.H.; Silva, V.L.; Salgueiro, A.A. Avaliação microbiológica da água do Riacho Cavouco, Recife-PE. **Hig. Aliment.**, 12: 45-9, 1998.
6. D'aguila, P.S. et al. Avaliação da qualidade de água para abastecimento público do Município de Nova Iguaçu. **Cad. Saúde Pública**, 16: 791-8, 2000.
7. Egwari, L.; Aboaba, O.O. Environmental impact on the bacteriological quality of domestic water supplies in Lagos, Nigeria. **Rev. Saúde Pública**, 36: 513-20, 2002.
8. Freitas, M.B.; Brilhante, O.M.; Almeida, L.M. Importância da análise de água para a saúde pública em duas regiões do Estado do Rio de Janeiro: enfoque para coliformes fecais, nitrato e alumínio. **Cad. Saúde Pública**, 17: 651-60, 2001.
9. Giombelli, A.; Rech, H.; Torres, V.S. Qualidade microbiológica da água proveniente de poços e fontes de dois municípios da Região do Alto Uruguai Catarinense. **Hig. Aliment.**, 12: 49-51, 1998.
10. Hoffmann, F.L.; Garcia-Cruz, C.H.; Vinturin, T.M. Levantamento das características microbiológicas da água proveniente de três poços artesanais da cidade de São José do Rio Preto-SP. **Hig. Aliment.**, 8: 36-8, nov. 1994.
11. Nogueira, G. et al. Microbiological quality of drinking water of urban and rural communities, Brazil. **Rev. Saúde Pública**, 37: 232-6, 2003.
12. Santos, C.C.M. et al. Qualidade da água de origem subterrânea oferecia à população, na região de São José do Rio Preto (SP), no período de 1991 a 1999. **Hig. Aliment.**, 5: 47-51, 2001.
13. Silva, E.F.; Salgueiro, A. A. Avaliação da qualidade bacteriológica de água de poços na região metropolitana de Recife-PE. **Hig. Aliment.**, 15: 73-8, 2001.
14. Silva, N.; Junqueira, V.C.A.; Silveira, N. F. A. **Manual de métodos e análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Editora Livraria Varela; 1997. 295p.

# Microcistinas em água de hemodiálise de clínicas do estado de São Paulo

## Microcystins in water samples from hemodialysis clinics of São Paulo state/Brazil

RIALA6/1000

Valter RUVIERI\*; Luzia SHUNDO; Janete ALABURDA; Myrma SABINO.

\*Endereço para correspondência: Seção de Química Biológica, Divisão de Bromatologia e Química, Instituto Adolfo Lutz. Av. Dr. Arnaldo, 355 – São Paulo, SP, Brazil. CEP 01246-902  
e-mail: vruvieri@ial.sp.gov.br

### RESUMO

As cianobactérias (algas azuis) são organismos procariontes fotossintéticos originários do pré-cambriano que se adaptaram a vários *habitats*, desde nascentes termais até solos úmidos, sendo que em água doce sob determinadas condições ambientais, tais como alta luminosidade, alta temperatura e alta concentração de nutrientes, poderão surgir abundantemente formando florações (*blooms*). As cianobactérias produzem vários tipos de toxinas, sendo a microcistina (MC) uma das mais relevantes devido a sua toxicidade. Microcistinas são heptapeptídeos compostos por cinco aminoácidos constantes e dois variantes. São conhecidos mais de 60 tipos de microcistinas. Estudos indicam que uma das formas, a MC-LR (leucina, arginina), atua inibindo enzimas intracelulares (fosfatases), causando alteração na estrutura celular e que, doses sub-letais desta hepatotoxina, estão associadas ao desenvolvimento de câncer. O objetivo deste trabalho foi determinar a concentração de microcistinas em 177 amostras de água de hemodiálise coletadas em clínicas de hemodiálise do Estado de São Paulo, no período de abril de 2002 a março de 2003. As análises das 177 amostras de água utilizando ensaio imunoenzimático (ELISA) não detectaram a presença de microcistinas. Embora não tenham sido detectadas microcistinas nas amostras analisadas, é de extrema importância a continuidade do monitoramento desta ficotoxina devido a gravidade das intoxicações humanas causadas pelas cianotoxinas.

**Palavras-Chave.** cianobacterias; microcistinas; água de hemodiálise; ELISA; toxinas.

### ABSTRACT

Cyanobacteria (blue-green algae) are most ancient photosynthetic prokaryotes organisms originated from pre-Cambrian era, which have adapted to several habitats, from thermal springs to humid ground. These organisms appear abundantly in fresh water forming blooms under determined ambient conditions, such as high luminosity, high temperature, and high nutrient concentration. Cyanobacteria produce some types of toxins such as microcystins (MC), which are one of the most important one due to its toxicity. Microcystins are heptapeptides formed by five invariable and two variable amino acids. More than 60 microcystins have been chemically identified. It has known that one of these toxins, the MC-LR (leucine, arginine) induces intracellular enzymes (phosphatases) inhibition, causing alteration in the cell structure. Sub-lethal doses of this hepatotoxin have been associated with malignancy development. The aim of the present study was to determine the concentration of microcystins in water used for hemodialysis procedure. Water samples were collected from hemodialysis clinics located in the State of São Paulo - Brazil from April/2002 to March/2003, by means of routine official visit of the Sanitation Inspection Committee. Microcystins concentrations were determined by means of commercially available enzyme immunoassay [ELISA (Envirologix Inc)]. ELISA kit was tested, and a standard curve with linear regression ( $r > 0.98$ ) was obtained. The recovery rate was 98.6% and the quantification limit was  $0.16\mu\text{g/L}$ . All of 177 analyzed samples were non-reactive. Although all the samples were negative, the continuous monitoring of this cyanotoxin in water samples is extremely important due to its toxicity, and for preventing events like one occurred in Caruaru, PE-Brazil.

**Key Words.** cyanobacteria; microcystins; hemodialysis water; ELISA; toxins.

## INTRODUÇÃO

A diminuição da qualidade da água de reservatórios destinados para abastecimento público, irrigação e recreação é uma preocupação constante em todo o mundo. A poluição decorrente de fontes antropogênicas pode ocasionar sérios riscos à saúde da população. O aumento da eutrofização destes sistemas pelo enriquecimento de nutrientes, principalmente fósforo e nitrogênio, tem favorecido a floração de cianobactérias produtoras de toxinas<sup>5,17</sup>. Essas florações são crescimentos populacionais massivos e descontrolados destes microrganismos em ambientes aquáticos devido às alterações ambientais.

As cianobactérias são microrganismos aeróbicos fotoautótrofos, procariontes bioquimicamente e estruturalmente muito semelhantes às bactérias. Seus processos vitais requerem somente água, dióxido de carbono, substâncias inorgânicas e luz, obtendo energia para seu metabolismo principalmente através da fotossíntese<sup>3</sup>. Podem ser encontradas nos mais diferentes meios, vivem em solos e rochas onde desempenham um importante papel nos processos funcionais do ecossistema e na ciclagem de nutrientes, porém os ambientes de água doce são os mais adequados para o seu crescimento, principalmente em pH entre 6 a 9, temperatura entre 15 a 30°C, alta concentração de nutrientes e estabilidade da coluna d'água<sup>13</sup>. As cianobactérias também são tradicionalmente chamadas de "algas azuis", apesar da distante relação filogenética com este grupo de microrganismo.

Várias cianobactérias que formam florações em ambientes aquáticos produzem uma grande variedade de compostos tóxicos. As toxinas produzidas são denominadas cianotoxinas e representam um amplo grupo de toxinas naturais, tanto do ponto de vista químico como toxicológico. Seus mecanismos de toxicidade descritos atualmente são muito diversos e variam de efeitos hepatotóxico, neurotóxico e dermatotóxico à inibição geral de síntese de proteínas<sup>5,16</sup>. Estas toxinas são liberadas quando ocorre a morte ou lise celular da cianobactéria, sendo que apenas 30 a 50% destas espécies produzem estas toxinas.

Registros de intoxicações em populações humanas devido às exposições as toxinas de cianobactérias têm sido encontrados em diferentes partes do mundo<sup>7</sup>. No entanto, o primeiro registro de envenenamento fatal em humanos ocorreu no Brasil, em 1996, numa clínica de hemodiálise na cidade de Caruaru no estado de Pernambuco, quando mais de 100 pacientes renais crônicos foram intoxicados, dos quais 52 morreram após a exposição intravenosa de água contendo microcistina durante o tratamento de diálise<sup>9,14</sup>.

A microcistina é um heptapeptídeo cíclico com mais de 60 variáveis que geralmente diferem na natureza de dois aminoácidos<sup>6</sup>, devido a sua estrutura química peculiar é altamente estável na água e resistente a grandes variações de temperatura e pH. A microcistina mantém sua toxicidade mesmo após a fervura e em condições naturais, no escuro, podendo

persistir por meses ou anos. Em temperatura elevada (40°C) e condições de pH alto ou baixo, foram observadas hidrólises lentas, sendo necessário aproximadamente 10 semanas em pH 1 e mais de 12 semanas em pH 9 para a degradação de cerca de 90% da concentração total das microcistinas<sup>8</sup>. O fígado é o órgão alvo, onde ocorre a inibição enzimática das proteínas fosfatases serina/treonina, especialmente PP1 e PP2A, podendo levar a morte ou a intoxicação crônica, gerando tumores hepáticos<sup>11</sup>.

Estudos recentes mostram a ocorrência de cianobactérias tóxicas em reservatórios de água de abastecimento público, lagos e rios<sup>2,3</sup>, em diferentes regiões do Brasil, tais como: estados do Rio de Janeiro<sup>10</sup>, Paraná<sup>10</sup>, Rio Grande do Sul<sup>12,19</sup>, Pernambuco<sup>15</sup>, Pará<sup>18</sup> e no estado de São Paulo<sup>1</sup>, nas represas Billings, Guarapiranga, Alto Tietê e Rio Grande.

O presente projeto de pesquisa teve como objetivo determinar a concentração de microcistinas em águas coletadas em clínicas de hemodiálise, localizadas no estado de São Paulo, após seu tratamento para uso em diálise.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Amostragem

Foram utilizadas 177 amostras de água de hemodiálise coletadas em clínicas de hemodiálise do estado de São Paulo, Brasil, pelos fiscais de 24 DIRs (Divisão Regional de Saúde) sob coordenação da Vigilância Sanitária, durante o período de abril de 2002 a março de 2003.

As amostras foram coletadas em frascos plásticos e armazenadas em freezer (-20°C) até o momento da análise, a qual foi realizada na Seção de Química Biológica da Divisão de Bromatologia e Química do Instituto Adolfo Lutz.

### Metodologia

A concentração de microcistina foi determinada pelo método de imunoensaio (ELISA), utilizando o kit da Envirologix Inc. e uma leitora de placas Multiscan MCC/340P e Behring EI311. Todos os reagentes foram mantidos à temperatura ambiente antes do uso, por meia hora ou até atingirem o equilíbrio térmico e a quantificação de microcistina foi realizada de acordo com as instruções do fabricante do kit.

Inicialmente, o kit foi testado quanto a sua linearidade, obtendo-se uma curva padrão a partir das medidas da absorbância das soluções padrões de microcistina em função de sua concentração, na faixa de 0,16 a 2,50 µg/L (Figura 1). A regressão linear foi obtida no Excel (Microsoft) utilizando escala semi-log. A exatidão e precisão do método analítico foram verificadas a partir de experimentos de recuperação de amostras fortificadas artificialmente.

As amostras foram analisadas em duplicata. A quantificação de microcistina foi realizada utilizando uma curva padrão previamente determinada.

## RESULTADOS

As amostras foram provenientes de diferentes cidades do Estado de São Paulo, sendo que a sua origem de acordo com a região de coleta está representada na Figura 2, onde se considerou como a origem a localização da DIR responsável pela sua coleta, armazenagem e envio para o laboratório.

A curva padrão (Figura 1) apresentou linearidade no intervalo de concentrações de 0,16 a 2,5µg/L ( $r > 0.98$ ). Obteve-se uma recuperação média de 98.6% para um limite de quantificação de 0.16 µg/L (ppb). O desvio padrão relativo (rsd) para cada par de padrões e de amostras analisadas foi inferior a 15%.

Não foi detectada a presença de microcistinas nas 177 amostras de água analisadas.

## DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

As amostras foram coletadas em diferentes cidades do estado de São Paulo pelos fiscais de 24 DIRs que participaram deste projeto, totalizando 177 amostras de águas de hemodiálise, o que permitiu uma avaliação geral da qualidade dos sistemas de tratamento de água das clínicas localizadas neste estado, durante o período amostrado.

As amostras foram coletadas durante o período de um ano, pois a floração das cianobactérias são sazonais, com maior prevalência no verão, uma vez que a concentração de microcistinas em águas superficiais tende a apresentar um comportamento esporádico. Este problema torna-se mais grave durante os períodos de altas temperaturas e estiagem, quando os níveis dos mananciais tornam-se baixos e a concentração de nutrientes, principalmente nitrogênio e fósforo, aumentam, oferecendo condições propícias para a floração de cianobactérias nestes ecossistemas, resultando no aparecimento das microcistinas.

Após o episódio ocorrido em Caruaru, a revisão das normas e dos padrões de potabilidade da água para consumo humano (Portaria MS 518/2004 de 25/03/2004) da Agência Nacional de Vigilância Sanitária passou a exigir dos órgãos competentes e responsáveis pelo tratamento e fornecimento de água também o controle da ocorrência de cianobactérias na água bruta e de três cianotoxinas na água tratada para consumo humano, estabelecendo o valor máximo permitido para microcistina<sup>4</sup> igual a 1,0 µg/L.

As clínicas de hemodiálise normalmente são abastecidas pela rede de abastecimento municipal, de forma que as águas fornecidas podem conter até 1,0 µg/L de microcistinas. Porém, como não existem dados que garantam que água para hemodiálise com concentração acima de 0,00 µg/L seja segura para os pacientes, recomenda-se que a concentração de microcistina na água tratada para hemodiálise seja igual a zero. Frente à constatação da existência de microcistina na água de abastecimento, considera-se que a manutenção de forma

rigorosa do sistema de tratamento de água nas clínicas de hemodiálise é a medida mais eficaz para minimizar o problema de contaminação dos pacientes renais crônicos.

A partir dos resultados obtidos, verificou-se que não foram detectadas microcistinas nas amostras analisadas. Este fato é muito positivo para um primeiro monitoramento no estado de São Paulo, o que permite concluir que as medidas adotadas de controle de cianobactérias pela Portaria MS 518/04 juntamente com a manutenção adequada dos sistemas de tratamento de água de hemodiálise, constituem-se medidas preventivas eficientes para garantia da qualidade de água de hemodiálise, podendo evitar a contaminação de pacientes renais crônicos por microcistinas.

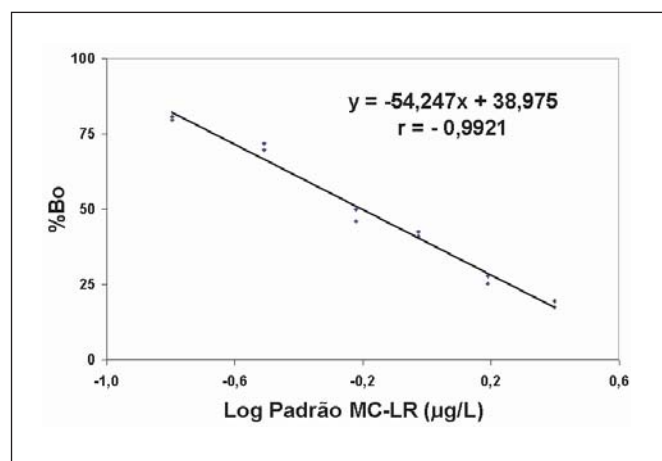


Figura 1. Curva de calibração de microcistina-LR onde %Bo = (média da absorbância do padrão ou amostra / média da absorbância do controle negativo).100.

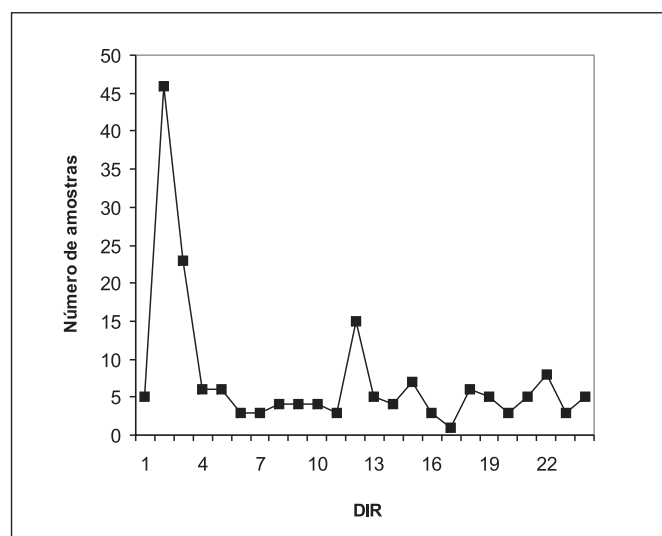


Figura 2. Número de amostras provenientes das regiões do estado de São Paulo.



Conclui-se, que monitoramentos deste tipo são muito importantes e permitem avaliar a qualidade da água de hemodiálise dos centros de diálise avaliados, principalmente que a presença de cianobactérias nos mananciais do estado de São Paulo são uma realidade. Ainda, considera-se que estes monitoramentos devam ser realizados periodicamente, devido à toxicidade desta fitotoxina, com o intuito de prevenir incidentes similares aos ocorridos na cidade de Caruaru no estado de Pernambuco/Brasil.

## REFERÊNCIAS

1. Agujaro, F.L.; Lussari, F.J. Florações de cianobactérias potencialmente tóxicas nas bacias dos rios Piracicaba, Capivari e Jundiá-Estado de São Paulo-Brasil. In: Seminário Latino-Americano sobre cianobactérias tóxicas: Qualidade de água e saúde pública, Rio de Janeiro, RJ. **Resumos**. Brasília: MS/FUNASA, 2001, p.6.
2. Azevedo, S.M.F.O. et al. First report of microcystins from a Brazilian isolate of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*, **Journal of Applied Phycology**, 6:261-5, 1994.
3. Azevedo, S.M.F.O. Toxinas de cianobactérias: causas e conseqüências para a Saúde Pública, **Revista Virtual de Medicina**, 1(3), 1998.
4. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº 518, de 25 de março de 2004. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativas ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**. Brasília.
5. Carmichael, W.W. Toxins of fresh water algae. In: Tu, A.T. (ed), **Handbook of natural toxins**, New York, Marcel Dekker, 1988, p: 121-147.
6. Chorus, I.; Mur, L. Preventative measures. In: Chorus, I; Bartram, J. (ed), **Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management**, London: E & FN Spon, 1999. p: 235-273.
7. Falconer, I.R. Health implications of Cyanobacterial (blue-green algae) toxins. In: Steffensen D.A., Nicholson B.C., editors. **Toxic Cyanobacteria Current Status of Research and Management** - Proceedings of an International Workshop. Adelaide; 1994.
8. Harada, K.I.; Tsuji, K.; Watanabe, M.F. Stability of microcystins from cyanobacteria. III. Effect of pH and temperature. **Phycologia**, 35(6):83-8, 1996.
9. Jochimsen, E.M. et al.. Liver failure and death after exposure to microcystins at a haemodialysis in Brazil. **New England Journal of Medicine**, 338: 873-878, 1998.
10. Kamogae, M. **Monitoramento de microcistinas e estudo de parâmetros que favorecem o seu desenvolvimento nas represas de ItaipuCapivara e Três Bocas**, Paraná, 2002. [Dissertação de Mestrado, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina]
11. Mackintosh, C. et al. Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants, **FEBS Letters**, 264: 187-192, 1990.
12. Matthiensen, A.; Yunes, J.S.; Codd, G.A. Ocorrência, distribuição e toxicidade de cianobactérias no estuário da Lagoa dos Patos, RS. **Rev. Brasil. Biol.**, 59(3): 361-376, 199.
13. Mur, L.R.; Skulberg, O.M.; Utkilen, H. Cyanobacteria in environment. In: Chorus, I; Bartram, J (ed). **Toxic cyanobacteria in water: a guide to their public health consequences, monitoring and management**. London: E & FN Spon, 1999. p: 15-37.
14. Picanço, M. R. et al. Toxicity of a cyanobacterial extract containing microcystins to mouse lung, **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 37(8): 1225-1229, 2004.
15. Pouria, S. et al. Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil. **The Lancet**, 352: 21-26, 1998.
16. Sivonen, K. Cyanobacterial toxins and toxin production, **Phycologia**, 35(6): 12-24, 1996.
17. Skulberg, O.M.; Codd, G.A.; Carmichael, W.W. Toxic blue-green algae blooms in Europe: a growing problem, **Ambio**, 13: 244-247, 1984.
18. Vieira, J.M.S. **Toxicidade de cianobactérias e concentração de microcistinas em uma represa de abastecimento público da região amazônica do Brasil**, São Paulo, 2002 [Tese de Doutorado, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo].
19. Yunes, J.S. et al. Toxic blooms of cyanobacteria in the Patos lagoon estuary, southern Brazil, **J. Aquat. Ecosystem Health**, 5: 223-9, 1996.

# Água de diálise: ocorrência de leveduras, *Pseudomonas aeruginosa* e bactérias heterotróficas

## Hemodialysis water: occurrence of yeasts, *Pseudomonas aeruginosa*, and heterotrophic bacteria

RIALA6/1001

\*Marise SIMÕES<sup>1</sup>; Maria de Fátima C. PIRES<sup>2</sup>\* Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Instituto Adolfo Lutz - Lab. I de Campinas e Programa de Pós Graduação/CIP/SES/SP. email: msimoes@ial.sp.gov.br<sup>2</sup> Instituto Adolfo Lutz – Lab. Central de São Paulo

### RESUMO

A hemodiálise é uma modalidade terapêutica para pacientes com insuficiência renal. Durante o verão e inverno de 2003 foram analisadas 200 amostras de água de diálise provenientes de 2 unidades hospitalares denominadas A e B. Os pontos analisados foram: 18 do cavalete de entrada (P1), 18 do pré-tratamento (P2), 18 da osmose reversa (OR)(P3), 28 da entrada da máquina (P4), 30 da solução de diálise (P5), 17 das linhas e dialisador (P6), 9 do “loop” (P7), 11 do filtro de carvão (P8), 18 do reuso C (P9), 18 do reuso B (P10), 15 do reservatório da OR (P11). A metodologia utilizada foi a recomendada pelo “Standard Methods for Examination of Water and Wastewater”, 1995 utilizando as técnicas: “Pour Plate” para contagem de bactérias heterotróficas (BH) em R2A; membrana filtrante para *Pseudomonas aeruginosa* em Ágar Cetrimide e leveduras em Agar Sabouraud – dextrose com 200 mg/mL de cloranfenicol e determinações de fluoreto e condutividade; nitrato e sulfato pela metodologia das Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz, 1985. Não houve diferença significativa entre verão e inverno. A unidade A apresentou leveduras em 5 amostras, *P.aeruginosa* em 14 e BH acima de 200UFC/mL em 52; enquanto a unidade B apresentou leveduras em 20 amostras, *P.aeruginosa* em 5, e BH acima de 200UFC/mL em 36. Após a OR foi realizada a pesquisa de endotoxinas bacterianas, sendo detectada em duas amostras na unidade A. Os parâmetros químicos revelaram a eficácia das membranas da OR na filtração dos íons fluoreto, nitrato, sulfato, condutividade nas duas unidades durante inverno e verão, (p<0,001). A RDC 154/2004 não faz referências à pesquisa de *P.aeruginosa* e leveduras. Este estudo mostrou que estes microrganismos podem estar presentes e não serem sensíveis a desinfecção como aconteceu com as BH. Manter a qualidade da água de diálise é uma maneira de prevenir riscos aos pacientes.

**Palavras-Chave.** água, hemodiálise, *Pseudomonas aeruginosa*, leveduras, bactérias heterotróficas, desinfecção.

### ABSTRACT

During the summer and winter of 2003, 200 samples of water used for hemodialysis procedures collected from two hospitals A and B were analyzed. The water samples were collected from the following sites: P1 - from incoming public treated water; from city water mains (N=18 samples); P2 - from pre-treatment site (N=18); P3 - from reverse osmosis (OR) treatment site (N=18); P4 - from hemodialysis machine water entry site (N=28); P5 - pre-dialyzing solution (N=30); P6 - from post-dialyzing site with arterial and venous blood lines (N=17); P7- from loop (N=9); P8 - from carbon filter (N=11); P9 - from reuse C site (N=18); P10 - from reuse B site (N=18); and P11- from water storage tank for OR (N=11). The analyses were performed according to the methodology recommended in the Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 1995, by means of the following assays: pour plate technique for heterotrophic bacteria (BH) counting in R2A agar; filter membrane technique for *Pseudomonas aeruginosa* detection in Cetrimide agar; culture in Sabouraud agar for yeast; technique for fluoride and conductivity determination; determination of sulfate and nitrate performed according to “Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz” (Instituto Adolfo Lutz Analytical Guidelines), 1985. No significant seasonal differences were observed on

microorganism findings. From the water samples collected from unit A, five samples presented yeast; *P. aeruginosa* was detected in 14; 52 were positive for BH in a rate over than 200 UFC/mL. On the other hand, in samples collected from hospital B the yeast was detected in 20 samples, *P. aeruginosa* in five specimens, and 36 samples presented BH over than 200 UFC/mL. Bacteria endotoxins were analyzed in P3 sites, and these microorganism were detected in two samples among those collected from hospital A. Chemical parameters data indicated the OR membranes for filtrating fluoride ions, nitrate, sulphate and conductivity were efficacious in both health services no matter which season ( $p < 0,001$ ). Brazilian rules RDC 154/2004 does not make reference on the search for yeast and *P. aeruginosa*, nevertheless the present study showed that these bacteria might occur in hemodialysis system. These findings imply that the microorganisms are not eliminated by the current disinfections, as happened with BH's. Providing high quality water in performing hemodialysis procedure has been a safe and reliable way for preventing risks to the patients.

**Key Words.** water, hemodialysis, *Pseudomonas aeruginosa*, yeast, heterotrophic bacteria, disinfections.

## INTRODUÇÃO

Hemodiálise é a modalidade terapêutica para pacientes com insuficiência renal crônica, que atende atualmente no Brasil 89,63% dos doentes. Tem como princípio remover as substâncias tóxicas e principalmente o excesso de líquido acumulado no sangue e tecidos do corpo em consequência da falência renal. No processo de hemodiálise, grandes quantidades de substâncias podem ser removidas relativamente rápidas e de maneira efetiva<sup>20</sup>.

Existem muitos relatos de morte e prejuízos à saúde de pacientes associados ao tratamento inadequado da água para diálise.

Em 1989 o "Food Drug Administration (FDA)" revisou e publicou um manual de tratamento em água de diálise e neste relacionou os sintomas com as possíveis causas de contaminação da água, os quais foram: anemia por alumínio, cloramina, cobre e zinco; doença óssea por alumínio e flúor; hemólise por cobre, nitratos, cloraminas; hipertensão por cálcio e sódio; hipotensão por bactéria, endotoxina e nitratos; acidose metabólica por baixo pH e sulfatos; degeneração neurológica por alumínio; náusea e vômito por bactéria, cálcio, cobre, endotoxina, baixo pH, magnésio, nitratos, sulfatos e zinco; morte por alumínio, flúor, endotoxina, bactéria e cloramina<sup>1</sup>.

Em 1996, na cidade de Caruaru em Recife, ocorreu um surto numa clínica que atendia 131 pacientes, que apresentavam suas funções renais comprometidas e se encontravam em tratamento dialítico. Cem pacientes desenvolveram falência aguda do fígado, sendo que 52 foram a óbito em consequência da contaminação da água de hemodiálise por toxinas de cianobactérias<sup>4</sup>.

Neste mesmo ano em Campinas, SP, ocorreu um surto de bacteriemia por *Pseudomonas aeruginosa* em uma unidade de hemodiálise. Foram analisadas amostras de água e dialisato e também realizadas hemoculturas dos pacientes afetados, confirmando a presença da mesma cepa de *P.aeruginosa* na amostra de água e no sangue dos pacientes<sup>19</sup>.

No Brasil, somente em outubro de 1996 entrou em vigor a Portaria 2042 do Ministério da Saúde, para tratar, especificamente, da qualidade da água para hemodiálise e essa Portaria foi substituída pela Portaria 82 de janeiro de 2000 e atualmente pela Resolução – RDC Nº 154 de 15 de junho de 2004, a qual estabelece o regulamento técnico para o funcionamento dos serviços e as normas para cadastramento destes serviços pelo SUS<sup>6</sup>. Ressalta-se que esta resolução, assim como as anteriores, não incluiu nos parâmetros microbiológicos as pesquisas de leveduras e *P.aeruginosa*.

Os fatores de virulência expressos pela *Pseudomonas aeruginosa* incluem a produção de exotoxinas, a camada mucóide resistente à fagocitose, síntese de enzimas e hemolisinas que degradam o tecido do hospedeiro. Sua sobrevivência na água por longos períodos mesmo sob condições de falta de nutrientes tem sido objeto de estudo para novas medidas visando sua eliminação<sup>22</sup>.

Durante a última década os fungos emergiram como principal causa de infecções hospitalares. A maioria dos fungos é habitante natural do solo, água e raramente comportam-se como patógenos em um hospedeiro sadio. Entretanto, pacientes submetidos à hemodiálise possuem um sistema imunológico comprometido, e são suscetíveis a vários patógenos<sup>2,13</sup>.

As bactérias representam 60% das complicações que os pacientes sob diálise podem apresentar. Os fungos são causa de 15% das complicações, mas podem, em muitos casos, levar o paciente ao óbito<sup>8</sup>.

Este trabalho teve como objetivos: pesquisar leveduras, *Pseudomonas aeruginosa* e bactérias heterotróficas na água da rede pública de abastecimento e na água de diálise, tratada por osmose reversa, em duas unidades de hemodiálise, antes e depois da desinfecção do sistema de tratamento de osmose reversa, durante o verão e o inverno de 2003; avaliar a eficácia da ação das membranas da osmose reversa, quantificando e comparando a condutividade, os íons sulfato, nitratos e fluoretos nas amostras de água que chegam às unidades pelo sistema de abastecimento público com a água depois de tratada por osmose reversa; pesquisar a presença de Endotoxinas bacterianas após

o tratamento por osmose reversa e propor adoção de medidas de controle para melhorar o monitoramento da qualidade da água de hemodiálise, com mais um parâmetro importante na avaliação das análises microbiológicas, fundamentadas nas conclusões deste estudo.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas 200 amostras de água, de 2 unidades de hemodiálise denominadas A e B. Na unidade A foram coletadas 107 amostras e na unidade B 93 amostras, durante 4 semanas no verão e 4 semanas no inverno do ano de 2003.

As duas unidades realizavam 3 turnos diários de atendimento a pacientes com insuficiência renal crônica. A unidade A atendia 120 pacientes e a unidade B 42 pacientes, diariamente. As duas unidades utilizavam no pré-tratamento da água para hemodiálise, filtro de areia, abrandador e filtros de carvão e no tratamento osmose reversa. A hemodiálise dos pacientes em máquinas de proporção.

Tanto a unidade A como a B contavam com 2 salas de lavagem denominadas de sala de “reuso”. A sala do “reuso” branco, para lavagem dos acessórios de pacientes não portadores de hepatite, e outra do “reuso” C, para lavagem dos acessórios dos pacientes portadores de hepatite C.

As amostras de água foram coletadas do cavalete de entrada, do pré-tratamento e de diferentes pontos de distribuição do sistema de tratamento de hemodiálise, durante o verão e inverno de 2003 (Tabela 1).

A coleta foi realizada segundo a metodologia recomendada pelo “Standard Methods For The Examination of Water and Wastewater” e “American Public Health Association

(APHA)” e para a análise microbiológica foram utilizados frascos estéreis de 300mL, para a análise química de 1000 mL e para a pesquisa de endotoxinas bacterianas frascos de vidro apirogênicos de 100 mL, em duplicata. As amostras foram acondicionadas sob refrigeração em recipiente térmico, encaminhado ao laboratório e submetidas à análise imediatamente<sup>12</sup>.

As técnicas utilizadas segundo Eaton et al.<sup>12</sup> foram: “Pour Plate” para contagem de bactérias heterotróficas em Ágar R2A, 35°C/72 h; membrana filtrante (100 mL) para *P. aeruginosa* em 100 mL de amostra, em Ágar Cetrimide 35°C/48h; *P. aeruginosa* isoladas foram classificadas segundo o critério apresentado pelo Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology - Palleroni<sup>18</sup>, e leveduras em 100 mL de amostra em Agar Sabouraud – dextrose com 200mg/mL de cloranfenicol, 25°C/7dias (as leveduras isoladas foram bioquimicamente caracterizadas e identificadas segundo Kurtzman e Fell<sup>15</sup>; fluoreto e condutividade<sup>12</sup>. A análise de nitrato e sulfato foi realizada segundo a metodologia recomendada pelas Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz<sup>14</sup>. A pesquisa de endotoxinas bacterianas foi realizada segundo a metodologia recomendada pela “United States Pharmacopeia”, pelo método de formação de Gel<sup>23</sup>.

As legislações utilizadas foram: Portaria 518 de março de 2004 do Gabinete do Ministro - Ministério Da Saúde – que estabelece os parâmetros da água tratada de rede pública de abastecimento<sup>7</sup> e a Resolução RDC - N°. 154 de 15 de junho de 2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária-Ministério da Saúde, que estabelece os parâmetros da água utilizada para diálise<sup>6</sup>.

Os dados foram analisados com critério de probabilidade significativa de  $p < 0,05$ , utilizando-se do programa Epi Info 6 do Center for Disease Control & Prevention and World Health

**Tabela 1.** Número de coletas realizadas, durante o verão e inverno de 2003 nas unidades A e B.

| Pontos de Coleta         | Unidades |         |               |       |         |               | Total |
|--------------------------|----------|---------|---------------|-------|---------|---------------|-------|
|                          | A        |         |               | B     |         |               |       |
|                          | Verão    | Inverno | Total parcial | Verão | Inverno | Total Parcial |       |
| P1 – Cavalete de entrada | 5        | 4       | 9             | 5     | 4       | 9             | 18    |
| P2 – Pré-tratamento      | 5        | 4       | 9             | 5     | 4       | 9             | 18    |
| P3 – Osmose reversa (OR) | 5        | 4       | 9             | 5     | 4       | 9             | 18    |
| P4 – Entrada da máquina  | 12       | 8       | 20            | 4     | 4       | 8             | 28    |
| P5 – solução de diálise  | 13       | 8       | 21            | 5     | 4       | 9             | 30    |
| P6 – Linhas e dialisador | 5        | 4       | 9             | 4     | 4       | 8             | 17    |
| P7 – “Loop” da OR        | -*       | -*      | -*            | 5     | 4       | 9             | 9     |
| P8 – Filtro de carvão    | 2        | 4       | 6             | 1     | 4       | 5             | 11    |
| P9 – Reuso C             | 5        | 4       | 9             | 5     | 4       | 9             | 18    |
| P10 – Reuso Branco       | 5        | 4       | 9             | 5     | 4       | 9             | 18    |
| P11 – Reservatório da OR | 4        | 2       | 6             | 5     | 4       | 9             | 15    |
| <b>Total</b>             | 61       | 46      | 107           | 49    | 44      | 93            | 200   |

Organization<sup>11</sup>. Empregaram-se os seguintes testes : X<sup>2</sup> para análise do efeito da desinfecção nos vários pontos amostrados nas duas unidades estudadas e para a análise da sazonalidade (verão e inverno) nas duas unidades estudadas. Teste t student para a análise da condutividade, nitrato e fluoreto nos pontos amostrados nas duas unidades através da análise média comparada.

Este trabalho seguiu as recomendações da Resolução 196/96. Foi aprovado pelo Comitê de Ética do Instituto Adolfo Lutz.

## RESULTADOS

Das 200 amostras de água analisadas nas duas unidades de hemodiálise durante as duas estações verão e inverno no ano de 2003, 55% (110/200) foram coletadas no verão e 45% (90/200) no inverno. Foram analisadas na unidade A 53,5% (107/200) das amostras coletadas, sendo 30,5% (61/200) do verão e 23,0% (46/200) do inverno. Na unidade B foram analisadas 46,5%, (93/200) das amostras coletadas, sendo 24,5% (49/200) do verão e 22,0% (44/200) do inverno.

Todas as amostras de água que continham leveduras estavam dentro do circuito da água após o tratamento por osmose reversa, onde foram coletadas 153 amostras nos pontos: P4- entrada da máquina, P5- solução de diálise, P6- linhas e dialisador, P7- "loop", P9- reuso C, P10- reuso branco e P11- reservatório da osmose reversa. Leveduras foram isoladas em 16,34% (25/153) amostras, sendo 5 espécies diferentes em 5 amostras na unidade A e 5 espécies em 20 amostras na unidade B. As espécies encontradas foram *Candida suecica* 36% (9/25), *Rhodotorula rubra* 12% (3/25), *Cryptococcus laurentii* 12% (3/25), *Candida fluvitalis* 4% (1/25), *Candida ciferrii* 4% (1/25), *Candida humícula* 4% (1/25), *Rhodotorula glutinis* 4% (1/25), e *Aureobasidium sp* 24% (6/25) (Tabela 2).

**Tabela 2.** Espécies de leveduras isoladas nas unidades A e B

| Leveduras isoladas            | Unidade A | Unidade B | Total     |
|-------------------------------|-----------|-----------|-----------|
| <i>Aureobasidium sp</i>       | -         | 6         | 6         |
| <i>Candida fluvitalis</i>     | -         | 1         | 1         |
| <i>Candida ciferrii</i>       | 1         | -         | 1         |
| <i>Candida suecica</i>        | -         | 9         | 9         |
| <i>Candida humícula</i>       | 1         | -         | 1         |
| <i>Cryptococcus laurentii</i> | 1         | 2         | 3         |
| <i>Rhodotorula glutinis</i>   | 1         | -         | 1         |
| <i>Rhodotorula rubra</i>      | 1         | 2         | 3         |
| <b>Total</b>                  | <b>5</b>  | <b>20</b> | <b>25</b> |

Das 25 cepas isoladas 14 (56%) foram das salas de lavagem, sendo 28% (7/25) da sala de reuso branco e 28% (7/25) da sala de reuso C das duas unidades (Tabela 3).

*P. aeruginosa* foi isolada dentro do circuito da água após o tratamento por osmose reversa, onde foram coletadas 153 amostras nos pontos: P4- entrada da máquina, P5- solução de diálise ou "dialisato novo", P6- linhas e dialisador, P10- reuso branco (sala de lavagem de material de pacientes sem hepatite (Tabela 3).

*P. aeruginosa* foi isolada em 12,42% (19/200) das amostras. Das 19 cepas isoladas, nas duas unidades, 84,21% (16/19) foram da solução de diálise (P5), água que sai da máquina para entrar no dialisador adicionada da solução dialisadora (Tabela 3).

A pesquisa de bactérias heterotróficas foi realizada a fim de avaliar as condições higiênicas da água e estabelecer uma correlação com os patógenos oportunistas: leveduras e *P. aeruginosa*.

Das 200 amostras, 47 foram coletadas fora do sistema de tratamento da osmose reversa, sendo 18 amostras do cavalete de entrada, 18 amostras do pré-tratamento e 11 amostras dos

**Tabela 3.** Leveduras, *P. aeruginosa* e bactérias heterotróficas acima de 200 UFC/mL isoladas em 10 pontos nas duas unidades de hemodiálise analisadas

| Pontos de Coleta        | A         |                      |           | B         |                      |           | Total      |
|-------------------------|-----------|----------------------|-----------|-----------|----------------------|-----------|------------|
|                         | Leveduras | <i>P. aeruginosa</i> | BH>200UFC | Leveduras | <i>P. aeruginosa</i> | BH>200UFC |            |
| P2 - Pré-tratamento     | -         | -                    | -         | -         | -                    | 1         | 1          |
| P3 - Osmose reversa     | -         | -                    | 1         | -         | -                    | -         | 1          |
| P4 - Entrada-máquina    | -         | 1                    | 13        | 1         | -                    | 6         | 21         |
| P5 - solução de diálise | 2         | 12                   | 14        | 1         | 4                    | 8         | 41         |
| P6 - Linhas/ dialisador | -         | -                    | -         | 2         | 1                    | -         | 3          |
| P7 - "Loop"             | -         | -                    | -         | 3         | -                    | 4         | 7          |
| P8 - Filtro de carvão   | -         | -                    | 6         | -         | -                    | 3         | 9          |
| P9- Reuso C             | 2         | -                    | 8         | 5         | -                    | 8         | 23         |
| P10 - Reuso B           | 1         | 1                    | 6         | 6         | -                    | 4         | 18         |
| P11 - Reservatório OR   | -         | -                    | 4         | 2         | -                    | 2         | 8          |
| <b>Total</b>            | <b>5</b>  | <b>14</b>            | <b>52</b> | <b>20</b> | <b>5</b>             | <b>36</b> | <b>132</b> |

OR = osmose reversa

filtros de carvão e os resultados obtidos foram analisados segundo a Portaria 518/2004.

Nas 18 amostras do pré-tratamento, somente uma amostra da unidade B, apresentou contagem de bactérias heterotróficas em desacordo com a Portaria 518/2004 ( $2,2 \cdot 10^3$  UFC/mL) (Tabela 3).

Das 11 amostras coletadas nos filtros de carvão, 9 também estavam em desacordo com a Portaria 518/2004, com contagem de bactérias heterotróficas acima de 500UFC/mL, sendo que destas 4 estavam acima de  $3 \cdot 10^3$  UFC/mL.

Considerando a RDC N°. 154/2004, que trata da água de diálise, das 200 amostras analisadas, 153 foram enquadradas nesta resolução, sendo que 50,98% (78/153) estavam em desacordo, acima de 200UFC/mL. Dessas 24,35% (19/78) pertenciam à entrada da máquina (P4) e 28,21% (22/78) à solução de diálise (P5) (Tabela 3).

Observou-se diferença significativa ( $p < 0,001$ ) na relação entre as amostras satisfatórias (35) e em desacordo (1) com os padrões microbiológicos vigentes para bactérias heterotróficas, nos pontos do cavalete de entrada (P1) e após a osmose reversa (P3) com os demais pontos, nas 164 amostras coletadas após o tratamento de osmose reversa (Tabela 4).

Em uma das coletas do verão na unidade B foi isolado, simultaneamente, nas linhas e dialisador (P6) *Candida suecica* e *Paeruginosa* com bactérias heterotróficas abaixo de 200 UFC/mL.

Em uma das coletas do inverno na unidade A foi isolado, simultaneamente, na solução de diálise (P5) *Rhodotorula rubra* e *P. aeruginosa* com bactérias heterotróficas acima de 3.000 UFC/mL.

Das 25 amostras com leveduras isoladas das unidades A e B 36% (9/25) foram satisfatórias para bactérias heterotróficas, as quais apresentaram contagem abaixo de 200 UFC/mL, segundo a RDC N°.154/2004. As 64% (16/25) das amostras restantes estavam em desacordo com a RDC N°.154/2004 por apresentarem contagem de bactérias heterotróficas acima de 200 UFC/mL.

Em 9 amostras de água aprovadas para bactérias heterotróficas, segundo a atual resolução, foram isoladas as seguintes leveduras: *C. ciferii* (1), *C. suecica* (2), *Cryptococcus laurentii* (2), *Rhodotorula rubra* (2) e *Aureobasidium sp* (2).

Das 19 amostras com *P. aeruginosa* isoladas das unidades A e B 15,80% (3/19) foram aprovadas para bactérias heterotróficas com contagem abaixo de 200 UFC/mL, segundo a RDC N°.154/2004. As 84,20% (16/19) amostras restantes além de apresentarem *P.aeruginosa* estavam em desacordo com a RDC N°. 154/2004 com contagem de bactérias heterotróficas acima de

200 UFC/mL.

Foram coletadas 36 amostras para análise dos parâmetros físico-químicos: fluoreto, nitrato, sulfato e condutividade. Sendo 18 amostras da unidade A, onde 9 eram provenientes do cavalete de entrada (P1) e 9 da osmose reversa (P3) e 18 amostras da unidade B, sendo 9 provenientes do cavalete de entrada (P1) e 9 da osmose reversa (P3).

A Portaria 518 de 23/03/2004 trata dos parâmetros físico-químicos para fluoretos, nitrato, sulfato e condutividade em água tratada destinada ao consumo humano. Já a Resolução RDC N°. 154/2004 trata destes parâmetros para a água utilizada em diálise.

Todas as 18 amostras do cavalete de entrada (P1), coletadas nas unidades A e B apresentaram teores de fluoreto (abaixo de 0,8mg/L), nitrato (abaixo de 10mg/L) e sulfato (abaixo de 250 mg/L) dentro dos limites da Portaria 518/2004. Assim como as 18 amostras da osmose reversa (P3), coletadas em A e B, apresentaram teores de fluoreto (abaixo de 0,2 mg/L), nitrato (abaixo de 2 mg/L) e sulfato (abaixo de 100mg/L) dentro da RDC N°.154/2004.

A Portaria 518/2004 não estabelece limite máximo para condutividade em amostras coletadas no cavalete de entrada (P1).

Todas as 18 amostras coletadas neste ponto (P1), em A e B, apresentaram teores de condutividade que variaram de 76,5  $\mu$ S/cm até 230,6  $\mu$ S/cm. Apesar da diferença estatística significativa ( $p < 0,005$ ) para condutividade em P1 em relação a P3, a condutividade em 6 das 18 amostras coletadas na osmose reversa (P3) estava fora do limite estabelecido pela RDC N°.154/2004, sendo 5 amostras em A e 1 amostra em B. As 12 amostras (P3) restantes estavam de acordo com a RDC N°.154/2004 (abaixo de 10  $\mu$ S/cm).

A diferença entre as amostras do cavalete de entrada (P1) e da osmose reversa (P3) foi significativa para as duas unidades, nas estações verão e inverno, para fluoretos, nitrato e condutividade.

A pesquisa de endotoxinas bacterianas foi realizada durante o verão e inverno nas duas unidades, no ponto da osmose reversa (P3), sendo detectada em duas amostras da unidade A durante o verão.

A desinfecção do sistema de tratamento da água de diálise por osmose reversa aconteceu nas 2 unidades uma vez por mês. Os pontos de coleta envolvidos na desinfecção do sistema foram: colunas da osmose reversa (P3); entrada da

**Tabela 4.** Comparação entre os resultados para bactérias heterotróficas das amostras colhidas nos pontos do cavalete de entrada (P1) e após a osmose reversa (P3) com os demais pontos

| Pontos        | Satisfatórias | Em desacordo | Total | p      |
|---------------|---------------|--------------|-------|--------|
| P1 e P3       | 35            | 1            | 36    | <0,001 |
| Demais Pontos | 77            | 87           | 164   |        |
| <b>Total</b>  | 112           | 88           | 200   |        |

máquina (P4); ponto em que a solução de diálise entrava no dialisador (P5); linhas e dialisador (P6); “loop” para o reservatório da osmose reversa (P7); reuso C (P9); reuso branco (P10); e reservatório da água tratada por osmose reversa (P11).

Foram analisados os resultados antes e depois da desinfecção, referentes à presença de leveduras, *P. aeruginosa* e contagem de bactérias heterotróficas. Esses resultados das 2 unidades foram estudados juntos por não haver diferença significativa de comportamento entre elas com relação aos efeitos da desinfecção. Em cada unidade, uma das coletas, foi realizada no dia seguinte a desinfecção do sistema de tratamento da água de diálise por osmose reversa.

Foram comparadas todas as amostras da unidade A mais B, coletadas antes da desinfecção com as amostras coletadas depois da desinfecção, a fim de verificar como se mantinha a qualidade da água ao longo do mês até a próxima desinfecção. Assim foram comparadas 153 amostras analisadas. O resultado do efeito da desinfecção nas duas unidades, nestas 153 amostras analisadas, não foi significativo ( $p > 0,05$ ) para leveduras e *P. aeruginosa*, não havendo redução destes microrganismos depois da desinfecção, porém, para bactérias

heterotróficas a redução nas duas unidades, foi significativa com  $p < 0,001$  (Tabelas 5, 6 e 7).

As leveduras isoladas antes da desinfecção foram *C. humícola*, *R. glutinis*, *C. suecica* e *C. fluvitalis*. Sendo que *C. humícola* e *R. glutinis*, estavam presentes na sala de lavagem de reuso B (P10) e solução de diálise (P5), respectivamente, e foram isoladas somente na unidade A. *C. fluvitalis* e *C. suecica* foram isoladas na sala de lavagem de reuso B (P10), sendo que a *C. suecica* foi isolada em maior quantidade de amostras em P10, porém, as duas na unidade B.

*C. ciferrii* foi isolada só na unidade A e depois da desinfecção. Enquanto *C. laurentii* e *R. rubra* foram encontradas nas unidades A e B, antes e depois da desinfecção.

*Aureobasidium* sp, foi isolado na unidade B, antes e depois da desinfecção.

Das 19 cepas de *P. aeruginosa* isoladas, 57,90% (11/19) foram de amostras coletadas na unidade A antes da desinfecção, e 10,52% (2/19) na unidade B. *P. aeruginosa* estava presente antes e depois da desinfecção nas duas unidades, sendo que 15,78% (3/19) foram isoladas na unidade A e 15,78% (3/19) na unidade B depois da desinfecção.

**Tabela 5.** Presença de leveduras antes e depois da desinfecção do sistema de tratamento da água de diálise por osmose reversa, nas duas unidades de hemodiálise

| Leveduras | Leveduras isoladas nas unidades A e B antes e depois da desinfecção |          |          |          | Total | X <sup>2</sup> | p     |
|-----------|---|----------|----------|----------|-------|----------------|-------|
|           | AD*   |          | DD**     |          |       |                |       |
|           | Ausência  | Presença | Ausência | Presença |       |                |       |
| Total     | 87  | 18       | 41       | 7        | 153   | 0,16           | 0,691 |

**Tabela 6.** Presença de *P. aeruginosa* antes e depois da desinfecção do sistema de tratamento da água de diálise por osmose reversa, nas duas unidades de hemodiálise

| <i>P. aeruginosa</i> | <i>P. aeruginosa</i> nas unidades A e B antes e depois da desinfecção |          |          |          | Total | X <sup>2</sup> | p     |
|----------------------|---|----------|----------|----------|-------|----------------|-------|
|                      | AD*   |          | DD**     |          |       |                |       |
|                      | Ausência  | Presença | Ausência | Presença |       |                |       |
| Total                | 92  | 13       | 42       | 6        | 153   | 0              | 0,983 |

\*AD = antes da desinfecção

\*\*DD = Depois da desinfecção

**Tabela 7.** Contagem de bactérias heterotróficas, abaixo e acima de 200UFC/mL antes e depois da desinfecção do sistema de tratamento da água de diálise por osmose reversa, nas duas unidades de hemodiálise

| BH*** | Bactérias heterotróficas em A e B antes e depois da desinfecção |            |            |            | Total | X <sup>2</sup> | p      |
|-------|---|------------|------------|------------|-------|----------------|--------|
|       | AD*   |            | DD**       |            |       |                |        |
|       | <200UFC/mL  | >200UFC/mL | <200UFC/mL | >200UFC/mL |       |                |        |
| 72h   |   |            |            |            |       |                |        |
| Total | 42  | 63         | 33         | 15         | 153   | 10,9           | <0,001 |

\*AD = antes da desinfecção

\*\*DD = Depois da desinfecção

\*\*\*BH = bactérias heterotróficas

Com relação às bactérias heterotróficas, antes da desinfecção foram analisadas 105 amostras, sendo que 60% (63/105) estavam em desacordo com a Resolução - RDC N°.154/2004, acima de 200UFC/mL. Destas 65,08% (41/63) da unidade A e 34,92% (22/63) da unidade B. Depois da desinfecção foram analisadas 48 amostras com 31,25% (15/48) apresentando contagem acima de 200 UFC/mL. Dessas 33,34% (5/15) da unidade A e 66,66% (10/15) da unidade B.

Com relação aos resultados obtidos para o estudo da sazonalidade as 2 unidades foram avaliadas em conjunto por não haver diferença significativa na qualidade da água durante o verão e o inverno nas 200 amostras analisadas.

## DISCUSSÃO

Leveduras e *Pseudomonas aeruginosa* são patógenos oportunistas. A presença desses microrganismos na água de hemodiálise pode representar riscos à saúde dos pacientes com insuficiência renal crônica. O gênero bacteriano mais isolado em águas tratadas para diálise, solução dialisadora e dialisato tem sido *Pseudomonas*<sup>5,21,13,19,3</sup>. Os fungos durante a última década surgiram como principal causa de infecções adquiridas em ambiente hospitalar<sup>2</sup>. Considerando-se as 200 amostras analisadas, o índice de contaminação por leveduras foi de 12,5% (25/200) e de *P aeruginosa* 9,5% (19/200).

As bactérias heterotróficas, por serem utilizadas como indicadores das condições higiênicas da água, foram analisadas com o objetivo de se estabelecer relação entre a sua contagem e a presença de leveduras e *Paeruginosa*.

O fato de se ter utilizado nesse estudo o meio R2A para a contagem de bactérias heterotróficas, que apresenta melhor desempenho na recuperação de células bacterianas injuriadas, pode ter interferido na análise desta relação com leveduras e *Paeruginosa*. O número de amostras com contagem de bactérias heterotróficas abaixo de 200 UFC/mL, poderia ter sido maior caso não se utilizasse o meio R2A; estaria assim, aprovando-se um maior número de amostras de água de diálise, baseados na contagem de bactérias heterotróficas abaixo de 200 UFC/mL com possibilidade de estarem contaminadas por leveduras e/ou *Paeruginosa*. Linde et al.<sup>16</sup> comparando o desempenho do R2A com o TSA e com período de incubação de até 10 dias à temperatura de 25°C ± 2°C, verificou que a contagem de colônias no R2A foi significativamente maior que no TSA, tanto para solução de diálise como para as amostras de água tratada por osmose reversa. Concluiu que haveria uma discordância nos resultados de contagens de 16% quando se utilizasse o TSA, e de 3% se utilizasse o R2A.

Para ser considerada eficaz a desinfecção nos reservatórios, tubulações e máquinas deve ser realizada a um só tempo, utilizando solução germicida química específica.

A desinfecção que ocorre mensalmente em todo o sistema de osmose reversa, reduziu significativamente as bactérias heterotróficas, porém, leveduras e *P. aeruginosa*, não

apresentaram redução pela desinfecção. Sabe-se que estes microrganismos podem estar envolvidos na formação de biofilmes, tornando-se mais resistentes às desinfecções<sup>9, 10</sup>.

O ponto mais vulnerável do pré-tratamento em termos de contaminação é o filtro de carvão, que se satura pela adsorção de partículas orgânicas e de microrganismos, podendo ser foco de multiplicação desses assim como de algas. Sua troca deve ser periódica<sup>20</sup>. Nesse estudo fizemos 11 coletas deste ponto e observamos que 81,8% (9/11), apresentaram contagem de bactérias heterotróficas acima de 500UFC/mL.

A qualidade da água sofre modificações de acordo com as estações do ano, portanto as variações sazonais representam um dos fatores que influenciam no tratamento da água<sup>21</sup>.

Em nosso estudo apesar da sazonalidade não ter influenciado na quantidade de microrganismos, influenciou na diversidade da microbiota fúngica.

No verão foram quatro espécies de origem ambiental: *C. suecica*, *C. fluvitalis*, *C. ciferrii* e *Aureobasidium* sp. No inverno foram cinco espécies de origem ambiental e humana: *C. humícola*, *R. glutinis*, *C. laurentii*, *R. rubra* e *Aureobasidium* sp.

Os parâmetros físico-químicos forneceram subsídios importantes para a avaliação do trabalho das membranas da osmose reversa.

A exposição dos pacientes em hemodiálise a endotoxinas, por um longo período de tempo, pode acarretar respostas inflamatórias crônicas<sup>1</sup>. A incidência de reações pirogênicas pode ocorrer quanto maior for a contagem de colônias de bactérias heterotróficas na solução de diálise<sup>20</sup>. Baseados na Resolução a RDC N°.154/2004, que estabelece para endotoxinas bacterianas o limite de até 2 EU/mL, tivemos duas amostras em desacordo na unidade A durante o verão.

Oie et al.<sup>17</sup> sugerem que a máquina de hemodiálise é a principal fonte de contaminação da água.

Neste estudo estabeleceu-se a coleta da solução de diálise (P5), ponto que mostra a qualidade de água que entrará em contato com o sangue do paciente, formada pela água tratada de diálise mais a solução dialisadora. Este ponto revela as condições microbiológicas da máquina, pois ao analisarmos o ponto em que a água entra na máquina (P4) e o ponto antes da entrada no dialisador (P5), numa mesma coleta, estamos avaliando o percurso da água dentro da máquina de diálise. Com os resultados obtidos verificou-se, na maioria das coletas, que o (P5) apresentou maior contaminação em relação à (P4), para leveduras, *Paeruginosa* e bactérias heterotróficas nas duas unidades estudadas. (Tabela 3).

Com base nos resultados desta pesquisa propõe-se aos órgãos oficiais de controle a inclusão de novas medidas para melhorar o monitoramento da qualidade da água de hemodiálise com análises microbiológicas dos pontos: entrada da máquina, entrada do dialisador, "loop", reuso B, reuso C e reservatório da osmose reversa e pesquisas de leveduras e *Paeruginosa* nos diversos pontos de controle do sistema de hemodiálise.



## CONCLUSÕES

- Leveduras e *Pseudomonas aeruginosa* foram isoladas em 25 e 19 amostras, respectivamente, enquanto 88 amostras apresentaram contagem de bactérias heterotróficas em desacordo com a legislação vigente.
- A desinfecção do sistema de hemodiálise não apresentou a mesma eficácia para leveduras e *P.aeruginosa* como apresentou para bactérias heterotróficas
- A sazonalidade não influenciou na quantidade dos microrganismos isolados, porém, na diversidade da microbiota fúngica.
- As cepas de leveduras isoladas são de origem humana e ambiental.
- As membranas da osmose reversa foram 100% eficazes na redução dos íons sulfatos, nitratos e fluoretos e 66,67% com relação a condutividade.

## AGRADECIMENTOS

À Vigilância Sanitária de Piracicaba, representada na pessoa do Engenheiro Flávio Bush, pelo auxílio prestado durante as coletas.

## REFERÊNCIAS

1. Amato, R.L. Water Treatment for Hemodialysis, Including the Latest AMMI Standards. **J Nephrol Nurs**, 28:612-9,2001.
2. Arvanitidou, M. et al. High level of recovery of fungi from water and dialysate in haemodialysis units. **J. Hospital Infection**, 45: 225-30, 2000
3. Arvanitidou, M et al. Occurrence and antimicrobial resistance of Gram-negative bacteria isolated in haemodialysis water and dialysate of renal units: results of a Greek multicentre study. **J. Applied Microbiology**, 95:180-5, 2003.
4. Azevedo, S.M et al. Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru-Brazil. **Toxicology**, 182: 441-446,2002.
5. Bambauer, R. et al. Contamination of dialysis water and dialysate. A survey of 30 centers. **ASAIO J.**, 40: 1012-6,1994.
6. Brasil, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução Diretoria Colegiada Nº154, - **Diário Oficial da União**, de 17 de junho de 2004, Brasília; Seção 1, p.65-9.
7. Brasil, Portaria Nº 518, de março de 2004, Gabinete do Ministro – Ministério Da Saúde, **Diário Oficial da União**, Brasília nº 59 de 26/03/2004, Seção 1, pág. 266 –70
8. Brem, A. Fungal peritonitis in patient on continuous ambulatory peritoneal dialysis. **Europ. J.Clin.Microbio.Infect.Disease**, 17: 839-43, 1998
9. Cappelli, G. et al. Biofilms invade nephrology: effects in hemodialysis. **J. Blood Purif**, 18(3):224-30, 2000.
10. Capelli, G. et al. C. Effects of biofilm formation on haemodialysis monitor disinfection. **J. Nephrol Dial Transplant**, 18(10): 2105-11, 2003.
11. Center For disease Control & Prevention, USA e World Health Organization, Geneva, Switzerland. **Epi Info 6**, 1994; version 6.02.
12. Eaton, A.D. et al. Standard Methods for Examination of Water and Wastewater, Washington, DC. (APHA). 19<sup>th</sup> ed., 1995.
13. Favero, M.S. et al.. Dialysis-associated infections and their control. **J. Hospital Infection**, 24: 357-78,1998.
14. Instituto Adolfo Lutz. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. Métodos Químicos e Físico para Análise de Alimentos. São Paulo. 3<sup>a</sup>.ed., Sulfato e Nitrato, 1985; V.1, p.302-30.
15. Kurtzman, C.P. e Fell, J.W.. **The yeasts: a taxonomic study**, New York, 1998.
16. Linde, K. et al. Improved bacteriological surveillance of haemodialysis fluids: a comparison between Tryptic soy agar and Reasoner's 2A media. **Nephrol Dial Transplant**, 14: 2433-7, 1999.
17. Oie, S. et al. Microbial contamination of dialysate and its prevention in haemodialysis units. **J. Hospital Infection**, 54:115-9, 2003.
18. Palleroni, N.J. Genus I – *Pseudomonas*. **Bergey's Manual of systematic bacteriology**. Baltimore: William & Wilkins, 1986, p.141-99.
19. Pisan, B. et al. Surto de bacteriemia por *Pseudomonas aeruginosa* na Unidade de Hemodiálise de um hospital de Campinas, São Paulo, Brasil. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 59(1/2): 51-6, 2000.
20. São Paulo, Secretaria de Estado da Saúde, Centro de Vigilância. **Roteiro de Inspeção da Vigilância Sanitária de Serviços de Terapia renal Substitutiva**, 1997.
21. Silva, A.M.M. et al. Revisão/Atualização em Diálise: Água para hemodiálise. **J. Bras. Nefrol.** 18 (2):180-8,1996.
22. Teixeira, P et al.. Evaluation Of Survival Patterns And Cellular Injury Of *Pseudomonas aeruginosa* In Different Bottled Waters Stored Under Various Conditions. **J. Food Safety**. 21: 167-80, 2001.
23. USA, Pharmacopeia, USP XXIV, Rockville, Twinbrook Parkway, Bacterial Endotoxins Test, 1995; 24:1829-30.

# Surtos de doenças transmitidas por alimentos contaminados por *Staphylococcus aureus*, ocorridos no período de dezembro de 2001 a abril de 2003, na região de São José do Rio Preto - SP

Foodborne disease outbreaks caused by *Staphylococcus aureus*, in region of São José do Rio Preto - SP, during the period from December 2001 to April 2003

RIALA6/1002

Jacqueline Tanury Macruz PERESI<sup>1,2\*</sup>; Ivete Aparecida Zago Castanheira de ALMEIDA<sup>1</sup>; Inara Siqueira de Carvalho TEIXEIRA<sup>1</sup>; Sonia Izaura de LIMA<sup>1</sup>; Fátima Aparecida CARNICEL<sup>2</sup>; Fernando Leite HOFFMANN<sup>3</sup>

\* Endereço para correspondência: <sup>1</sup>. Instituto Adolfo Lutz - Laboratório I de São José do Rio Preto - SP. - Rua: Alberto Sufredine Bertoni n° 2325 - São José do Rio Preto - SP - CEP.: 15060 - 020.

<sup>2</sup>. Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos - Universidade Estadual Paulista - UNESP - São José do Rio Preto - SP.

<sup>3</sup>. Professor Doutor - Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos - Universidade Estadual Paulista - UNESP - São José do Rio Preto - SP.

Recebido: 12/02/2004 – Aceito para publicação: 10/11/2004

## RESUMO

Os surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) constituem um dos mais amplos problemas do mundo contemporâneo. Dentre eles, a intoxicação estafilocócica é uma doença comum, cuja verdadeira incidência é desconhecida em muitos países. Este estudo teve como objetivo relatar surtos de DTA, confirmados laboratorialmente, envolvendo *Staphylococcus aureus*, ocorridos na região de São José do Rio Preto - SP no período de dezembro de 2001 a abril de 2003. Foram investigados 08 surtos por meio de análises bacteriológicas e de inquéritos epidemiológicos. Desses, 04 (50%) foram confirmados laboratorialmente e *Staphylococcus aureus* foi o agente envolvido na totalidade deles. Os produtos de confeitaria, como doces e salgados, foram os alimentos implicados. Segundo os inquéritos epidemiológicos, o número total de indivíduos afetados foi 52 (sendo 13 a média de pessoas por surto) e de hospitalizados 07 (13,5%). A mediana do período de incubação variou de 30 minutos a 3 horas. Vômito e diarreia foram os sintomas comuns e prevalentes na totalidade dos surtos, sendo, ainda, observada a presença de febre em 03 (75%) deles. O estudo dessas enfermidades é de extrema importância, gerando subsídios aos órgãos de saúde pública para tomada de medidas de prevenção e controle dos riscos relacionados às práticas de fabricação e conservação de alimentos, visando a redução de ocorrência de doenças transmitidas por alimentos.

**Palavras-Chave.** *Staphylococcus aureus*, intoxicação estafilocócica, doenças transmitidas por alimentos.

## ABSTRACT

Foodborne disease outbreaks have been considered one of the most widespread problem of the contemporary world. Staphylococcal intoxication has been one of the common disease, which the actual occurrence in many countries has still been unknown. The aim of this study was to report the occurrence of *Staphylococcus aureus* associated foodborne disease outbreaks confirmed by means of laboratory methodologies, in the region of São José do Rio Preto, SP from December 2001 to April 2003. Eight outbreaks were analyzed by means of epidemiological inquiry and bacteriological methods. Of them only 50% were confirmed by means of laboratory examination, and *Staphylococcus aureus* was identified in all of them. Bakery products, such as candies and other groceries were the target products. According to the data from epidemiological inquiries, the total number of affected individuals was 52 (being 13 the average of affected persons per outbreak), and seven were hospitalized (13,5%). The median incubation periods ranged from 30 minutes to 3 hours. Diarrhea and vomit were the most common

and prevalent symptoms in all outbreaks, and fever was also observed in three (75%) of them. Investigations on foodborne disease outbreak have been valuable as for they generate assistance support to public health organizations, in order to take steps towards prevention and control measures regarding to food production and storage practices for minimizing the occurrence of foodborne disease.

**Key Words.** *Staphylococcus aureus*, foodborne disease outbreaks, staphylococcal intoxication.

---

## INTRODUÇÃO

Os alimentos são passíveis de contaminação por diferentes agentes etiológicos, que podem levar ao desenvolvimento de diversas enfermidades. Entretanto, dentre os microrganismos, as bactérias são as principais promotoras de doenças transmitidas por alimentos (DTA)<sup>19</sup>, responsáveis por mais de 90% dessas ocorrências<sup>3</sup>. Estas são resultantes de um sistema complexo do qual tomam parte o agente causador, o veículo e o hospedeiro, formando a cadeia de infecção, que é influenciada por fatores internos e externos de diversas naturezas<sup>28</sup>.

As DTA de origem bacteriana são prevalentes no Brasil e no mundo, podendo ocorrer sob a forma de surto ou individualmente. A contaminação de alimentos por bactérias representa um sério problema de segurança alimentar, onde apenas pequeno percentual das ocorrências chega ao conhecimento das instituições que investigam estas doenças, o que prejudica a qualidade da informação epidemiológica. No entanto, quando ocorre uma DTA, é possível identificar o agente e os motivos que levaram o alimento a tornar - se potencialmente capaz de provocar um agravo à saúde, por meio de estudos epidemiológicos e laboratoriais<sup>23</sup>.

Nos Estados Unidos, são estimados 76 milhões de casos de doenças, 323 mil hospitalizações e 5.000 mortes por ano<sup>15</sup>. O gasto anual estimado entre o custo médico e a perda de produtividade está entre cinco e seis bilhões de dólares<sup>1</sup>.

Dentre as DTA, a intoxicação estafilocócica é uma doença comum<sup>18</sup>, causada pela ingestão de toxinas pré - formadas no alimento, a partir de um nível de contaminação por *S. aureus* de 10<sup>5</sup> unidades formadoras de colônias por grama (UFC/g)<sup>9</sup>. O período de incubação de um surto varia, geralmente, de 30 minutos a oito horas, sendo a média de duas a quatro horas após a ingestão do alimento contaminado<sup>10</sup>.

Náuseas, vômitos, câimbras abdominais, geralmente bem dolorosas, diarreia e sudorese são os principais sintomas<sup>10</sup>, podendo ser bastante agudos, dependendo da suscetibilidade individual à toxina, da quantidade do alimento ingerido, da concentração de toxina no alimento e das condições de saúde da pessoa<sup>9</sup>.

Os alimentos que requerem manipulação considerável durante a preparação e que são mantidos em temperaturas ligeiramente elevadas são aqueles frequentemente envolvidos em DTA por *S. aureus*<sup>9</sup>.

Ainda que os sistemas de notificação tenham evoluído e modernizado, os surtos alimentares são subnotificados em todos os países. A estimativa de casos não notificados está em torno de 95-99%<sup>17</sup>. Isso deve - se, principalmente, à elevada frequência de casos auto-limitantes, em que as vítimas não procuram assistência médica, impossibilitando a identificação destes agentes etiológicos<sup>6</sup>.

Em nosso país, existem ainda poucos dados epidemiológicos envolvendo surtos de DTA. Informações sobre ocorrências de intoxicações estafilocócicas limitam - se a poucos relatos na literatura.<sup>7,8,12,14,16,19,20,21,25,26</sup>

Embora nos serviços de saúde existam poucos registros de surtos de DTA, supõe - se que a ocorrência seja grande, visto a precariedade de saneamento básico em nosso meio, bem como a falta de noções básicas de higiene no ciclo produtivo dos alimentos, além da deficiência nas notificações de doenças<sup>8</sup>.

A verdadeira incidência das intoxicações estafilocócicas é desconhecida em muitos países. A maioria dos casos passa despercebida devido a sua curta duração, sendo notificados às autoridades públicas, somente os surtos com envolvimento de um grande número de indivíduos<sup>27</sup>.

Considerando que ainda são escassas as publicações de investigação de DTA no Brasil, esse estudo teve como objetivo relatar a ocorrência de surtos confirmados laboratorialmente, envolvendo *S. aureus*, ocorridos na região de São José do Rio Preto - SP, no período de dezembro de 2001 a abril de 2003.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Amostras dos alimentos

Durante o período de dezembro de 2001 a abril de 2003, foram analisadas no Laboratório de Microbiologia Alimentar do Instituto Adolfo Lutz - Lab. I de São José do Rio Preto - SP, um total de 22 amostras de alimentos referentes à 08 surtos ocorridos na região de São José do Rio Preto - SP. Entretanto, em apenas 04 (50%) surtos, objeto deste estudo, houve comprovação laboratorial, tendo sido identificados, dentre as 10 amostras analisadas envolvidas, o alimento veiculador e o agente etiológico incriminado de cada ocorrência.

Os produtos coletados para análise incluíam aqueles indicados pelos órgãos de vigilância como os principais

veículos dos surtos e, quando disponíveis, amostras de outros alimentos que faziam parte da refeição incriminada.

dezembro de 2001 a abril de 2003 na região de São José do Rio Preto - SP.

### Coleta e transporte das amostras

As amostras foram coletadas, assepticamente, por órgãos de vigilância sanitária pertencentes à região de São José do Rio Preto - SP, em quantidade variável em função do que se encontrava disponível, empregando - se embalagens do próprio estabelecimento ou sacos plásticos de primeiro uso. As amostras foram transportadas em recipiente isotérmico contendo gelo reciclável, sendo mantidas no laboratório sob refrigeração, até o momento da realização das análises<sup>13</sup>.

### Preparo das amostras e análises bacteriológicas

De acordo com a metodologia descrita na American Public Health Association (APHA)<sup>2</sup> (2001), procedeu - se ao preparo das amostras e às seguintes análises: contagem de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Clostridium perfringens*; Número Mais Provável (NMP) de coliformes fecais e presença/ausência de *Salmonella* spp.

### Inquérito epidemiológico e análise dos surtos

As investigações foram realizadas por órgãos municipais de vigilância, por meio de aplicação de questionários, visando a obtenção de informações quanto ao número de expostos/afetados/hospitalizados, período de incubação, sintomas e alimentos consumidos.

As informações analisadas foram obtidas na ocasião dos inquéritos epidemiológicos dos surtos de DTA, confirmados laboratorialmente, ocorridos no período de

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises referentes aos resultados obtidos na elucidação dos surtos de DTA ocorridos na região de São José do Rio Preto - SP estão apresentadas nas Tabelas 1, 2 e 3.

A Tabela 1 apresenta os produtos analisados e os resultados bacteriológicos, por surto elucidado.

Dos 04 surtos elucidados laboratorialmente, *S. aureus* foi isolado, a partir dos alimentos veiculadores, em quantidade igual ou superior a 10<sup>6</sup> UFC/g, suficiente para desencadear a produção de enterotoxina e a intoxicação estafilocócica. A classe de alimento envolvida nos surtos foi, predominantemente, os produtos de confeitaria, incluindo doces e salgados.

Entre as fontes de contaminação de *S. aureus* são considerados como principal na ocorrência de surtos de DTA causados por este microrganismo, os manipuladores de alimentos, portadores de cepas enterotoxigênicas<sup>4,5,24</sup>, sendo as fossas nasais o principal reservatório. A presença nas mãos e em outras superfícies isentas de lesões resulta da disseminação por contato com áreas de habitat natural do microrganismo. Portanto, a maior freqüência dos surtos resulta, sobremaneira, da contaminação através de manipuladores que apresentam algum tipo de lesão estafilocócica na pele<sup>22</sup>.

Tal fato foi observado no surto 04, onde, segundo informações obtidas na ocasião, o manipulador não utilizava luvas e apresentava ferimento purulento na região dorsal da

**Tabela 1.** Resultados bacteriológicos dos produtos analisados, por surto elucidado

| Surto Nº | Alimentos analisados   | Coliformes fecais NMP/g | <i>Staphylococcus aureus</i> UFC/g | <i>Bacillus cereus</i> UFC/g | <i>Clostridium perfringens</i> UFC/g | <i>Salmonella</i> Presença/ausência em 25g |
|----------|--|-------------------------|------------------------------------|------------------------------|--------------------------------------|--|
| 01       | Pastel frito com recheio à base de frango, catupiri e palmito* | 42                      | 1,0x10 <sup>8</sup>                | -                            | -                                    | Ausência                                   |
|          | Recheio à base de frango e catupiri                            | 120                     | 4,1x10 <sup>8</sup>                | -                            | -                                    | Ausência                                   |
|          | Recheio à base de palmito                                      | < 1                     | 3,3x10 <sup>3</sup>                | -                            | -                                    | Ausência                                   |
|          | Maionese industrializada                                       | < 1                     | -                                  | -                            | -                                    | Ausência                                   |
|          | Requeijão cremoso  | < 1                     | -                                  | -                            | -                                    | Ausência                                   |
| 02       | Bolo confeitado*   | 120                     | 9,4x10 <sup>8</sup>                | -                            | -                                    | Ausência                                   |
| 03       | Bolo recheado e confeitado*                                    | > 2400                  | 1,6x10 <sup>7</sup>                | -                            | -                                    | Ausência                                   |
| 04       | Coxinha frita*   | 240                     | 1,8x10 <sup>6</sup>                | -                            | -                                    | Ausência                                   |
|          | Massa para coxinha   | 40                      | 3,9x10 <sup>6</sup>                | -                            | -                                    | Ausência                                   |
|          | Recheio para coxinha à base de frango                          | 1,1                     | 1,5x10 <sup>5</sup>                | -                            | -                                    | Ausência                                   |

(NMP/g) Número mais provável por grama; (UFC/g) Unidade formadora de colônia por grama

(-) Contagem bacteriana menor que 5,0x10 UFC/g; (\*) Alimento veiculador

mão direita, originário de prévia queimadura, sendo esta considerada a provável fonte de contaminação da massa e do recheio da coxinha por *S. aureus*.

De maneira enfática, os estudos de rastreamento epidemiológico da intoxicação estafilocócica apontam o manipulador de alimentos como elemento incisivo no processo de disseminação do microrganismo. Isso pode ser explicado pelo fato de que os surtos são resultantes de contaminação e multiplicação do microrganismo no alimento, após este ter sido submetido a tratamento térmico, propiciando assim, com a redução ou a eliminação da microbiota presente, a produção de enterotoxinas<sup>3</sup>.

As práticas de higiene inadequadas ou inexistentes no preparo de alimentos e a manutenção dos mesmos por longo período de tempo em temperaturas impróprias possibilitam uma intensa proliferação do microrganismo com a liberação de toxinas, até alcançar níveis capazes de provocar a intoxicação<sup>5,28</sup>.

Como a toxina estafilocócica é termoestável, não é inativada por regimes de cocção padrão<sup>9</sup>, o que pode explicar o envolvimento de produtos de confeitaria salgados (pastel e coxinha fritos) que, no presente estudo, apresentaram elevada contaminação por *S. aureus*, indicando a possibilidade de produção de toxinas estafilocócicas. O processo de fritura utilizado foi insuficiente até para a eliminação da bactéria, termosensível, presente tanto nos recheios de frango do pastel e da coxinha, como na massa desta última. Por isso, evitando a contaminação do alimento pelo microrganismo, nas etapas de

produção e pós processamento e mantendo - o a baixas temperaturas, a carga microbiana pode ser limitada, impedindo a produção da toxina<sup>9</sup>.

No caso dos bolos, a contaminação encontrada através das análises microbiológicas, provavelmente, deu-se no momento da produção ou manipulação do recheio e/ou cobertura. Segundo informações da equipe de Vigilância Sanitária, o bolo referente ao surto número 03, foi mantido à temperatura ambiente durante muitas horas antes de ser servido, devendo tal fato ter ocorrido também com a amostra do surto número 02.

Passos & Kuaye<sup>19</sup> avaliaram 53 surtos alimentares no município de Campinas - SP entre 1987 e 1993. *S. aureus* foi responsável por 31,6% do total das ocorrências, sendo os bolos recheados, as maioneses e as massas os principais alimentos implicados nas intoxicações.

Estudo realizado por Passos & Kuaye<sup>20</sup> também descreveu um surto de intoxicação estafilocócica que envolveu 50 pessoas em Santa Bárbara do Oeste - SP, em 1994. O alimento envolvido foi um bolo recheado com doce de leite e ameixas e recoberto com glacê e côco, contaminado por *S. aureus* em nível de  $2,9 \times 10^9$  UFC/g. A higiene inadequada dos manipuladores, aliada à manutenção do bolo em temperatura ambiente por mais de 8 horas, permitindo a proliferação do microrganismo, foram os fatores contribuintes.

Em estudo realizado por Nervino<sup>16</sup>, *S. aureus* foi o agente etiológico responsável por 48,0% dos surtos no Estado do Paraná no período de janeiro de 1996 a abril de 1997, sendo

**Tabela 2.** Número de pessoas afetadas/hospitalizadas e mediana do período de incubação, por surto elucidado

| Surto<br>Nº | Afetados<br>Nº | Hospitalizados |      | Mediana do período<br>de incubação |
|-------------|----------------|----------------|------|------------------------------------|
|             |                | Nº             | %    |                                    |
| 01          | 18             | 02             | 11,1 | 3 horas                            |
| 02          | 04             | 03             | 75,0 | 30 minutos                         |
| 03          | 17             | 00             | 0,0  | 50 minutos                         |
| 04          | 13             | 02             | 15,4 | 2 horas e 30 minutos               |
| Total       | 52             | 07             | 13,5 | -                                  |

**Tabela 3.** Frequência percentual dos sintomas relatados, por surto elucidado

| SINTOMAS               | Frequência percentual por surto |       |       |       |
|------------------------|---------------------------------|-------|-------|-------|
|                        | Número do surto                 |       |       |       |
|                        | 01                              | 02    | 03    | 04    |
| Náuseas                | 38,9                            | 75,0  | -     | 100,0 |
| Vômitos                | 94,4                            | 75,0  | 100,0 | 100,0 |
| Cólicas                | 27,8                            | -     | -     | 83,3  |
| Diarréia aquosa        | 94,4                            | 100,0 | 100,0 | 100,0 |
| Febre                  | 5,6                             | 100,0 | -     | 16,7  |
| Cefaléia               | -                               | -     | -     | 16,7  |
| Desmaio                | -                               | 50,0  | -     | -     |
| Afetados entrevistados | 100,0                           | 100,0 | 35,3  | 46,2  |

Legenda: (-) Ausência do sintoma.

isolado, principalmente, de bolos recheados, queijos, massas e arroz temperado.

Fernandez et al.<sup>8</sup> em estudo de ocorrência de DTA na cidade do Rio de Janeiro - RJ durante o ano de 2000, verificaram que *S. aureus* foi o microrganismo mais freqüente, sendo responsável por 13,0% dos surtos.

No período de janeiro de 1999 a junho de 2002, Gelli et al.<sup>11</sup> determinaram o agente causal, bem como o alimento veiculador de surtos de DTA elucidados nos Laboratórios de Saúde Pública do Estado de São Paulo. *S. aureus* foi o principal patógeno incriminado, correspondendo a 51,3% dos surtos.

Eduardo et al.<sup>7</sup> em estudos de surtos de DTA notificados à Divisão de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar do Centro de Vigilância Epidemiológica do Estado de São Paulo, revelaram que dentre os ocasionados por bactérias (24,6%), *S. aureus*, juntamente com *B. cereus* e *C. perfringens* representaram 13,2% das ocorrências. Os ocasionados por *S. aureus* foram associados à bolos, patês de carnes, massas, doces e outros alimentos preparados com molhos.

Em relação aos locais de preparo dos alimentos envolvidos nos surtos de DTA, neste estudo observou-se a ocorrência de um único episódio em cada um dos seguintes estabelecimentos: padaria, confeitaria e lanchonete, correspondendo a 25,0% cada.

Passos e Kuaye<sup>19</sup> observaram o seguinte percentual em relação aos locais de preparo dos alimentos envolvidos em surtos de DTA em Campinas - SP, no período de 1987 a 1993: restaurante de coletividade (52,6%); serviços de nutrição e dietética hospitalares (10,5%); restaurantes comerciais (10,5%); residências (15,8%) e padarias/confeitarias (10,5%).

Os estudos realizados por Fernandez et al.<sup>8</sup> revelaram a ocorrência de surtos, principalmente, em restaurantes e similares (34,0%), residências (24,5%), hospitais, creches e escolas (18,9%), padarias e confeitarias (7,5%) e instituições públicas (7,5%).

A Tabela 2 mostra o número de pessoas afetadas, hospitalizadas, bem como a mediana do período de incubação, por surto elucidado.

De acordo com dados fornecidos por órgãos responsáveis pela coleta dos alimentos, o número total de afetados foi 52 pessoas (sendo 13 a média por surto) e o de hospitalizados, 07 (13,5%). O percentual de hospitalização, por surto, variou de 0 a 75%. Em relação à mediana do período de incubação, observou-se, na totalidade dos surtos, o rápido aparecimento dos primeiros sintomas, variando de 30 minutos a 03 horas, provavelmente em decorrência da ingestão de grande quantidade de toxina estafilocócica.

A Tabela 3 apresenta a freqüência percentual dos sintomas relatados, por surto elucidado.

Observou-se que vômito e diarreia foram os sintomas comuns e prevalentes nos 04 surtos elucidados. A febre, apesar de sua rara ocorrência em surtos por essa etiologia e do baixo percentual de acometimento entre os afetados nos surtos elucidados, esteve presente em 03 (75%) deles. Tal fato,

provavelmente, está relacionado à grande quantidade de toxina ingerida<sup>10</sup>.

No surto 02, ainda foram relatados, no inquérito coletivo, dois casos de desmaio, ocorridos em crianças de 08 e 10 anos, naturalmente suscetíveis a quadros clínicos mais graves.

A análise da sintomatologia e do período de incubação, associada às elevadas contagens de *S. aureus* nos alimentos analisados, revelaram este microrganismo como o agente etiológico envolvido nos 04 surtos elucidados laboratorialmente, no período estudado.

## CONCLUSÕES

O relato dos surtos de DTA elucidados laboratorialmente, ocorridos na região de São José do Rio Preto - SP no período de dezembro de 2001 a abril de 2003, mostrou o importante papel do Laboratório de Saúde Pública em relação a um agravamento, considerado de grande impacto em âmbito mundial, porém subnotificado tanto em países desenvolvidos como nos em desenvolvimento, comprometendo assim, o estudo epidemiológico das DTA.

Os resultados obtidos contribuem com a disseminação de informações, gerando subsídios aos órgãos de saúde pública para a obtenção de respostas adequadas, no atendimento aos doentes e na quebra da cadeia de transmissão, para a eliminação ou a redução dos riscos relacionados a essas ocorrências e para o aumento da segurança microbiológica dos alimentos.

## REFERÊNCIAS

1. Alterkruse, S. F.; Cohen, M. L.; Swerdlow, D. L. Perspective emergency foodborne diseases. **Emerging Infectious Diseases**, 3(4): 1-13, 1997.
2. American Public Health Association - APHA. **Compendium of methods for microbiological examination of foods**. 4. ed. Washington: Downes, F. P.; Ito, K., 2001. 676p.
3. Bergdoll, M. S. *Staphylococcus aureus*. In: Doyle, M. P. (ed.). **Foodborne bacterial pathogens**. New York: INC, 1989. p. 463-523.
4. Bryan, F. L. Factors that contribute to outbreaks of foodborne disease. **J. Food Prot.**, 41(10): 816-27, 1978.
5. Bryan, F. L. Risks of practices, procedures and processes that lead to outbreaks of foodborne diseases. **J. Food Prot.**, 51(8): 663-73, 1988.
6. Buchanan, R. L.; Deroever, C. M. Limits in assessing microbiological food safety. **J. Food Prot.**, 56(8): 725-9, 1993.
7. Eduardo, M. B. P.; Katsuya, E. M.; Bassit, N. P. Características dos surtos de doenças transmitidas por alimentos associados a restaurantes no Estado de São Paulo - 1999-2002. **Hig. Aliment.**, 17(104/105): 60-1, 2003.
8. Fernandez, A. T. et al. Ocorrência de surtos de doenças transmitidas por alimentos na cidade do Rio de Janeiro. **Hig. Aliment.**, 17(111): 58-63, 2003.
9. Forsythe, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2002. 424 p.
10. Franco, B. D. G. M.; Landgraf, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2003, 182 p.
11. Gelli, D. S. et al. Resultados de laboratórios de análise de alimentos responsáveis por brotes de enfermidades transmitidas por los alimentos en el estado de São Paulo, Brasil, Jan. 1999 - Junio, 2002. In: Congreso Latinoamericano de Microbiología e Higiene de Alimentos, 7, Santiago - Chile, **Anais**, 2002.

Peresi, J. T. M. et al. Surtos de doenças transmitidas por alimentos contaminados por *Staphylococcus aureus*, ocorridos no período de dezembro de 2001 a abril de 2003, na região de São José do Rio Preto - SP. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 63(2):232-7, 2004

12. Gilbert, R. J. et al. Serological detection of enterotoxin in foods implicated in staphylococcal food poisoning. **J. Hygiene**, 70(4): 755-62, 1972.
13. International Commission on Microbiological Specifications for Foods - ICMSF. **Microorganisms in foods: their significance and methods of enumeration**. 2. ed. Toronto: University of Toronto Press, v. 1, 1978. 434 p.
14. Karino, E. H. et al. Relato de um surto de intoxicação alimentar por *Staphylococcus aureus*, em Paranavaí - PR. **Hig. Aliment.**, 4(2): 102-5, 1985.
15. Mead, P. S. et al. Food – related illness and death in the United States. **Emerging Infectious Diseases**, 5(5): 607-25, 1999.
16. Nervino, C. V. **Relevância de *Staphylococcus aureus* e enterotoxinas na contaminação microbiana e nas doenças de origem alimentar, no Estado do Paraná**. Londrina - PR, 1997. [Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos - Universidade Estadual de Londrina].
17. Notermans, S.; Hoogenboom - Verdegal, A. M. N. Existing and emerging foodborne diseases. **Int. J. Food Microbiol.**, 15(3-4): 197-205, 1992.
18. Oliveira, T. C. R. M.; Hirooka, E. Y. Atualidades sobre a detecção de enterotoxinas estafilocócicas. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 30(2): 121-1, 1996.
19. Passos, M. H. C. R.; Kuaye, A. Y. Avaliação dos surtos de enfermidades transmitidas por alimentos comprovados laboratorialmente no município de Campinas - SP - no período de 1987 a 1993. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 56(1): 77-82, 1996.
20. Passos, M. H. C. R.; Kuaye, A. Y. Relato de surto de intoxicação alimentar provocada por consumo de bolo contaminado por *Staphylococcus aureus*. Importância da higiene dos manipuladores e condições de conservação do alimento na prevenção da doença. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 56(1): 71-6, 1996.
21. Pereira, M. L. et al. Intoxicação por *Staphylococcus aureus* provocada por queijo tipo “Minas”. **Rev. Microbiol.**, 22(4): 349-50, 1991.
22. Pereira, M. L. et al. Estafilococos e alimentos: possibilidades de disseminação através do portador humano e animal. **Hig. Aliment.**, 13(66/67): 48-55, 1999.
23. Pinto, A. T.; Bergmann, G. P. Fatores predisponentes da ocorrência de enfermidades transmitidas por alimentos. **Hig. Aliment.**, 17(104/105): 153-4, 2003.
24. Roberts, D. Factors contributing to outbreaks of food poisoning in England and Wales 1970 - 1979. **J. Hygiene**, 89(3): 491-8, 1982.
25. Sabioni, J. G.; Hirooka, E. Y.; Souza, M. L. R. Intoxicação alimentar por queijo Minas contaminado com *Staphylococcus aureus*. **Rev. de Saúde Pública**, 22(5): 458-61, 1988.
26. Sabioni, J. G.; Nascimento, D.; Pereira, J. L. Intoxicação estafilocócica causada por queijo Minas em Ouro Preto (MG), 1992. **Hig. Aliment.**, 8(33): 22-3, 1994.
27. Tranter, H. S. Foodborne staphylococcal illness. **Lancet**, 336(8722): 1044-6, 1990.
28. Uboldi Eiroa, M. N. Investigação de surtos de toxinfecção bacteriana causados por alimentos processados. **Col. ITAL**, 19(2): 101-12, 1989.

# Occurrence of *Salmonella* spp and *Escherichia coli* O157:H7 in raw meat marketed in São Paulo city, Brazil, and evaluation of its cold tolerance in ground beef

## Ocorrência de *Salmonella* spp e *Escherichia coli* O157:H7 em carnes cruas comercializadas na cidade de São Paulo, Brasil e tolerância a baixas temperaturas em carne moída

RIALA6/1003

Miyoko JAKABI<sup>1\*</sup>; Dilma Scala GELLI<sup>1</sup>; Christiane Asturiano RISTORI<sup>1</sup>; Ana Maria Ramalho DE PAULA<sup>1</sup>; Harumi SAKUMA<sup>1</sup>; Giselle Ibette S Lopez LOPES<sup>1</sup>; Sueli A. FERNANDES<sup>2</sup>; Renata B. LUCHESI<sup>3</sup>

\* Corresponding author: Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr. Arnaldo n° 355, Cerqueira César, 01246-902, São Paulo, S.P. Brasil. e-mail: mijakabi@ial.sp.gov.br

<sup>1</sup> Food Microbiology Laboratory

<sup>2</sup> Enteropathogens Laboratory

<sup>3</sup> Culture Medium Laboratory

### ABSTRACT

Among foodborne diseases, salmonellosis has been considered one of the major public health problems in many countries worldwide. *Escherichia coli* O157:H7 has been another important foodborne pathogen due to its increasing incidence as a human disease agent and its association with various kinds of foods, especially those from animal origin. Incidence of *Salmonella* spp. and *E. coli* O157:H7 in the raw meat (bovine, swine and chicken) marketed in São Paulo - Brazil was determined in 253 samples. Twenty-three samples (9.1%) were positive for *Salmonella* spp. Among these, 11 different serovars were identified, and *S. Enteritidis* was found to be the most prevalent. All the tested samples were negative for *E. coli* O157:H7. *Salmonella* Enteritidis (the predominant serovar) and *E. coli* O157:H7 were also tested for their cold-temperature sensitiveness in ground beef kept under refrigeration (4°C) for 120 days and under freezing (-18°C) for up to 90 days. *E. coli* O157:H7 inoculated into ground beef was more sensible to refrigeration and freezing temperatures than *S. Enteritidis*, but both maintained viability under freezing condition up to 90 days.

**Key Words.** *Salmonella* spp.; *Escherichia coli* O157:H7; raw meat; resistance; freezing; refrigeration; cold tolerance.

### RESUMO

Mundialmente, as salmoneloses são consideradas um grande problema de saúde pública. *Escherichia coli* O157:H7 é outro importante patógeno devido ao aumento da incidência de doenças em humanos e sua associação com vários tipos de alimentos, principalmente os de origem animal. Foi determinada a incidência de *Salmonella* spp. e *E. coli* O157:H7 em 253 amostras de carnes cruas (bovina, suína e de frango) comercializadas em São Paulo, Brasil. Vinte e três amostras (9,1%) foram positivas para *Salmonella* spp. Entre estas 11 diferentes sorovares foram identificados e *S. Enteritidis* foi o mais prevalente. Todas as amostras foram negativas para *E. coli* O157:H7. A sobrevivência de *S. Enteritidis* (o sorovar predominante) e *E. coli* O157:H7 foi avaliada em carne bovina moída mantida sob refrigeração (4°C) por 120 horas e congelamento (-18°C) por até 90 dias de armazenamento. *E. coli* O157:H7 foi mais sensível que a *S. Enteritidis* nas temperaturas de refrigeração e congelamento, mas os dois patógenos se mantiveram viáveis até 90 dias de estocagem sob congelamento.

**Palavras-Chave.** *Salmonella* spp.; *Escherichia coli* O157:H7; carne crua; resistência; congelamento, refrigeração.



## INTRODUCTION

Salmonellosis is considered a major public health problem in many countries worldwide. Many foods, particularly those of animal origin, are important vehicles for *Salmonella* transmission. Animal carriers have an important epidemiological role in salmonellosis, as the microorganism is continuously discharged into the environment through animal feces. Conditions associated with beef production, transportation to slaughterhouses, and meat processing may favor dissemination of pathogenic microorganisms. Inside processing plants and food preparation areas, several operations may also favor cross-contamination<sup>4</sup>. At the food preparation area, cross-contamination could occur if storage time and temperature conditions are abusive<sup>33</sup>.

Nowadays, *Salmonella* is one of the microorganisms most frequently involved in foodborne disease outbreaks<sup>2,24</sup>. Tavechio et al<sup>31</sup> reported that in S. Paulo, Brazil, between 1991 and 1995, *S. Enteritidis* was predominant from non human source. This serovar appeared in 1994 associated with foodborne disease outbreaks<sup>17</sup>. In 2000, in S. Paulo were notified 27(13,7%) outbreaks of foodborne diseases caused by *Salmonella* with 602(12,2%) cases<sup>6</sup>.

*E. coli* O157:H7 is another important foodborne pathogen because of its increasing incidence as a human disease agent and because of its association with various kinds of food, mainly those of animal origin, in many countries. Since 1982, when *E. coli* O157:H7 was first identified as a cause of foodborne illnesses in the United States, many outbreaks have been reported<sup>3,5,12</sup>.

This bacterium is an important pathogen in the USA, Europe, and Japan and in some South Hemisphere countries such as Argentina, Australia, Chile, and South Africa. In Argentina, *E. coli* O157:H7 has been associated with hemolytic uremic syndrome (HUS) patients and children presenting bloody diarrhea<sup>19</sup>. In S. Paulo, in 1990, one strain of *E. coli* O157:H7 was isolated from an AIDS patient presenting diarrheal disease. In 2001, two cases of *E. coli* O157:H7 illness were reported, both in Campinas, São Paulo State, in June and July<sup>15</sup>. However, the isolation of the pathogen as an agent responsible for outbreaks of foodborne diseases has not yet been reported<sup>7</sup>.

It is now recognized that refrigeration is not sufficient to avoid the growth of a number of foodborne pathogens, including enterohemorrhagic *E. coli*.

The purpose of this study was to verify the incidence of *Salmonella* spp. and *E. coli* O157:H7 in the raw meat marketed in S. Paulo city, Brazil, and to test the most frequent serovars of *Salmonella* and *E. coli* O157:H7 for their cold resistance in ground beef under refrigeration and freezing.

## MATERIAL AND METHODS

### Samples

There was a total of 253 samples of raw meat (bovine,

swine and chicken) purchased at local supermarkets in São Paulo, Brazil. Samples were placed into plastic bags, and transported under refrigeration to the Food Microbiology Laboratory of Instituto Adolfo Lutz, in São Paulo, Brazil.

### Isolation and Identification of *Salmonella*.

Conventional methods were used, as recommended by ISO<sup>16</sup>, although there was some modification in the incubation temperature of selenite cystine broth.

Pieces of beef, pork, and chicken meat were analyzed through homogenization technique and chicken carcasses through rinsing.

Pre-enrichment was performed by incubating buffered peptone water (BPW) overnight at 35°C. Selective enrichment was performed using selenite cystine (SC) and modified Rappaport-Vassiliadis (RV) broth incubated at 42°C/24-48h<sup>14</sup>. Each enrichment broth was streaked onto selective agar plates: *Salmonella-Shigella* agar (SS), brilliant green agar (BGA) and bismuth sulfite agar (BSA), and incubated for 24h at 35°C (SS and BGA) and for 48h at 35°C (BSA). Typical colonies from each plate were biochemically tested using Instituto Adolfo Lutz presumptive medium (IAL), developed for Enterobacteriaceae characterization<sup>25</sup>, incubated for 24h at 35°C, and serologically tested using polyvalent somatic and flagellar antisera produced by the Bacteriology Laboratory of Instituto Adolfo Lutz. The positive strains were sent to that Laboratory for complete serotyping<sup>26</sup>.

### Isolation and Identification of *E. coli* O157:H7

Conventional methods were used, as recommended by the American Public Health Association (APHA)<sup>13</sup>, including the step of resuscitation<sup>21,33</sup>.

Meat samples were homogenized with BPW and incubated at 35°C for 6h. Each sample was plated onto MacConkey-sorbitol agar and incubated at 35°C for 24h. At least three colonies were subjected to biochemical and serological tests.

### Evaluation of refrigeration and freezing effects on *Salmonella* Enteritidis and *E. coli* O157:H7 inoculated in ground beef.

### Samples

Samples of ground beef were purchased at local supermarkets in São Paulo, Brazil.

### Strains

*Salmonella* Enteritidis was isolated in the Food Microbiology Laboratory of Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brazil, from food involved in foodborne disease outbreaks.

*E. coli* O157:H7 IAL 1848 was obtained from the Culture Collection Laboratory at the same Institute.

### Preparation of cultures/Sample contamination

*S. Enteritidis* and *E. coli* O157:H7 strain were cultivated in Brain Heart Infusion (BHI) at 35°C for 18-24 hours, and after incubation, serial dilutions until 10<sup>-4</sup> were made in BPW, and

4,5 mL of this dilution was inoculated into 450g of ground beef. Each pathogen was cultivated and inoculated into ground beef separately.

Following homogenization by hand massaging of the plastic bags, samples were separated into 10 portions of 25g and placed into sterile plastic bags. One portion was analyzed immediately and the others held for 24, 48, 72 and 120 hours (at 4°C) and 1, 7, 30, 60 and 90 days (at -18°C) before analytical quantification.

#### Analysis of inoculated ground beef samples

Each 25g portion of the ground beef sample was homogenized with 225 mL of a BPW in a stomacher 400 Laboratory Blender (Seward Medical Ltd., London, England) and subsequent decimal dilutions were made using the same diluent. Enumeration of *S. Enteritidis* and *E. coli* O157:H7 was performed using Most Probable Number (MPN) procedure according to APHA<sup>23</sup>. Isolation and identification were performed according to the same procedures as described in 2 and 3, above.

Three separate trials were performed for each strain of *S. Enteritidis* and *E. coli* O157:H7.

## RESULTS AND DISCUSSION

From 253 samples of raw meat, 23 (9.1%) were positive for *Salmonella* spp. Out of these 23 samples, 19.6% were swine sausage, 8.7% were swine meat, 7.3% were bovine meat, and 4.6% were chicken (Table 1). A total of eleven serovars of *Salmonella* spp. were isolated (Table 2). *S. Enteritidis* was isolated from 8 samples, followed by the *S. Typhimurium* and *S. I 4,5,12:i:-* both isolated from three samples. According to Tavechio et al<sup>31</sup>, during the period from 1991 to 1995, *S. Enteritidis* was largely isolated from human sources.

Several researchers investigated the prevalence of *Salmonella* spp. in raw meat and isolated various *Salmonella* serovars, with findings appointing *S. Enteritidis* as the most prevalent<sup>9,11,20,31</sup>. In São Paulo city, Paula et al<sup>22</sup> detected 22.5% *Salmonella* spp. in 200 samples of raw meat, and *S. Enteritidis* was the most frequent serovar (28.8%).

All the samples tested in this study were negative for *E. coli* O157:H7. Silveira et al<sup>30</sup> analyzed 886 samples of hamburguers from different slaughterhouses in the South and Southeast regions of Brazil, and Silva et al<sup>29</sup> analyzed 340 samples of meat products and the industrial environment of meat manufacturers in the same regions. They did not find the pathogen. In Brazil the prevalence of *E. coli* O157:H7 in healthy dairy cattle has also been very low<sup>8</sup>.

Figures 1 and 2 show the results of refrigeration on *E. coli* O157:H7 and *Salmonella* Enteritidis, respectively, inoculated in ground beef, and Figures 3 and 4 illustrate the freezing effects. Our findings showed that the population of *E. coli* O157:H7 was sensitive to refrigeration and freezing temperatures. In both cases, the initial population was reduced

in 5,4 and 5,6 log<sub>10</sub> MPN/g respectively, and data from literature indicates that *E. coli* O157:H7 populations are also affected by freezing<sup>28</sup>. Those researchers concluded that the death of *E. coli* O157:H7 in ground beef after freezing and thawing ranged from 0.62 to 2.52 log<sub>10</sub> CFU/g. On the other hand, Saad and Franco<sup>27</sup>, observed that the counting of *E. coli* O157:H7 inoculated in ground beef kept under refrigeration was relatively constant throughout the 96 hours the experiment lasted, and Doyle and Schoeni<sup>10</sup> showed that *E. coli* O157:H7 in ground beef can survive up to nine months at -20°C. The presence of high levels of total aerobes (>7 log<sub>10</sub> CFU/g) in ground beef stored at 2°C could result in unfavorable changes in the environment and it could consequently affect the survival of *E. coli* O157:H7<sup>1</sup>.

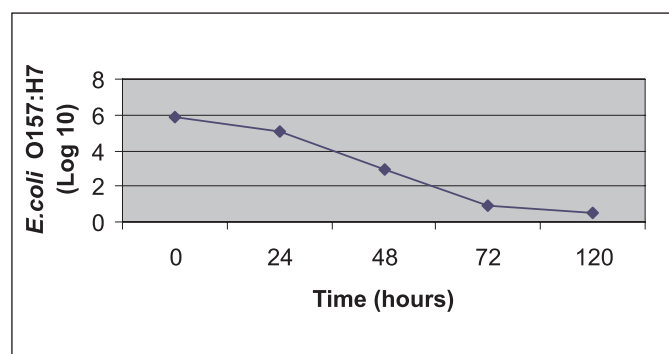
A population of *Salmonella* Enteritidis subjected to refrigeration was reduced in 0,3 log<sub>10</sub> MPN/g after 120 hours of experiment. When subjected to freezing, the initial population was reduced in 0,6 log<sub>10</sub> MPN/g. Figure 2 illustrates the growth of *S. Enteritidis* in the samples up to 48 hours after the beginning of the experiment. According to Varnam and Evans<sup>33</sup>, the growth of *Salmonella* strains at temperatures below 7°C depends on strain type and serovar, and populations are reduced when subjected to freezing temperatures. Teagasc<sup>32</sup> observed the

**Table 1.** Incidence of *Salmonella* spp. in raw meats at retail level in São Paulo city, Brazil

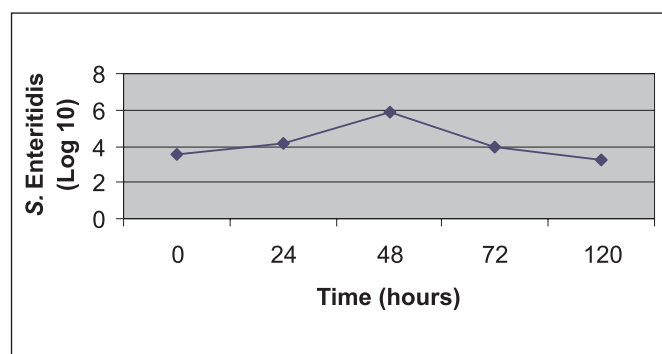
| Samples             | Analyzed Samples | Positive Samples |
|---------------------|------------------|------------------|
| Beef                | 96               | 7                |
| Chicken             | 65               | 3                |
| Swine               | 23               | 2                |
| Raw pork sausage    | 56               | 11               |
| Raw chicken sausage | 13               | 0                |
| Total               | 253              | 23               |

**Table 2.** Serovars of *Salmonella* isolated from raw meats at retail in São Paulo city, Brazil

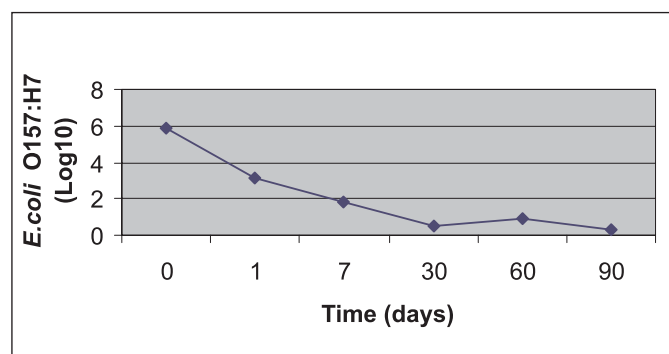
| Serovars               | Samples (number) |
|------------------------|------------------|
| <i>S. Enteritidis</i>  | 8                |
| <i>S. Typhimurium</i>  | 3                |
| <i>S. I 4,5,12:i:-</i> | 3                |
| <i>S. London</i>       | 2                |
| <i>S. Infantis</i>     | 1                |
| <i>S. Agona</i>        | 1                |
| <i>S. Derby</i>        | 1                |
| <i>S. Panama</i>       | 1                |
| <i>S. Senftenberg</i>  | 1                |
| <i>S. I 13.23:z:-</i>  | 1                |
| <i>S. Emek</i>         | 1                |
| Total                  | 23               |



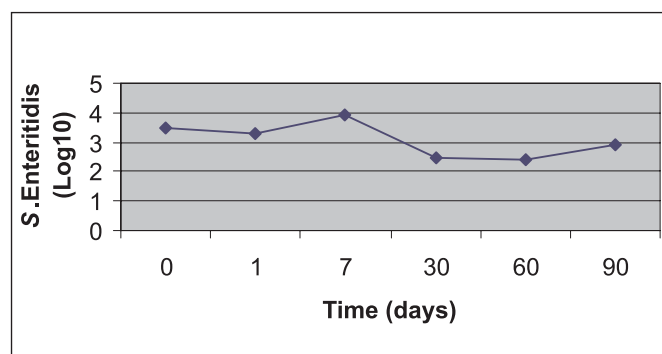
**Figure 1.** Survival of *E. coli* O157:H7 inoculated into ground beef stored at 4°C for 120 hours.



**Figure 2.** Survival of *Salmonella* Enteritidis inoculated into ground beef stored at 4°C for 120 hours.



**Figure 3.** Survival of *E. coli* O157:H7 inoculated into ground beef stored at -18°C for 90 days.



**Figure 4.** Survival of *S. Enteritidis* inoculated into ground beef stored at -18°C for 90 days.

influence of different types of meat (minced beef, pork and lamb) and of varied fat levels in frozen minced beef (adding 5, 10, 20, 30, and 50% of fat to the meat) on the survival of *Salmonella* Kentucky and *Staphylococcus aureus* subjected to freezing (-35°C) and stored for 10 weeks. Both pathogens showed increased survival rates when the level of fat was up to 30% for *S. Kentucky* and 20% for *S. aureus*. A fat level of 50%, however, caused a reduction in the survival rates, which were then similar to the rates observed in lean meat. The pathogen survival rates also varied according to the meat type, being highest on pork and lowest on beef. These results show that, at first, fat had a cryoprotective effect, but increased levels of it caused a reduction in the pathogen survival rate.

Freezing sensitivity of microorganisms belonging to the same genera and species can vary depending on strain type, type of freezing and freezing temperature<sup>18</sup>, cell age (i.e. exponential or stationary phase), bacterial type, Gram negative or positive, nature of suspending medium (i.e. fish, meat or vegetables), storage length, and thawing conditions<sup>32</sup>. Among genera, however, this sensitivity can differ, as was shown in the

present study, with *Salmonella* presenting higher resistance than *E. coli* O157:H7.

The survival of *E. coli* O157:H7 and *S. Enteritidis* in ground meat stored at refrigeration and freezing temperatures indicates that this food should be considered hazardous if it is contaminated with these pathogens.

## CONCLUSIONS

All analyzed samples were negative for *E. coli* O157:H7, which is in agreement with current literature. In Brazil, there has been no report on the occurrence of foodborne outbreaks due to shiga-like toxin producing *E. coli*.

*S. Enteritidis* was the predominant serovar isolated from raw meat.

One strain of *S. Typhimurium* and one of *S. Emek* were lysine decarboxylase negative (LDC); this occurrence is not frequent, but it is an important consideration for its identification, since it can lead to it being misdiagnosed as *Citrobacter* sp.

Results of the current study suggest that the population of *S. Enteritidis* in experimentally inoculated ground beef were not influenced by refrigeration and freezing temperatures.

*E. coli* O157:H7 was sensitive to refrigeration and freezing temperatures, but survived up to 90 days under freezing.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the International Atomic Energy Agency (IAEA), Austria.

## REFERENCES

1. Ajarapu, S.; Shelef, L.A. Fate of pGFP-Bearing *Escherichia coli* O157:H7 in Ground Beef at 2 and 10°C and Effects of Lactate, Diacetate, and Citrate. **Appl. Environ. Microbiol.** 65(12): 5394-7, 1999.
2. Bean, N.H. et al. Surveillance for foodborne disease outbreaks – United States, 1988-1992: review. **J. Food Prot.** 60:1265-86, 1997.
3. Besser, R.E. et al. An outbreak of diarrhea and hemolytic uremic syndrome from *Escherichia coli* O157:H7 in fresh-pressed apple cider. **J. Am. Med. Assoc.** 269:2217-20, 1993.
4. Bryan, F.L.; Doyle, M.P. Health risks and consequences of *Salmonella* and *Campylobacter jejuni* in raw poultry. **J. Food Prot.** 58: 326-44, 1995.
5. Center of Disease Control. *Escherichia coli* O157:H7 outbreak linked to commercially distributed dry cured salami Washington and California. 1994. **MMWR.** 44:157-60, 1995.
6. Centro de Vigilância Epidemiológica / Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. [ftp://ftp.cve.saude.gov.br/doctec/surto\\_dta](ftp://ftp.cve.saude.gov.br/doctec/surto_dta). Acess. in jan.23, 2002.
7. Centro de Vigilância Epidemiológica / Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. [http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/dta\\_estat.htm](http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/dta_estat.htm). Acess. in mar. 10, 2005.
8. Cerqueira, A.M.F. et al. High occurrence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in healthy cattle in Rio de Janeiro State, Brazil. **Vet. Microbiol.** 70:11-21, 1999.
9. Chiang, Y.H. Prevalence of *Salmonella* spp. in poultry broilers and shell eggs in Korea. **J. Food Prot.** 63:655-658, 2000.
10. Doyle, M.P.; Schoeni, M.P. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from retail fresh meats and poultry. **Appl. Environ. Microbiol.** 53:2394-6, 1987.
11. Fuzihara, T.O.; Fernandes, S.A.; Franco, B.D.G.M. Prevalence and dissemination of *Salmonella* serotypes along the slaughtering process in Brazilian small poultry slaughterhouses. **J. Food Prot.** 63:1749-53, 2000.
12. Griffin, P.M.; Tauxe, R.V. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. **Epidemiol. Rev.** 13:60-98, 1991
13. Hitchins, A.D.; Hartman, P.A.; Todd, E.C.D. Coliforms - *Escherichia coli* its toxins. In: Vanderzant, C.; Splittstroesser, D.F. (Eds), **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**, 3<sup>rd</sup>. Washington, DC: APHA p.325-369, 1992.
14. ICMSF. **Microorganisms in Foods, 1. Their significance and methods of Enumeration.** 2<sup>nd</sup> ed. Intern. Comm. on Microbiolog. Spec. for Foods. Univ. of Toronto Press, Toronto, Ontario, Canada, 1988.
15. Irino, K. et al. O157:H7 shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains associated with sporadic cases of diarrhea in São Paulo, Brazil. **Emerging Infect. Dis.** 8: 446-7, 2002.
16. ISO. Microbiology – General Guidance for the Detection of *Salmonella*. **Intern. Org. for Standardization 6579**, Geneva, Switzerland, 2002.
17. Jakabi, M. et al. Observações laboratoriais sobre surtos alimentares de *Salmonella* sp., ocorridos na Grande São Paulo, no período de 1994 a 1997. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 1:47-51, 1999.
18. Jay, J.M. **Modern Food Microbiology.** 4<sup>th</sup> ed., Chapman & Hall, New York, p.314-34, 1992.
19. López, E.L. et al. Perspectives on Shiga-like toxin infection in Argentina. **J. Food Prot.** 60:1458-1462, 1997.
20. Machado, J.; Bernardo, F. Prevalence of *Salmonella* in chicken carcasses in Portugal. **J. Appl. Bacteriol.** 69:477-80, 1990
21. OPS. Almeida et al. (Eds), **Contaminación microbiana de los alimentos vendidos en la vía pública.** p.25-8, 1996.
22. Paula, A.M.R. et al. Detection of *Salmonella* in foods using Tecra *Salmonella* Via and Tecra *Salmonella* Unique Rapid Immunoassays and a cultural procedure. **J. Food Prot.** 65:552-555, 2002.
23. Peeler, J.T.; Houghtby, G.A.; Rainosek, A.P. The most probable number technique. In: Vanderzant, C.; Splittstroesser, D.F. (Eds.) **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**, 3<sup>rd</sup>. Washington, D.C. APHA p. 105-120, 1992.
24. Peresi, J.T.M. et al. Surtos de enfermidades transmitidas por alimentos causados por *Salmonella* Enteritidis. **Rev. Saúde Pública** 32:477-83, 1998.
25. Pessoa, G.V.A.; Silva, E.A.M. Meios de Rugai e lisina – motilidade combinados em um só tubo para a identificação de enterobactérias. **Rev. Inst. Adolfo Lutz.** São Paulo, 32:97-100, 1972.
26. Popoff, M.Y.; Le Minor, L. Formules antigéniques des sérovars de *Salmonella*. **Centre Collaborateur OMS de Référence et de Recherche pour les Salmonella**, 1997, Institut Pasteur, Paris.
27. Saad, S.M.I.; Franco, B.D.G.M. Influence of raw meat natural background flora on growth of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef. **Rev. Microbiol.** 30: 272-7, 1999.
28. Sage, J.R.; Inghan, S.C. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 after freezing and thawing in ground beef patties. **J. Food Prot.** 61:1181-3, 1998.
29. Silva, N. et al. Ocorrência de *Escherichia coli* O157:H7 em produtos cárneos e sensibilidade dos métodos de detecção. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** 21(2):223-7, 2001.
30. Silveira, N.F.A. et al. Occurrence of *Escherichia coli* O157:H7 in hamburgers produced in Brazil. **J. Food Prot.** 62:1333-5, 1999.
31. Tavechio, A.T. et al. Changing patterns of *Salmonella* serovars increase *Salmonella* Enteritidis in São Paulo, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop.** 38:315-22, 1996.
32. Teagasc, J.J.S. The effect of freezing on the survival of pathogens in different meat types and effect of varying lean fat ratios. **Hygiene review**, The Irish Society of Food Hygiene Technology, 1997.
33. Varnam, A.H.; Evans, M.G. **Foodborne Pathogens.** St. Louis: Mosby Year Book, London: Wolfe, 1991.

# Ocorrência de enteroparasitoses em alunos da escola pública de ensino fundamental do município de Catanduva (São Paulo, Brasil)

## Survey of parasitic diseases in students at a public primary school at Catanduva city (São Paulo, Brazil)

RIALA6/1004

Júnia Maria M. FALEIROS<sup>1</sup>; Giovana GALLO<sup>1</sup>; Merylucia M. K. SILVA<sup>1</sup>; Rodrigo RAFUL<sup>1</sup>; André R. NASORRI<sup>1</sup>; Livia Francine R. PIPINO<sup>1</sup>; Ricardo B. JUNQUEIRA<sup>1</sup>; Pedro L. S. PINTO<sup>2\*</sup>

\* Endereço para correspondência: <sup>2</sup> Instituto Adolfo Lutz, Av Dr. Arnaldo, 355 CEP. 01246-902 – 8º andar Seção de Enteroparasitoses, Cérq. César – São Paulo

<sup>1</sup> Faculdade de Medicina de Catanduva

Recebido: 19/12/2003 – Aceito para publicação: 10/11/2004

### RESUMO

Este trabalho objetivou levantar as parasitoses intestinais mais frequentes na faixa etária de 6 a 11 anos, relacionando-as ao nível sócio-econômico e aos hábitos de vida das crianças de uma escola pública de primeiro grau no município de Catanduva. Iniciou-se com palestras sobre educação sanitária para pais e alunos. Posteriormente, foi aplicado um questionário sócio-econômico e colheram-se amostras de fezes de 250 crianças, sendo 138 do sexo masculino e 112 do sexo feminino. Foram feitos exames parasitológicos de fezes; as crianças, que apresentaram resultados positivos, foram tratadas. Das crianças analisadas, 12,80% estavam parasitadas, principalmente aquelas na faixa etária de 8 a 9 anos (40,62%) e 62,50% eram do sexo masculino. As 84,37% de crianças parasitadas das crianças parasitadas e 67,88% das crianças não parasitadas relataram que tinham animais de estimação. Os parasitas mais encontrados foram *Giardia lamblia* (43,75%); *Entamoeba coli* (31,25%); *Enterobius vermicularis* (18,75%); *Endolimax nana* (15,62%); ancilostomídeos (3,12%); *Strongyloides stercoralis* (3,12%) e *Entamoeba histolytica* (3,12%). Das crianças positivas, 81,25% eram monoparasitadas e 18,75% poliparasitadas; e 77,27% bebiam água diretamente da torneira. Concluiu-se que a incidência de parasitoses diminuiu no município de Catanduva se comparada a dos anos anteriores, mostrando ter havido melhoria na qualidade de vida e maior conhecimento das pessoas em relação à educação sanitária e saneamento básico.

**Palavras-Chave.** enteroparasitoses, escolares, educação sanitária

### ABSTRACT

The aim of this *study* was to carry out a survey on the most common parasitic disease in children from 6 to 11 years old in a public elementary school in Catanduva, SP. A link among the occurrence of parasitic diseases, the social economic level, and the children habit has been made. The study has been set out with providing lectures on hygiene information to children and their parents. Afterwards, a social economic questionnaire was applied to 250 children, and the faeces samples were collected from them for parasite examination. Children whose samples were positive were treated. Of analyzed samples, 12.80% were positive, being mostly from children aged between 8 and 9 years old (40.62%), and 62.50% were male children. A total of 84.37% of parasitized children and 67.88% of non-parasitized children reported that used to have pet animals at home. The mostly common detected parasites were *Giardia lamblia* (43.75%); *Entamoeba coli* (31.25%); *Enterobius vermicularis* (18.75%); *Endolimax nana* (15.62%); ancylostomiasis (3.12%); *Strongyloides stercoralis* (3.12%), and *Entamoeba histolytica* (3.12%). Of those positives samples, 81.25% were monoparasitized children, and 18.75% were polyparasitized; and 77.27% of parasitized children reported the habit of drinking tap water. In conclusion, the parasitic diseases decreased in Catanduva when compared to former years, showing the improvement in the quality of life as well as the better awareness of the people concerning sanitary education and basic sanitation.

**Key Words.** parasitic diseases, student from 6 to 11 years old, sanitary education

## INTRODUÇÃO

Os parasitas intestinais representam um problema antigo para o homem. São conhecidos desde os tempos mais remotos. Porém, ainda hoje, são importante causa de morbidade e mortalidade, principalmente nos países menos desenvolvidos<sup>2</sup>.

As helmintíases e protozooses comprometem cerca de 25% da população mundial (mais de dois bilhões de pessoas), havendo maior concentração nos países que constituem a periferia do mundo globalizado<sup>3,9</sup>. Porém, estão também presentes em bolsões de pobreza que persistem nos países desenvolvidos<sup>6</sup>.

O ambiente quente dos países tropicais (onde as parasitoses são mais prevalentes) associado a desnutrição, falta de assistência médica, contaminação de alimentos e fontes de água, condições sanitárias precárias e a presença de reservatórios e vetores parasitários criam um cenário ideal para os parasitas em geral<sup>3</sup>.

A invasão do hospedeiro se dá pela pele (contato direto com solo contaminado) e/ou por via oral (ingestão de água ou alimentos contaminados ou perversão do apetite)<sup>3</sup>. Algumas das principais conseqüências da infecção intestinal são a diarreia e a desnutrição, comprometendo o desenvolvimento físico e intelectual, particularmente das faixas etárias mais jovens da população<sup>9,16</sup>, além de representarem importante causa de mortalidade<sup>2</sup>.

Nos países subdesenvolvidos, a endemicidade das parasitoses intestinais está relacionada com a contaminação do meio ambiente e de fômites<sup>3</sup>.

No Brasil não há estudos globais recentes para avaliar a taxa de prevalência das enteroparasitoses. Os dados mais representativos referem-se ao estudo multicêntrico realizado no final da década de 80, que mostrou prevalência ainda elevada com acentuadas diferenças regionais<sup>1</sup>. No geral as infecções parasitárias intestinais apresentam como características o poliparasitismo associado à desnutrição e anemia<sup>2,12</sup>.

No Estado de São Paulo observou-se diminuição na prevalência de infecção por enteroparasitas nos últimos 30 anos. No entanto, os índices ainda são bastante significativos<sup>6</sup>.

No Município de Catanduva, em estudo prévio realizado no ano de 1991, em crianças menores de 14 anos, a frequência de parasitoses foi de 51,1%, sendo os parasitas mais prevalentes *Giardia lamblia* (26,4%), *Entamoeba coli* (22,8%), *Endolimax nana* (11,4%) e *Entamoeba histolytica* (5,7%)<sup>11</sup>.

Esses valores despertam-nos o interesse de uma nova avaliação do percentil de crianças parasitadas e também do tipo de parasita mais freqüente.

## MATERIAL E MÉTODOS

O público alvo do projeto foram crianças em idade escolar do 1º grau do ensino fundamental da *Escola Estadual de Primeiro Grau Professora Maria Aparecida Colturato*

*Fernandes* do Município de Catanduva. Foram entrevistadas e examinadas 250 crianças, sendo 138 do sexo masculino e 112 do sexo feminino, com idade mínima de 6 anos e máxima de 11 anos.

O projeto teve início no mês de Outubro de 2001 com palestras sobre educação sanitária para as crianças. Foram abordados assuntos como: os agentes etiológicos das principais parasitoses, seus respectivos ciclos evolutivos, os mecanismos de transmissão, sintomatologia e métodos preventivos. Nestas palestras buscou-se conscientizar a importância da higiene na vida cotidiana.

Posteriormente, foi realizada palestra com os pais, abordando-se o mesmo tema e explicando o método e o objetivo do projeto.

Foi aplicado um questionário sócio-econômico e entregue para cada criança um recipiente para a colheita de material para o exame parasitológico de fezes. Os exames foram realizados em uma única amostra pelas seguintes técnicas: exame direto a fresco em fezes diarréicas, sedimentação espontânea em água, método de flutuação por Faust e col., método de extração de larvas segundo Rugai et al. e esfregaço de fezes coradas pela fucsina para pesquisa de coccídeos intestinais.

Os casos positivos foram tratados com anti-parasitário (Metronidazol para protozoários e Mebendazol para helmintos).

Os medicamentos foram adquiridos gratuitamente nos Postos de Saúde do Município de Catanduva. Antes da entrega das receitas médicas foi realizada palestra com os pais, orientando sobre a maneira adequada de se realizar o tratamento. Ainda nesta palestra foi esclarecida a importância do tratamento adequado das parasitoses e reafirmados os métodos preventivos das mesmas.

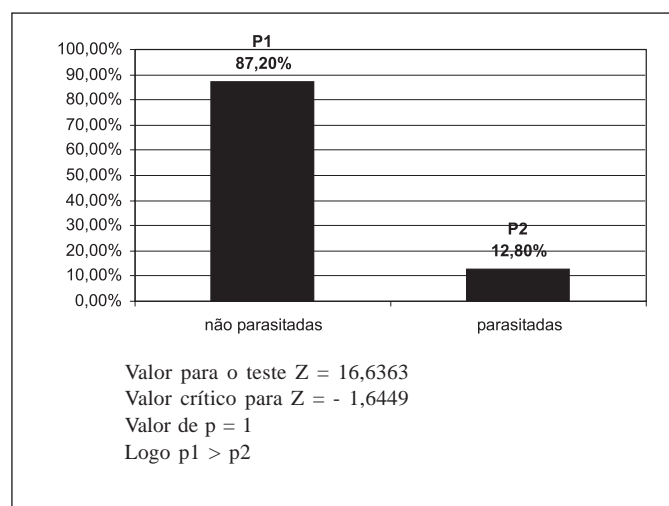
O tratamento estatístico foi realizado segundo o teste Z.

## RESULTADOS

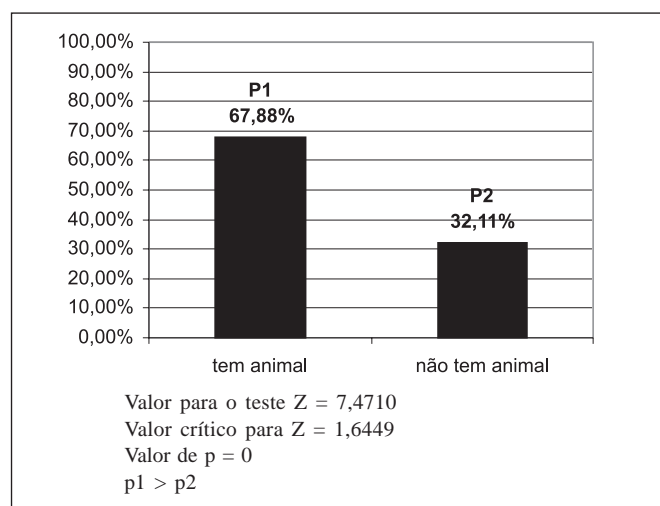
Foram entrevistadas e examinadas 250 crianças, que foram separadas em dois grupos: crianças parasitadas (32 crianças) e crianças não parasitadas (218 crianças), conforme se observa na Figura 1.

Entre as crianças não parasitadas, 66 (30,37%) encontrava-se na faixa etária de 6 a 7 anos, 114 (52,29%) na faixa etária de 8 a 9 anos e 38 (17,43%) entre 10 e 11 anos; onde 118 (54,12%) eram do sexo masculino e 100 (45,87%) do sexo feminino. Já no grupo das crianças parasitadas, 11 (34,37%) encontrava-se na faixa etária de 6 a 7 anos, 13 (40,62%) entre 8 e 9 anos e 8 (25%) entre 10 e 11 anos; onde 20 (62,50%) eram do sexo masculino e 12 (37,50%) do sexo feminino.

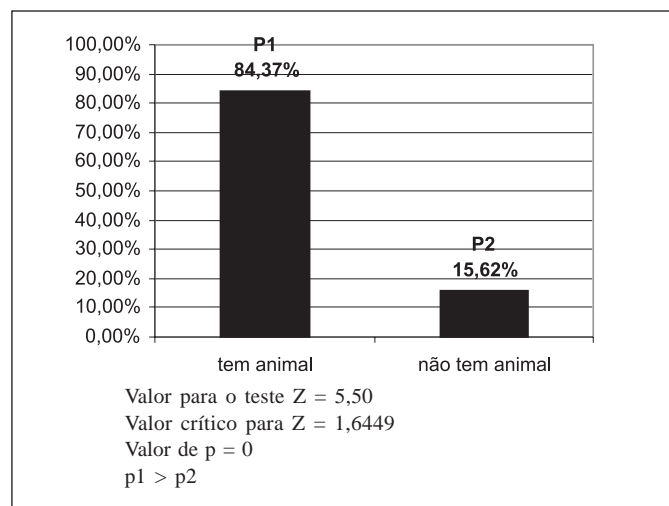
Durante a entrevista foi perguntado sobre as condições de moradia de cada criança. No grupo das crianças não parasitadas, 126 (57,79%) moravam em casa própria, 50 (22,93%) em casa alugada, 19 (8,71%) em casa emprestada e 23 (10,55%) não souberam responder, sendo que o tipo de chão de 171 casas (78,44%) era de piso frio, 36 (16,51%) de madeira, 10 (4,58%)



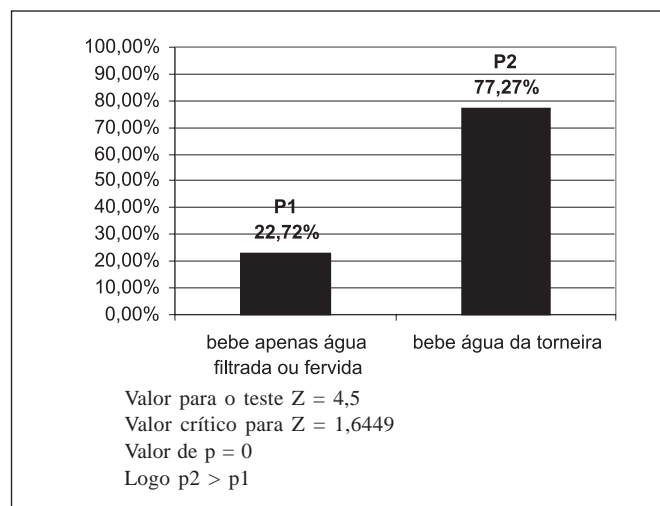
**Figura 1.** Percentual de crianças parasitadas e não parasitadas



**Figura 2.** Percentual da presença de animais de estimação entre as crianças não parasitadas



**Figura 3.** Percentual da presença de animais de estimação entre as crianças parasitadas



**Figura 4.** Hábitos em relação à ingestão de água entre as crianças parasitadas

de terra e 1 (0,45%) não soube responder. Já entre as crianças parasitadas, 14 (43,75%) moravam em casa própria, 9 (28,12%) em casa alugada, 3 (9,37%) em casa emprestada e 6 (18,75%) não souberam responder. Dessas casas, 20 (62,50%) tinham chão de piso, 5 (15,62%) de madeira, 6 (18,75%) de terra e 1 (3,12%) não soube responder.

Em relação à estrutura da casa ( tijolo, madeira ou barro), apenas duas crianças moram em casa de madeira. Estas não apresentaram resultado positivo para o exame parasitológico de fezes.

Todas as crianças entrevistadas (parasitadas e não parasitadas) residem em domicílios com água encanada, luz elétrica, sanitário ligado à rede de esgoto e o destino do lixo é a coleta pública.

Em relação à presença de animais de estimação, 148 crianças não parasitadas (67,88%) possuem algum, enquanto 70 (32,11%) não os possuem, conforme se verifica na Figura 2. Já entre as crianças parasitadas, 27 (84,37%) possuem algum animal de estimação, e 5 (15,62%) não têm nenhum, conforme mostra a Figura 3.

Foram feitas também perguntas sobre os hábitos de vida das crianças. Foi constatado que não há diferença significativa entre os resultados obtidos na entrevista com as crianças parasitadas e não parasitadas. A grande maioria relata lavar as mãos após ir ao banheiro e antes das refeições; cortar as unhas; escovar os dentes após as refeições; nega nadar em rios. A maioria relata também ter ido ao dentista ao menos uma vez.

A maioria das crianças parasitadas (25) relata beber água diretamente da torneira, enquanto apenas 7 bebem apenas água filtrada ou fervida, conforme mostra a Figura 4.

No grupo das crianças parasitadas, 26 (81,25%) eram monoparasitadas e 6 (18,75%) eram poliparasitadas. Os parasitas encontrados são mostrados na Figura 5.

## DISCUSSÃO

Com o propósito de obter parâmetros para subsidiar futuras ações de saúde no município de Catanduva, foi avaliada a frequência das parasitoses intestinais em alunos de uma Escola Pública de Ensino Fundamental e a atual situação sócio-econômica de seus familiares. Os dados obtidos foram comparados com outro estudo semelhante realizado no início da década de 90<sup>11</sup>.

Foi constatada uma acentuada diminuição na frequência geral de enteroparasitas, em escolares, que passou de 51,10% em 1991<sup>11</sup> para 12,80% no presente estudo. A tendência de queda das frequências das enteroparasitoses em populações urbanas, no Estado de São Paulo, já foram apontadas por outros autores<sup>4,7</sup>. Por outro lado, constata-se que os atuais índices observados neste trabalho são menores se comparados com a literatura, confirmando a existência de diferenças regionais<sup>3,9</sup>.

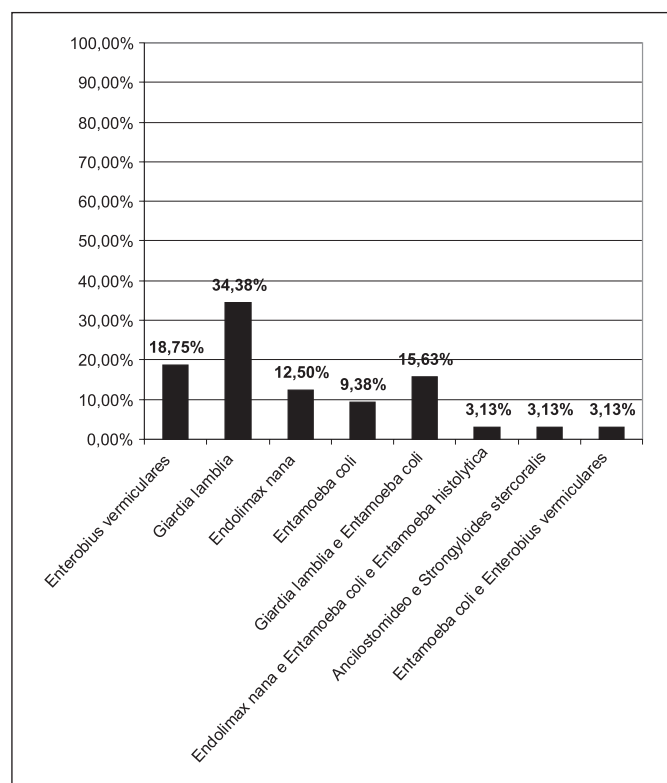


Figura 5. Percentual dos parasitas encontrados

No grupo de crianças parasitadas, a faixa etária de maior ocorrência foi a de 6 a 9 anos. Conforme o aumento da idade das crianças foi observada a diminuição do número de parasitados. No mesmo grupo, as crianças do sexo masculino foram as mais acometidas. Estes achados são concordantes com outras investigações e sugerem que a faixa etária e sexo masculino são variáveis que poderiam estar relacionados com maior exposição ao ambiente, devido a menor higiene pessoal e maior contato com o solo contaminado<sup>8</sup>.

Em relação ao nível sócio-econômico houve uma melhora quando comparado com os dados relativos a década de 90. A maioria das crianças entrevistadas, neste estudo, mora em residência própria, a estrutura da casa é de tijolo, e o chão de grande parte das residências é de piso frio. Além disso, todos os domicílios pesquisados possuem água encanada, luz elétrica, sanitário ligado à rede de esgoto e o destino do lixo é a coleta pública. No estudo anterior observamos que apenas 50,70% das pessoas entrevistadas moravam em casa de tijolo, 50,70% das pessoas possuíam serviço de tratamento de água, 50,10% tinham sanitário ligado a esgoto e 51,0% tinham a coleta pública como destino do lixo. Provavelmente essa melhora na qualidade de vida contribuiu muito para a diminuição das parasitoses no município.

Houve uma estreita relação entre o convívio com animais e o encontro de parasitas intestinais. Mesmo que tal associação possa tratar-se de variável de confusão, uma vez que animais de estimação não representam reservatórios naturais de enteroparasitas, vale lembrar que estes animais têm maior contato com o solo e assim poderia apresentar formas infectantes de parasitas aderidos aos pêlos, favorecendo, desta forma, a transmissão mecânica. No entanto esta modalidade de transmissão necessita de maior comprovação.

*Giardia lamblia* foi o parasita mais frequente, o que coincide com os dados da literatura<sup>10,13,14,15,16</sup>. Isso pode ser devido ao fato de os cistos deste protozoário serem resistentes ao tratamento de água e também ao hábito de não filtrar ou ferver a água antes de bebê-la. Os dados mostram que grande parte das crianças parasitadas bebe água diretamente da torneira.

Chama a atenção a negatividade das amostras para *Ascaris lumbricoides* e *Trichuris trichiura* e a positividade de 3,13% das amostras tanto para Ancilostomídeos quanto para *Strongyloides stercoralis*. Este dado poderia sugerir o uso sistemático da auto-medicação, que seria mais eficiente para o primeiro grupo de geo-helminthos ou poderia estar relacionado com o hábito dessas crianças de andarem descalças, favorecendo a maior transmissão dos geohelminthos de aquisição ativa. Já foram comprovados por outros autores que as geohelminthoses podem variar conforme a faixa etária, sexo, características ambientais, área geográfica e atividade humana<sup>4,8,5</sup>.

Foi calculada curva de crescimento para cada criança parasitada. Os dados mostram que não houve prejuízo no desenvolvimento das crianças, pois todas estão com o peso e



altura normais para as respectivas idades. Isso indica provavelmente baixa intensidade de infecção e baixa frequência parasitária. Se estas fossem elevadas, poderia haver prejuízo na absorção de nutrientes, o que prejudicaria o desenvolvimento da criança.

### CONCLUSÕES

De acordo com os dados apresentados, a conclusão que se chega é que a melhora na qualidade de vida, incluindo saneamento básico e educação sanitária, contribui muito para a diminuição das enteroparasitoses. Se esse nível for mantido, as parasitoses passarão a ter uma importância menor do que têm hoje no município.

### AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Lair Merlo pelo auxílio técnico e à Escola Estadual de 1º Grau Professora Maria Aparecida Colturato Fernandes, pois sem suas colaborações a realização deste trabalho não teria sido possível.

### REFERÊNCIAS

1. Campos, R. Levantamento multicêntrico de parasitoses intestinais no Brasil. **Rhodia – grupo Rhône-Poulenc**, 1988
2. Chehter, L; Cabeça, M. Parasitoses intestinais. **Rev. Bras. Med**, 57: 225-31, 2000.
3. Chehter, L; Cabeça, M. Parasitoses intestinais. In: **Atualização terapêutica**. São Paulo: Artes Médicas; 1999. p. 279-83.
4. Chieffi, PP. Aspectos epidemiológicos das geohelminthiases do Estado de São Paulo. **AMHFCMSCSP**, 26:61-4, 1986.
5. Chieffi, PP. e Amato-NETO, V. Vermes, verminoses e a Saúde Pública. **Rev. SBPC**, 55:41-4, 2003.
6. Chieffi, PP; Gryscek, RCB; Neto, VA. **Parasitoses intestinais Diagnóstico e tratamento**. São Paulo: Lemos Editorial; 2001.
7. Ferreira, MU; Ferreira, CS.; Monteiro, CA. Tendência secular das parasitoses intestinais na infância na cidade de São Paulo (1984-1996). **Rev. Saúde Púb.**, 34: 73-82, 2000.
8. Giraldi, N et al. Enteroparasites prevalence among daycare and elementary school children of municipal schools, Rolândia, PR, Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**, 34: 385-7, 2001.
9. Ludwig, KM et al. Correlação entre condições de saneamento básico e parasitoses intestinais na população de Assis, estado de São Paulo. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**, 32: 547-55, 1999
10. Macedo, LMC et al. Enteroparasitoses em pré-escolares de comunidades favelizadas da cidade do Rio de Janeiro, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, 14: 851-5, 1998
11. Pinto, PLS et al. Aspectos epidemiológicos das parasitoses intestinais em crianças menores de 14 anos residentes no município de Catanduva (SP). **Klinikos**, 6: 20-2, 1991.
12. Prado, MS et al. Prevalência e intensidade da infecção por parasitas intestinais em crianças na idade escolar na cidade de Salvador (Bahia, Brasil). **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**, 34: 99-101, 2001
13. Rezende, CHA; Cruz, JMC; Cardoso, MLG. Enteroparasitoses em manipuladores de alimentos de escola pública em Uberlândia (Minas Gerais), Brasil. **Rev. Panam. Salud Publica**, 2: 392-7, 1997
14. Rocha, MO et al. Avaliação do ProSpeT Giardia. Ensaio em microplaca na detecção de coproantígenos de *Giardia lamblia* em fezes de pacientes de Belo Horizonte, Brasil. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, 41: 151-4, 1999
15. Thompson, RCA; Reynoldson, JÁ; Mendis, AAW. Giardia and giardiasis. **Advanc. Parasit**, 32: 1-160, 1993
16. Uchôa, CMA et al. Parasitoses intestinais: prevalência em creches comunitárias da cidade de Niterói, Rio de Janeiro - Brasil. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 60: 97-101, 2001.

# Estudo comparativo com diversos fixadores para aplicação em microscopia eletrônica de transmissão

## A comparative study on several fixatives applied in transmission electron microscopy procedure

RIALA6/1005

Daniel S. ABRAHÃO<sup>1</sup>; Ana Rita TOLEDO PIZA<sup>1</sup>; Marilena dos Anjos MARTINS<sup>1</sup>; Jacinto C. SILVA NETO<sup>1</sup>; Elaine C.J. FERREIRA<sup>1</sup>; Ludmila Nakamura RAPADO<sup>1</sup>; Tânia Matiko HOSODA<sup>1</sup>; Raquel C.SILVA<sup>1</sup>; Ana Carolina AZZUZ<sup>1</sup>; Noemi Nosomi TANIWAKI<sup>2</sup>; Maria de Fátima Costa PIRES<sup>3\*</sup>

\* Endereço para correspondência: Av. Dr. Arnaldo, 355 - São Paulo/SP - 01246-902 - Seção de Microscopia Eletrônica,

<sup>1</sup> Pós-graduandos da Disciplina Microscopia Eletrônica no Laboratório de Saúde Pública - Área de Concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública - PPG-CIP - SES/SP

<sup>2</sup> Pesquisador Científico Seção de Microscopia Eletrônica do Instituto Adolfo Lutz, SP.

<sup>3</sup> Professora Responsável pela Disciplina - PLSP-PPG-CIP-SP

### RESUMO

Um estudo comparativo sobre a ação de diversos fixadores utilizados em microscopia eletrônica de transmissão (MET) e microscopia de luz (ML) foi realizado, a fim de analisar a preservação de estruturas celulares ao microscópio eletrônico de transmissão (MET). Fragmentos de fígado de camundongo foram fixados em 5 diferentes fixadores: o fixador de Karnovsky, glutaraldeído e paraformaldeído utilizados no processamento para MET e o formaldeído comercial e líquido de Bouin utilizados no processamento para ML. Após a fixação, os fragmentos foram pós-fixados com tetróxido de ósmio e contrastados com acetato de uranila. A seguir foram desidratados e incluídos em resina Epon. Os cortes ultrafinos mostraram que os fragmentos fixados com Karnovsky e glutaraldeído apresentaram melhor preservação das estruturas celulares e menor extração. O paraformaldeído produziu alguns artefatos de má fixação e extração pelo fato de formar menos ligações cruzadas que o glutaraldeído. Os fixadores formaldeído comercial e o líquido de Bouin utilizados em microscopia de luz mostraram que não são adequados ao uso em MET, pois são considerados fixadores coagulantes e produzem extensa extração dos componentes celulares. Comparando-se as imagens obtidas com os fixadores utilizados, o fixador de Karnovsky e o glutaraldeído mostraram melhor preservação e maior similaridade na morfologia.

**Palavras-Chave.** fixador de Karnovsky, glutaraldeído, paraformaldeído, formaldeído, líquido de Bouin, microscopia eletrônica de transmissão.

### ABSTRACT

A comparative study on several fixatives used for Electron Microscopy (EM) and light microscopy (LM) procedure was carried out in order to investigate the cellular structures preservation under Transmission Electron Microscopy. Mouse liver fragments were fixed with diverse fixatives, three of them regularly employed for EM procedure (Karnovsky, glutaraldehyde, and paraformaldehyde), and two other fixatives used for LM methodology (commercial solution of formaldehyde, and Bouin solution). After primary fixation, all tissue fragments were post-fixed with osmium tetroxide and uranyl acetate. Then, the fragments were dehydrated, and embedded in Epon resin. Ultra-thin sections from Karnovsky- and glutaraldehyde- fixed tissues showed better preservation of cell structures and reduced extraction of cellular components. The paraformaldehyde - fixed tissue presented poorer results than glutaraldehyde fixation due to the presence of less cross linking; however that fixative has been useful in electron cytochemical technique. Commercial formaldehyde solution and Bouin solution are the usual fixatives for LM but they are unsuitable for EM. Their contents present a feature of coagulating proteins and to cause an extensive extraction that induces a loss of cell constituents. Although all used fixatives rendered images with artifact, both fixatives Karnovsky and glutaraldehyde showed best cell morphology preservation and similar results.

**Key Words.** Karnovsky fixatives, glutaraldehyde, paraformaldehyde, Bouin solution, transmission electron microscopy.

## INTRODUÇÃO

A partir de 1950, os procedimentos de preparação de amostras biológicas para microscopia eletrônica de transmissão (MET) começaram a ser padronizados com o desenvolvimento de fixadores adequados<sup>7,15,16</sup>, agentes desidratantes compatíveis com o meio de inclusão e desenvolvimento de agentes de inclusão como as resinas epoxi<sup>4,9</sup>, que permitiram a obtenção de cortes ultrafinos<sup>12</sup> que apresentaram boa estabilidade quando submetidos ao feixe de elétrons.

A fixação é a primeira etapa na preparação de amostras biológicas para exame de cortes ultrafinos ao ME e tem o propósito de estabilizar e preservar a organização celular mesmo após procedimentos subsequentes como a desidratação, embebição e exposição ao feixe de elétrons<sup>14</sup>. É inevitável que a morfologia celular seja alterada durante o processo de estabilização e modificações podem ocorrer mesmo com aqueles fixadores considerados ideais. Evidências experimentais indicam que quantidades variadas de carboidratos, proteínas, lipoproteínas e lipídeos são perdidas durante a fixação<sup>5</sup>. Dessa forma, é inerente que as imagens obtidas ao microscópio de luz e/ou eletrônico sejam artefatuais<sup>3</sup>.

O tetróxido de ósmio, um fixador utilizado em microscopia de luz desde o começo do século XX<sup>19</sup> foi a base inicial de fixador desenvolvido para ME por Palade<sup>10</sup> em 1952. O ósmio protege as lipoproteínas naturais dos tecidos evitando sua ruptura e coagulação, mas tem a desvantagem de penetrar e reagir tão vagarosamente que mudanças consideráveis na estrutura celular podem ocorrer antes que a fixação seja completa.

A mudança no processo de fixação surgiu com o trabalho de Sabatini et al.<sup>16</sup> que introduziram o glutaraldeído. Eles procuravam por fixadores que permitissem reter a atividade enzimática, destruída ou inibida pelo ósmio, que era usado como fixador primário naquele tempo. Outros aldeídos foram utilizados anteriormente, mas o glutaraldeído apresentou uma excelente preservação em tecidos animais e vegetais, quando seguido por uma pós-fixação com ósmio. O glutaraldeído sendo um dialdeído, reage com proteínas estabilizando estruturas através de ligações cruzadas. No entanto, os lipídeos não são preservados pelo glutaraldeído, cerca de 95% podem ser extraídos durante a desidratação<sup>18</sup>, a menos que uma segunda fixação com ósmio seja utilizada.

A boa fixação do glutaraldeído levou os pesquisadores a reexaminarem outros aldeídos como fixadores primários, e encontraram no formaldeído, recém preparado a partir do paraformaldeído<sup>6,15</sup> um fixador comparável ao glutaraldeído e com a vantagem adicional de ter uma penetração mais rápida nas amostras. No entanto, este fixador sendo um monoaldeído forma menos ligações cruzadas que o glutaraldeído, assim, deve-se tomar cuidado durante a lavagem porque sua fixação é reversível<sup>5</sup>. Este fixador difere do formaldeído comercial testado no início da microscopia eletrônica com resultado inferior ao do ósmio. Mesmo quando utilizado como fixador primário antes do ósmio, ocorre extensa extração e precipitação, devido à presença considerável

de metanol (11 a 16%) na solução comercial do formaldeído<sup>11</sup>. Misturas de aldeídos também foram testadas, particularmente de paraformaldeído e glutaraldeído (fixador de Karnovsky)<sup>7</sup> que provou ser superior à utilização de um aldeído único. O princípio deste fixador é que o formaldeído penetra no tecido mais rapidamente que o glutaraldeído e estabiliza temporariamente estruturas que serão subsequentemente fixadas mais permanentemente pelo glutaraldeído<sup>7</sup>.

Em anos subsequentes foi introduzido o acetato de uranila como um terceiro fixador, seguido do glutaraldeído e ósmio. Ele é descrito como contrastante em bloco<sup>8</sup>. Sob estas condições o acetato de uranila atua como um fixador para componentes lipídicos.

Este trabalho foi o resultado das aulas práticas realizadas com os alunos de Pós-Graduação da Disciplina "Microscopia Eletrônica no Laboratório de Saúde Pública" PPG-CIP-SES/SP e teve como objetivo comparar a ação dos diferentes fixadores utilizados na microscopia eletrônica de transmissão e na microscopia de luz analisando a preservação de estruturas celulares ao Microscópio Eletrônico de Transmissão.

## MATERIAL E MÉTODOS

Camundongo Balb/c, fêmea de 4 meses de idade foi sacrificada e o fígado retirado foi dividido para os 5 grupos (G1 a G5). Cada grupo recebeu um fixador diferente para estudo.

Os fixadores utilizados neste experimento foram:

A. Para preparação em Microscopia Eletrônica de Transmissão:  
*Grupo 1* : Karnovsky (paraformaldeído (Merck) a 4% e glutaraldeído (Sigma) a 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,2;

*Grupo 2* : Glutaraldeído a 2,5% (Sigma) em tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,2;

*Grupo 3* : Paraformaldeído (Merck) a 4% em tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,2

B. Para preparação em Microscopia de Luz:

*Grupo 4* : Formaldeído (comercial) (Synth) a 10% aquosa pH 5,0;

*Grupo 5* : Líquido de Bouin, pH 2,5

Os fragmentos foram fixados por 2 horas a temperatura ambiente e após este período, todas as amostras seguiram o mesmo procedimento. Os fragmentos foram lavados em solução de lavagem (sacarose 7,3%, cloreto de sódio 0,6%) e posteriormente pós-fixados em tetróxido de ósmio a 1% por 1 hora a 4°C. Logo após, os fragmentos foram lavados novamente em solução de lavagem e contrastados em bloco em solução de acetato de uranila a 0,5% por 2 horas. Foram então desidratados em concentrações crescentes de acetona 50, 70, 90, 95% por dez minutos em cada etapa e dois banhos de acetona pura por 15 minutos cada. Após a desidratação, os fragmentos foram embebidos em uma mistura de resina Epon : acetona na proporção de 1:1 por 1 hora e a seguir em resina pura por 12 horas. O material incluído foi colocado em estufa a 60°C por 72

horas para polimerização. Cortes semi finos foram corados com azul de toluidina e observados ao microscópio de luz para seleção de áreas a serem estudadas. Cortes ultrafinos foram colhidos em telas de cobre revestidos com formvar e corados com acetato de uranila e citrato de chumbo<sup>13</sup>. Após contrastação foram examinados e fotografados ao Microscópio Eletrônico de Transmissão Philips 400 T.

## RESULTADOS

Os cortes de fígado fixados com os fixadores utilizados em MET apresentaram uma boa preservação. Tanto o tecido fixado com o fixador de Karnovsky como aqueles fixados com o glutaraldeído e paraformaldeído apresentaram resultados similares.

Cortes de fígado fixados com o Karnovsky mostraram uma célula bastante íntegra. O citoplasma apresentou retículo endoplasmático rugoso (RER) formando cisternas estreitas, mitocôndrias, retículo endoplasmático liso (REL) e grânulos de glicogênio levemente extraídos. Os espaços estavam preenchidos por um material homogêneo, finamente granular. O núcleo mostrou cromatina com alguns pontos mais densos e nucléolo. (Figura 1A). O retículo endoplasmático rugoso muitas vezes envolvia as mitocôndrias que apresentavam cristas mitocondriais e grânulos de cálcio em seu interior (Figura 1B). Observou-se também a presença do complexo de Golgi (Figura 1C).

O material fixado com o glutaraldeído também apresentou célula íntegra. Podia-se observar a presença de um grande número de mitocôndrias; retículo endoplasmático rugoso e liso também estavam presentes. Havia regiões apresentando um material amorfo com alguns grânulos de glicogênio. O núcleo mostrou grumos de cromatina elétrons densos (Figura 2A). As mitocôndrias apresentavam cristas e grânulos de cálcio (Figura 2B).

O material fixado com o paraformaldeído mostrou retículo endoplasmático rugoso e mitocôndrias envolvidas pelo RER. Havia regiões vazias no citoplasma, provavelmente anteriormente ocupadas pelo glicogênio. O núcleo mostrava cromatina homogênea e nucléolo evidente (Figura 2C). Algumas mitocôndrias apresentavam cristas mitocondriais preservadas, enquanto outras apresentavam mitocôndrias degeneradas ou sem cristas contendo um material amorfo elétron denso (Figura 2C e 2D).

Cortes de tecidos fixados com fixadores utilizados em microscopia de luz apresentaram má preservação e extração de vários componentes celulares. Cortes de fígado fixado com formaldeído comercial mostrou o citoplasma de um hepatócito com aspecto "rendilhado" devido à presença de numerosos vacúolos de diferentes tamanhos, de formato não homogêneo e vazios. O núcleo apresentava cromatina finamente granular e nucléolo. (Figura 3A). A membrana do retículo endoplasmático rugoso mostrava algumas regiões descontínuas e fragmentadas; em outras regiões havia ausência de ribossomos aderidos à membrana do retículo. As mitocôndrias pareciam dilatadas e a membrana de algumas delas estavam degeneradas;

era possível observar resquícios de cristas mitocondriais e a presença de um material granular elétron denso (Figura 3B). Exceto pelas organelas mais facilmente distinguíveis, era difícil identificar outras organelas citoplasmáticas.

Os cortes de tecidos fixados com o líquido de Bouin mostraram que o citoplasma de um hepatócito apresentava sinais de extração. O núcleo apresentou regiões com grumos de cromatina elétrons densas. Havia grandes regiões vazias. O retículo endoplasmático granular apresentou membranas formando grumos e material elétron denso aderido às mesmas, provavelmente como resultado de uma reação com algum componente do fixador com os ribossomos (Figura 3C); as mitocôndrias não apresentavam cristas nem grânulos de cálcio, mas apareciam como estruturas granulares e elétrons densas (Figura 3D). Não foi possível identificar outras estruturas citoplasmáticas.

## DISCUSSÃO

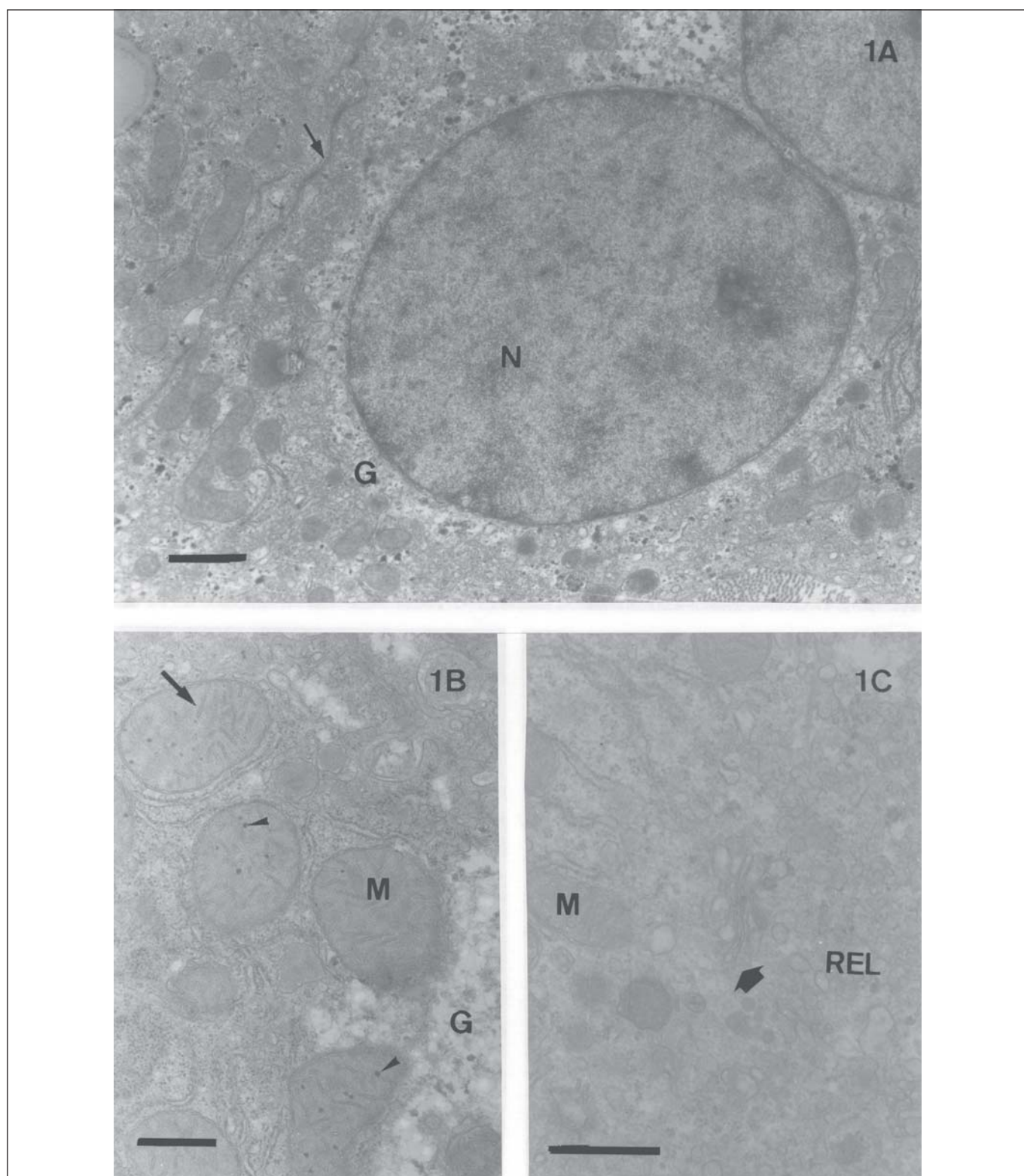
Ao iniciarmos um estudo morfológico de um material desconhecido normalmente é recomendado a utilização de 2 ou mais fixadores diferentes para que os resultados sejam comparados.

Ao propormos um experimento aos alunos de pós-graduação, utilizando diferentes fixadores, tínhamos este propósito, no entanto, para que a percepção deste conceito fosse aguçado nos alunos e as diferenças pudessem ser facilmente observadas ao analisar as eletromicrografias, utilizamos também fixadores usados em microscopia de luz (formaldeído comercial e o líquido de Bouin).

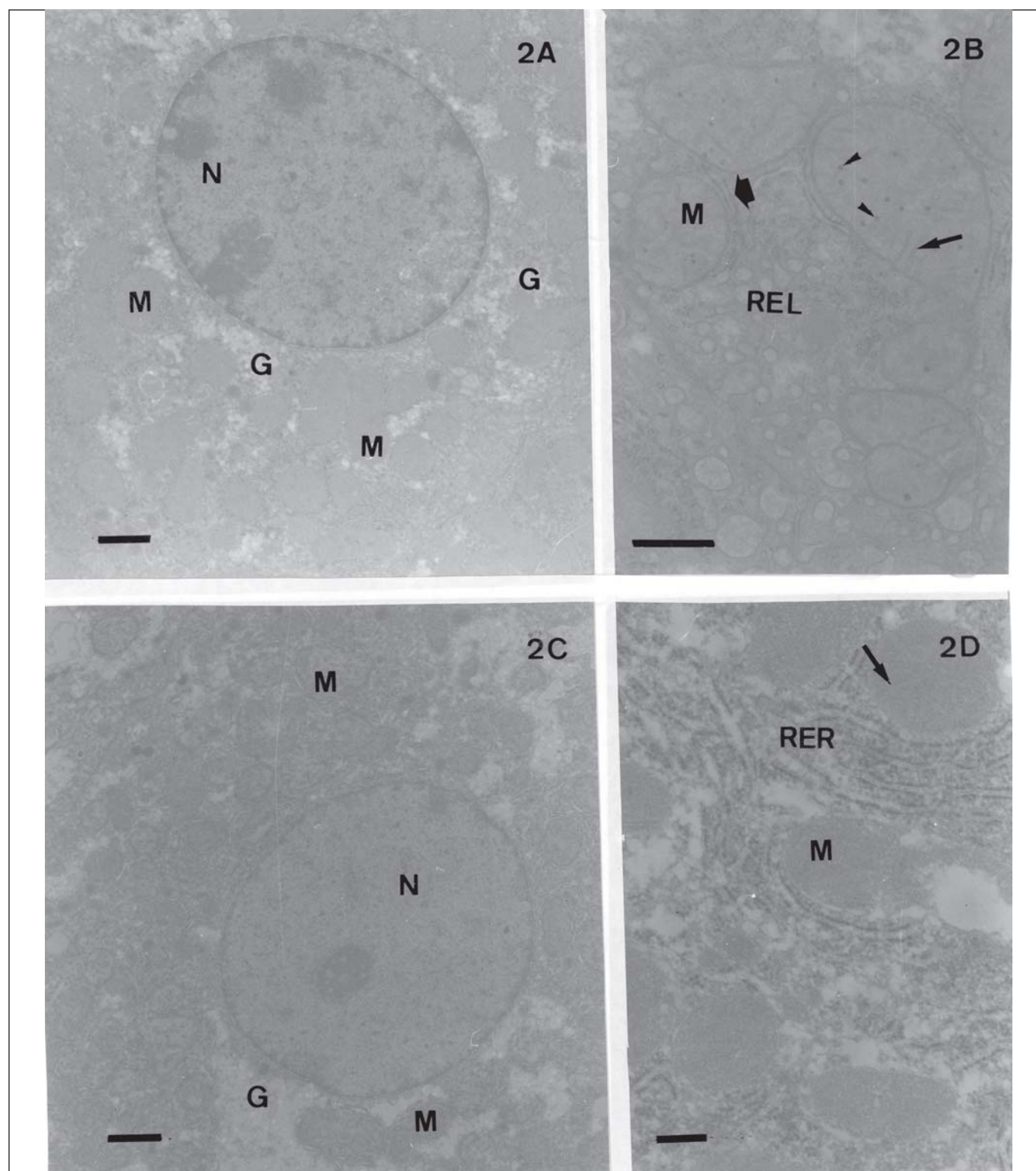
Os resultados apresentados pela fixação com o glutaraldeído e com Karnovsky foram semelhantes, pois ambos apresentaram ótima preservação de estruturas. Organelas como o RER, complexo de Golgi, mitocôndrias, REL foram facilmente identificados. O núcleo também mostrou estruturas distintas com nucléolo evidente.

O paraformaldeído embora utilizado em ME apresentou uma preservação menos eficiente que o glutaraldeído e o Karnovsky. Foi possível observar que algumas mitocôndrias sofreram degeneração. Este fixador não é tão eficaz quanto o glutaraldeído para a morfologia celular, embora tenha como característica a penetração rápida nos tecidos. No entanto, as ligações cruzadas são mais lentas que o glutaraldeído, inclusive, algumas podem ser revertidas durante incubações com tampão<sup>3,5</sup>. Devido à estas características é muito utilizado na citoquímica em Microscopia Eletrônica de Transmissão<sup>17</sup>. Como este fixador não reage com a maioria dos polissacarídeos, observou-se extensa extração de glicogênio no material fixado com o paraformaldeído<sup>2</sup>.

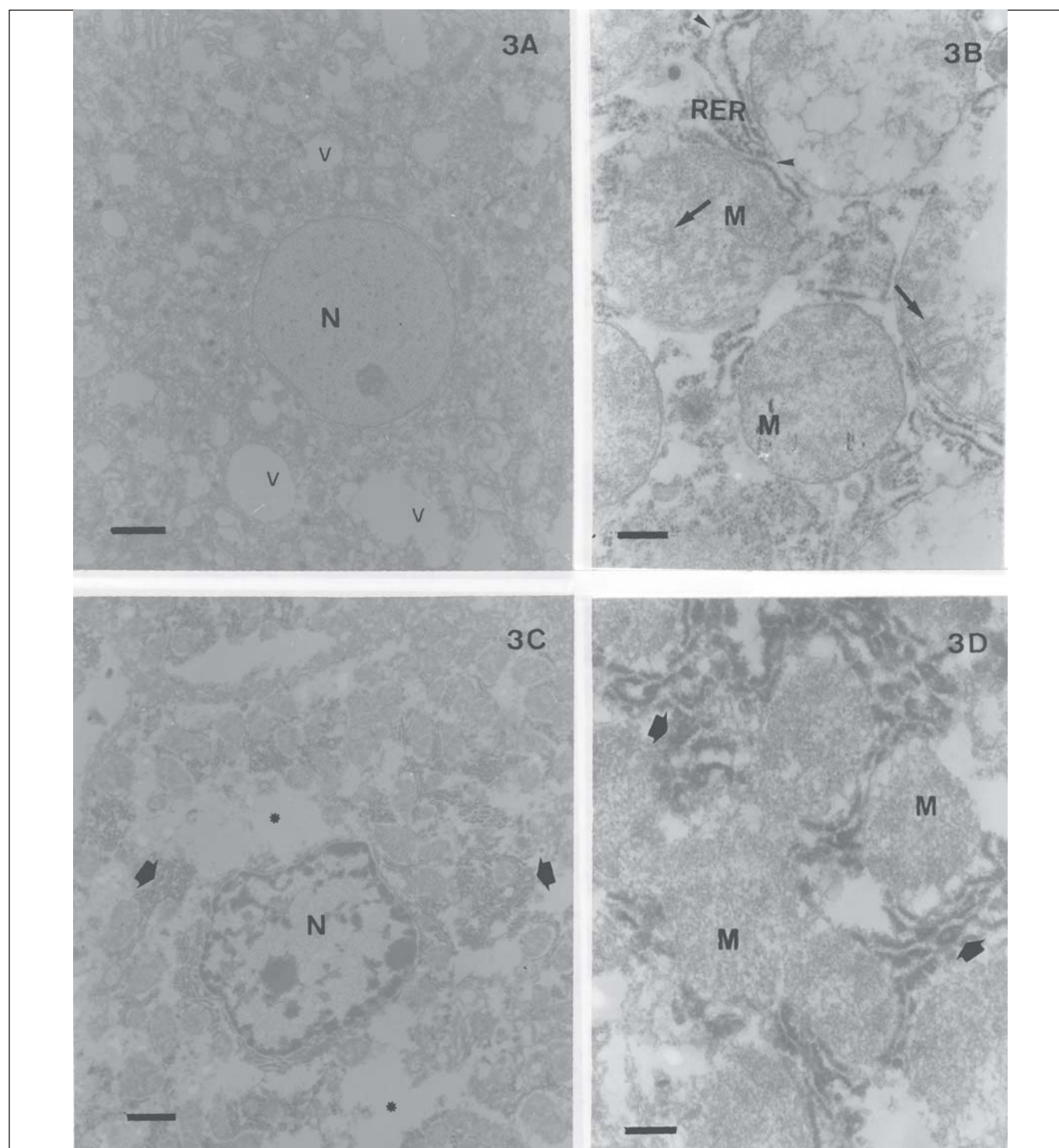
Embora o glutaraldeído, o paraformaldeído ou a combinação dos dois (Karnovsky) seja uma escolha universal de fixador<sup>1</sup>, eles não são adequados se usados isoladamente, porque os aldeídos não tem ação sobre alguns componentes



**Figura 1A.** Corte de fígado de camundongo fixado com o fixador de Karnovsky. Os hepatócitos mostram-se bem preservados. As organelas citoplasmáticas apresentam-se homogeneamente dispersas, grânulos de glicogênio (G) mostram-se levemente extraídos. As membranas dos hepatócitos (seta) encontram-se justapostas. N- núcleo. Barra: 1,0  $\mu$ m. **Figura 1B.** Eletromicrografia do mesmo material mostra mitocôndrias (M) com cristas mitocondriais (seta) e grânulos de cálcio (cabeça de seta) em seu interior. O retículo endoplasmático rugoso disperso entre as mitocôndrias e alguns grânulos de glicogênio (G). Barra: 0,5  $\mu$ m. **Figura 1C.** Eletromicrografia de outra região do citoplasma do hepatócito fixado com Karnovsky mostrando o complexo de Golgi (seta grossa), o retículo endoplasmático liso (REL) e mitocôndrias (M) bem preservados. Barra: 0,5  $\mu$ m.



**Figura 2A.** Fígado de camundongo fixado com glutaraldeído apresenta numerosas mitocôndrias (M) e regiões com grânulos de glicogênio mais extraídos (G). N- núcleo. Barra: 1,2  $\mu$ m. **Figura 2B.** Eletromicrografia em maior aumento do mesmo material mostra mitocôndrias (M) com presença de cristas (seta) e grânulos de cálcio (cabeça de seta). Observa-se retículo endoplasmático liso (REL) e retículo endoplasmático rugoso (seta grossa) envolvendo as mitocôndrias. Barra: 0,5  $\mu$ m. **Figura 2C.** Corte de fígado de camundongo fixado com paraformaldeído mostra mitocôndrias (M) preservadas e outras degeneradas no citoplasma do hepatócito. Observa-se regiões com extração de glicogênio (G). N - núcleo. Barra: 1,2  $\mu$ m. **Figura 2D.** Eletromicrografia em maior aumento do material fixado com paraformaldeído mostra RER em grande quantidade e mitocôndrias com ausência de cristas e grânulos; no canto superior direito, uma mitocôndria apresenta traços de cristas (seta). Barra: 1,0  $\mu$ m.



**Figura 3A.** Corte de fígado de camundongo fixado com formaldeído comercial mostra um grande número de vacúolos citoplasmáticos (v) de diferentes tamanhos e formatos. É difícil distinguir as organelas devido a grande extração sofrida pela célula. N- núcleo. Barra: 1,2  $\mu$ m. **Figura 3B.** Eletromicrografia em maior aumento de material fixado com formaldeído mostra mitocôndrias (M) dilatadas e algumas degeneradas, mas pode-se observar a presença de resquícios de cristas mitocondriais (seta). O RER apresenta-se fragmentado em algumas regiões e em outras regiões há ausência de ribossomos na membrana do retículo (cabeça de seta). Barra: 0,5  $\mu$ m. **Figura 3C.** Em fígado de camundongo fixado com o líquido de Bouin observa-se grandes regiões vazias ( \* ) e agregados de organelas que lembram mitocôndrias e retículo endoplasmático rugoso (seta grossa). N - núcleo. Barra: 1,2  $\mu$ m. **Figura 3D.** Observação em maior aumento do mesmo material mostra que as mitocôndrias (M) não estão envolvidas por membrana e em seu interior há um material granular. Observa-se também grumos de membranas elétrons densas (seta grossa) provavelmente originado da reação de algum componente do fixador com o RER. Barra: 1,0  $\mu$ m.

celulares, como os lipídeos, assim, no caso de uma fixação primária, os lipídeos seriam extraídos durante a desidratação<sup>3,5</sup>. Para eliminar este problema uma segunda fixação com o tetróxido de ósmio se faz necessário<sup>5</sup>.

O tecido fixado com formaldeído comercial, normalmente utilizado em microscopia de luz mostrou intensa extração e a formação de vacúolos de diferentes formatos, tamanhos e de aspecto vazio. Sabe-se que espaços vazios não são compatíveis com a vida<sup>2</sup>. Regiões elétrons transparentes de qualquer tamanho nas eletromicrografias são indicativos de extração artefactual do material celular e a fixação é a causa provável deste problema, porque o fixador ideal deve imobilizar e insolubilizar o material celular<sup>2</sup>. A presença de metanol na formulação do formaldeído torna-o um fixador coagulante sobre as proteínas, precipitando as mesmas permanentemente e alterando sua configuração<sup>5</sup>. As interrupções na continuidade da membrana do retículo endoplasmático rugoso e a ausência de ribossomos aderidos à membrana em algumas regiões são provavelmente artefatos originados pela fixação parcial das células.

O líquido de Bouin é conhecido como fixador para microscopia de luz, mas não há relatos de sua utilização em microscopia eletrônica. Devido à mistura de diferentes compostos em sua constituição torna-se inadequado para uso em MET. O ácido pícrico quando decomposto precipita e aglutina as proteínas formando picratos de proteínas. Por outro lado, o ácido acético precipita proteínas nucleares, mas não as citoplasmáticas e o formaldeído altera a estrutura das proteínas. Além disso, o líquido de Bouin destrói o complexo de Golgi e lipídeos<sup>11</sup>. As eletromicrografias mostraram grumos de membranas de RER e precipitados elétrons densos aderidos a essas membranas, provavelmente originados dos ribossomos. Não foi possível observar outras estruturas citoplasmáticas devido à grande extração sofrida no citoplasma. O núcleo apresentou grumos de cromatina bastante elétrons densa.

Além da má fixação e grande extração provocada pelo formaldeído e pelo líquido de Bouin, estes fixadores não foram tamponados e seus pHs eram bastante diferentes do pH fisiológico do tecido (formaldeído pH 5,0 e Bouin pH 2,5). Geralmente os tecidos apresentam um pH fisiológico na ordem de 6,8 a 7,4, pequenas mudanças no pH do fixador podem trazer grandes mudanças dentro da célula, relacionadas à consistência, seletividade da membrana e atividade enzimática celular. Dessa forma, tamponando a solução fixadora a provável acidificação pode ser neutralizada, minimizando os danos aos tecidos<sup>3,5</sup>. Wrigglesworth e Packer<sup>20</sup> demonstraram que ocorrem mudanças conformacionais de proteínas dependentes de pH na membrana mitocondrial podendo levar a alterações reversíveis na ultraestrutura da membrana. Como as proteínas são responsáveis pela estrutura característica de uma célula e o peso molecular de proteínas é fortemente dependente de pH, a importância do mesmo no fixador é óbvia.

O experimento proposto demonstrando a atuação de diferentes fixadores no fígado de camundongo alcançou os objetivos desejados. Os alunos puderam perceber as variações

na morfologia e a preservação ou extração de material celular dependendo do fixador utilizado. Este experimento mostrou que os fixadores glutaraldeído e o Karnovsky são os melhores fixadores primários e os fixadores comumente utilizados em microscopia de luz ocasionam grandes artefatos às células quando examinadas ao Microscópio Eletrônico de Transmissão.

## REFERÊNCIAS

1. Baker JR The fine structure produced in cells by fixatives. **JIR Microsc Soc**, 84: 115, 1965.
2. Bowers B, Maser M. Artifacts in fixation for transmission electron microscopy. In: RFE Crang and KL Klomparens. **Artifacts in Biological Electron Microscopy**. Plenum Press, New York., P 13-42, 1988.
3. Glauert AM **Practical methods in Electron microscopy - Fixation, dehydration and embedding of biological specimens**. Strangeways Research Laboratory, Cambridge. North-Holland Publishing Company, Amsterdam, Oxford; 1975.
4. Glauert AM, Rogers GE, Glauert RH. A new embedding medium for electron microscopy. **Nature, London**, 178: 803, 1956.
5. Hayat MA. **Principles and techniques of electron microscopy: Biological applications**. Van Nostrand Reinhold, New York; 1970.
6. Holt SJ, Hicks RM. Studies on formalin fixation for electron microscopy and cytochemical staining purposes. **J Biophys Biochem Cytol** , 11: 31, 1961.
7. Karnovsky MJ. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. **J Cell Biol** , 27: 137 A, 1965.
8. Lewis PR, Knight DP, Williams MA. Staining methods for thin sections, in : AM Glauert, ed. **Practical methods in electron microscopy**. North-Holland, Amsterdam; 1974.
9. Luft JH. Improvements in epoxy resin embedding methods. **J. Biophys Biochem. Cytol.** , 9: 409, 1961.
10. Palade GE. A study of fixation for electron microscopy. **J. Exp Med**, 95:285, 1952.
11. Pease DC. **Histological technique for electron microscopy**. 2<sup>nd</sup> edition. Academic Press, New York and London; 1964.
12. Porter KR; Blum J. A study of microtomy for electron microscopy. **Anat Rec**, 117: 685, 1953.
13. Reynolds ES. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. **J. Cell. Biol.** , 17:208, 1963.
14. Riemersma JC. Osmium tetroxide fixation of lipids for electron microscopy. A possible reaction mechanism. **Biochim. Biophys Acta**, 152: 718, 1968.
15. Robertson JD, Bodenheimer TS, Stage DE The ultrastructure of Maunther cell synapses and nodes in goldfish brain. **J. Cell. Biol.** , 19: 159, 1963.
16. Sabatini DD, Bensch K, Barnett RJ. Cytochemistry and electron microscopy. The preservation of cellular ultrastructure and enzymatic activity by aldehyde fixation. **J. Cell. Biol.**, 17: 19, 1963.
17. Souto Padron T Imunocitoquímica : Técnicas Pré e Pós-Inclusão. In: Haddad A et al., editor W. de Souza. **Técnicas Básicas de Microscopia Eletrônica Aplicadas às Ciências Biológicas**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia, P 116-25, 1998.
18. Stein O, Stein Y. Light and electron microscopy radioautography of lipids: techniques and biological applications. **Adv. Lipid. Res.** , 9:1, 1971.
19. Strangeways TSP, Canti RG. The living cell in vitro as shown by darkground illumination and the changes induced in such cells by fixing reagents. **Q. JI microsc. Sci.**, 71: 1, 1927.
20. Wrigglesworth JM, Packer L. pH-dependent conformational change in submitochondrial particles. **Arch. Biochem. Biophys.**, 133: 194, 1969.



# Detecção de *Cryptosporidium* em amostras fecais por técnica de Nested-PCR e comparação com métodos imunológico e parasitológico

## Detection of *Cryptosporidium* in fecal samples tested by Nested-PCR and comparison between immunologic and parasitologic methods.

RIALA6/1006

Aparecida Helena de Souza GOMES<sup>1\*</sup>; Hermínia Yohko KANAMURA<sup>2</sup>; Marcos Eduardo de ALMEIDA<sup>2</sup>; Ana Julia Urias dos Santos ARAUJO<sup>2</sup>

\* Endereço para correspondência: Rua Júlio Hanser, 49 – Sorocaba-SP, CEP 18031-490 – e-mail: asgomes.sor@terra.com.br

<sup>1</sup> Divisão de Laboratórios Regionais - Instituto Adolfo Lutz – Laboratório 1 de Sorocaba – SP – Brasil

<sup>2</sup> Departamento de Biologia da Universidade de Taubaté – UNITAU -Taubaté – SP

### RESUMO

A criptosporidiose é causada por protozoários do gênero *Cryptosporidium*. A doença se caracteriza por diarreia aguda no homem e em outros animais. O diagnóstico laboratorial é feito pela detecção do parasito por métodos parasitológicos, imunológicos ou moleculares. Amostras fecais de 29 pacientes portadores de HIV e com AIDS analisadas pelos métodos parasitológico (Kinyoun) e imunológico (ELISA) foram submetidas ao método molecular (Nested-PCR). Destas, 15 amostras foram positivas para *Cryptosporidium sp* no exame parasitológico e 14 negativos para *Cryptosporidium*, mas positivos para outras espécies parasitárias ou bacilos álcool-acido-resistentes. Pela Nested-PCR foram encontradas 16 amostras positivas, e destas, 11 apresentaram resultados concordantes com o exame parasitológico e cinco não. Essas cinco amostras discordantes foram também negativas pelo ELISA. Das 15 amostras positivas pelo exame parasitológico, duas foram negativas pelo Nested-PCR e por ELISA. Os métodos moleculares podem-se constituir em importante ferramenta diagnóstica nos casos com suspeita clínica de criptosporidiose nos estudos epidemiológicos, permitindo a caracterização genotípica do parasito e auxiliando na investigação das rotas de transmissão. As discordâncias observadas entre os diferentes métodos precisam ser mais bem investigadas.

**Palavras-Chave.** *Cryptosporidium*, diagnóstico por métodos molecular, imunológico, parasitológico

### ABSTRACT

*Cryptosporidium* is a coccidian protozoan that causes diarrhea in human beings, domestic animals, and other vertebrates. Although cryptosporidiosis is self-limited disease in healthy individuals, patients with AIDS usually go through a prolonged life-threatening diarrhea. Cryptosporidiosis laboratory diagnosis has been performed by means of parasite detection using parasitological, immunological, or molecular methods. In the present study 29 samples were selected, being 15 positive and 14 negative for *Cryptosporidium* on Kinyoun staining. All of 29 fecal samples were tested on Nested PCR (N-PCR), and 16 out of 29 samples were N-PCR positive. Among these 16 N-PCR positive samples, 11 were positive on EIA and Kinyoun staining, and five were negative on both techniques. Kinyoun staining detected four positive samples though two of them were negative on N-PCR and EIA. The use of molecular method may improve the diagnosis as the reported sensitivity and specificity rates have been higher the conventional techniques as morphology-based methods. Besides, molecular methods have lately been used to characterize the different genotype of *C. parvum*. Based on the data observed in the present study concerning the considerable discrepancies of results among three laboratory techniques, further investigations have to be performed.

**Key Words.** *Cryptosporidium*, diagnosis methods, molecular, immunological and parasitological.

## INTRODUÇÃO

*Cryptosporidium sp.*, protozoário da sub classe *Coccidia*, é agente causador de diarreia aguda no homem e outros animais. A gravidade da criptosporidiose está ligada às condições imunológicas do hospedeiro, podendo-se apresentar de forma branda e autolimitada<sup>23</sup> ou como doença grave e crônica, como ocorre nos pacientes imuno-comprometidos, principalmente com AIDS<sup>18</sup>.

A criptosporidiose humana pode ser causada por diferentes espécies de *Cryptosporidium*, sendo reconhecidos dois ciclos de transmissão: o antroponótico, no qual o agente envolvido seria *Cryptosporidium hominis* (anteriormente denominado *Cryptosporidium parvum* genótipo I), e zoonótico, no qual estariam envolvidas diferentes espécies, principalmente *Cryptosporidium parvum*<sup>10,25</sup>. A transmissão do parasito ocorre principalmente por via fecal-oral, com a ingestão de alimentos e água contaminados com fezes de humanos ou animais infectados<sup>8,12</sup>.

O diagnóstico laboratorial normalmente é feito pela demonstração de oocistos de *Cryptosporidium sp* nas fezes, utilizando-se para concentração, mais comumente, o método de sedimentação em formalina-acetato de etila<sup>5</sup> e para visualização dos oocistos, diferentes técnicas de coloração, como Ziehl-Neelsen modificado, Kinyoun, Safranina, Auramina e outras<sup>13</sup>. Este método parasitológico apresenta relativa facilidade no preparo dos corantes e reagentes, exige equipamentos já existentes na maioria dos laboratórios que realizam o diagnóstico de doenças infecciosas e parasitárias. Entretanto, o preparo do esfregaço e a coloração requerem muitas etapas, a microscopia exige a observação em todos os campos, acarretando demora, dificultando assim sua utilização em larga escala<sup>14,17</sup>.

Novos testes, baseados em princípios imunológicos foram desenvolvidos para análise em amostras fecais. O teste imunoenzimático (ELISA) para detecção de coproantígenos nas fezes e a reação de imunofluorescência direta (IFD), empregando-se anticorpos monoclonais anti-*Cryptosporidium* marcados com isotiocianato de fluoresceína. Estes testes quando avaliados demonstraram alta sensibilidade e passível de uso para processamento em grande quantidade de amostras. Embora alguns autores revelassem que os custos do *Kit* de ELISA se apresentaram mais baratos que o de imunofluorescência ou mesmo o exame parasitológico, é necessário o emprego de alguns equipamentos como leitor de ELISA e microscópio para imunofluorescência<sup>9,14,17</sup>. No Brasil estes *Kits* não estão disponíveis no mercado e não se tem relato de experiências ou uso dos mesmos na rotina laboratorial para detecção de oocistos de *Cryptosporidium* em amostras fecais.

Diferentes técnicas da biologia molecular para detectar *Cryptosporidium* em amostras ambientais e fecais, como a PCR (Reação da Polimerase em Cadeia), foram desenvolvidas não só com o objetivo de detectar oocistos, como também para estudos epidemiológicos. Estas técnicas têm a vantagem de

permitir a caracterização genotípica das espécies de *Cryptosporidium* responsáveis por surtos e agravos, fornecendo subsídios para investigação de prováveis fontes e vias de transmissão, por outro lado o custo é elevado<sup>3,10,11,16,22</sup>.

No Estado de São Paulo, nem todos os laboratórios clínicos realizam exames parasitológico para pesquisa de parasitos oportunistas, no caso específico para criptosporidiose<sup>15</sup> demonstrando a não inclusão de métodos específicos na rotina de exame parasitológico de fezes. Este fato contribui para o não conhecimento da prevalência real da criptosporidiose em nosso meio.

O objetivo do presente estudo foi comparar e avaliar os resultados obtidos pelo método molecular (Nested-PCR), com aqueles obtidos pelos métodos parasitológico (Kinyoun) e imunológico (ELISA) na detecção de *Cryptosporidium sp* em amostras fecais.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Amostras fecais

Foram utilizadas 29 amostras fecais, provenientes de pacientes portadores de HIV e com AIDS, atendidos no ambulatório e clínica do Conjunto Hospitalar de Sorocaba-SP. Estas foram divididas em 3 partes: a primeira parte foi utilizada para realizar os métodos parasitológicos, a segunda parte congelada para posterior realização do método imunológico e a terceira parte para análise do método molecular.

### Método parasitológico

Todas as amostras já haviam sido processadas anteriormente pelos métodos parasitológicos como: Hoffmann, Kato-Katz, Rugai e pelo método de concentração utilizando formol-éter. Após o método de concentração onde foram retiradas impurezas e gorduras o sedimento obtido foi utilizado para preparar esfregaços fecais de cada amostra, os quais foram corados por duas diferentes técnicas: primeiro por auramina, utilizada como triagem; sendo os esfregaços examinados em microscópio de fluorescência com objetiva de 40X e, em segundo, utilizando-se a mesma lâmina de cada amostra, pela coloração de Kinyoun<sup>13</sup>, sendo as lâminas examinadas ao microscópio comum em objetiva de imersão (100X), onde os oocistos antes fluorescentes pela auramina, passaram a apresentar cor vermelho brilhante após a coloração de Kinyoun.

### Método imunológico

As amostras fecais foram descongeladas e submetidas ao teste imunoenzimático de ELISA para pesquisa de coproantígenos. Utilizou-se o *kit* comercial, ProSpecT Ensaio Imunoenzimático - *Cryptosporidium* em microplaca (Alexon inc. Biobrás Diagnósticos). As amostras fecais foram diluídas em tampão para diluição de amostra (TDA) conforme instruções do fabricante e colocadas nos orifícios da placa sensibilizada com o anticorpo anti-CSA (*Cryptosporidium* soluble antigen). Após incubação e lavagem com solução salina tamponada

contendo timerosal a 0,1%, foi adicionado o segundo anticorpo, constituído por gamaglobulina total de coelho anti-CSA marcado com a enzima peroxidase. Após nova incubação e lavagem, foi acrescentada a mistura cromógena tetrametilbenzidina + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (TMB). A placa foi coberta e mantida a temperatura ambiente (28°C) durante 10 minutos. A reação enzimática foi interrompida, adicionando-se solução de ácido sulfúrico (2%). Utilizaram-se controles positivo e negativo fornecidos no *Kit*. Os testes foram lidos visualmente e em leitor de ELISA (Labsystems), em comprimento de onda de 450 nm. A ausência de cor indicou resultado negativo, ou seja, não ocorrência de complexo anticorpo-antígeno-anticorpo.

### Método molecular

Para a realização da Nested-PCR foi efetuada a extração de DNA das amostras fecais conforme protocolo modificado descrito por Da Silva<sup>3</sup>, utilizando-se o sistema comercial Fast DNA *kit* (BIO 101, Inc., Vista, CA). Uma alíquota de 400 µL de cada amostra fecal foi lavada por duas vezes, por 5 minutos, em PBS-EDTA (tampão fosfato de sódio 0,01 M, pH 7,2, contendo 0,01 M de EDTA) por centrifugação a 14000 rpm a 4°C. Em seguida, em um tubo com capacidade para 2 mL, contendo matriz de lise (Multi Mix 2 Matrix, Cat #6560-215), foram adicionados 300 µL de cada amostra lavada, 400 µL de solução de lise celular (Cell Lysis/DNA Solubilizing Solution for Vegetation - CLS-VF-Cat. #6540-402), 200 µL de solução de precipitação de proteínas (Protein Precipitation Solution - PPS, Cat. #6540-403) e 100 µL polivinil pirrolidona (PVP, Cat #85645-2, Aldrich Chemical Company, Inc., Milwaukee, WWI). As soluções CLS-VF e PVP foram usadas para maximizar a remoção de carboidratos e compostos fenólicos das fezes. Na seqüência, a mistura foi homogeneizada em agitador de tubo (Vortex) na potência máxima durante 1 minuto, para promover o rompimento dos oocistos presentes nas amostras e posteriormente centrifugada a 14000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante, que continha o DNA, foi transferido para um outro tubo e misturado a 600 µL de matriz de captura (Binding Matrix, Cat. #6540-408). O material foi homogeneizado manualmente por inversão do tubo e deixado por 5 minutos a temperatura ambiente e, posteriormente, centrifugado a 14000 rpm durante 1 minuto. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspense em 500 µL de solução de cloreto de sódio diluído em etanol (SEWS-M, Cat.#6540-405) e a matriz de captura foi ressuspensa por meio de cuidadosas e sucessivas micropipetagens. A suspensão foi centrifugada a 14000 rpm por 1 minuto, sendo o sobrenadante novamente descartado. Uma segunda centrifugação a 14000 rpm por 10 segundos foi realizada para a remoção total da solução SEWS-M. O sedimento foi ressuspense em 100µL de solução de eluição de DNA (DES, Cat. #6540-406), incubado durante 3 minutos a temperatura ambiente e centrifugado por 2 minutos a 14000 rpm. O sobrenadante contendo DNA foi transferido para um tubo limpo.

Após o processo de extração, o DNA eluído foi submetido a processo de purificação, utilizando-se o QIAquick

PCR purification *kit* (Qiagen Inc., Santa Clarita, CA), com a finalidade de se remover completamente os inibidores de PCR<sup>3</sup>. Assim, 80 µL do DNA extraído foram misturados com 400 µL do tampão de adsorção (PB), aplicados na coluna QIAquick e centrifugados a 13000 rpm por 1 minuto. Em seguida, foram adicionados 750 µL de tampão de lavagem (PE) e a solução foi centrifugada duas vezes a 13000 rpm por 1 minuto, para que todo o tampão fosse removido. Nestas três etapas as soluções filtradas através da coluna foram retidas em seu tubo de suporte, e foram descartadas. Finalmente, a coluna foi transferida para um tubo limpo, com capacidade de 1,5 mL e, no centro da coluna, foram adicionados 30 µL de tampão de eluição (EB: 10 mM TRIS-HCl, pH 8,5) para eluir o DNA da coluna de sílica gel. Após repouso por 1 minuto, o conjunto foi centrifugado a 13000 rpm por 1 minuto e o DNA recuperado no filtrado final. Todas as soluções tampão mencionadas estavam contidas no *kit* de purificação. O DNA foi armazenado sob congelamento a -20°C.

A amplificação do DNA foi realizada por Nested-PCR, empregando-se na primeira reação de amplificação o protocolo descrito por Pedrazza-Dias et al.<sup>22</sup>. Dessa forma, na REAÇÃO 1, um segmento de 769pb do gene COWP foi amplificado com os “primers” BCOWPF (5'-ACC GCT TCT CAA CAA CAA TCT TGT TCC TC-3') e BCOWPR (5'-CGCACCTGT TCC CACTCA ATG TAA ACC CC-3') e, em seguida, baseando-se em Spano<sup>23</sup>, o produto obtido foi submetido à REAÇÃO 2 com os “primers” CRY9 (5'GGACTGAAA TACAGG CAT TAT CTT G3') e CRY15 (5'GTA GAT AAT GGA AGA GAT TGT G3'), cujos produtos esperados são de 553 pb.

As reações de amplificação foram preparadas para um volume final de 25 µL com 2,5 µL do DNA extraído; empregando tampão enzima (20 mM de tris-HCL pH 8,4; 50 mM de KCL); 1,5 mM de MgCL<sub>2</sub>; 0,25 mM de cada desoxinucleotídeo (dNTP); 10 pmol de cada “primer” e 1,5 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen Life Technologies, Cat. # 18038-42).

As condições de amplificação em termociclador (Mastercycle Gradient-Eppendorf) foram programadas segundo cada produto desejado como se segue:

**REAÇÃO 1: Desnaturação inicial** – incubação a 94°C por 5 minutos, **Amplificação** (30 ciclos) – **hibridização** a 65°C por 60 segundos, **polimerização** a 72°C por 60 segundos e desnaturação a 94°C por 60 segundos; **Extensão final** a 72°C por 10 minutos e resfriamento a 4°C e REACAO 2: semelhante a REACAO 1, exceto pela **Amplificação** (30 ciclos) – **hibridização** a 55°C por 30 segundos, **polimerização** a 72°C por 50 segundos e desnaturação a 94°C por 50 segundos.

Os produtos das reações foram detectados por meio de eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo, visualizados em transiluminador ultravioleta e, em seguida, digitalizados (Kodak Digital Science 1D™).

### Análise estatística

Os cálculos relativos ao coeficiente Kappa para a análise de concordância entre os resultados obtidos nos diferentes métodos diagnósticos foram realizados pelo programa Epi-Info<sup>4</sup>.

Para interpretação dos valores do coeficiente Kappa utilizaram-se os critérios apresentados por Fleis (1985)<sup>7</sup>.

## RESULTADOS

A Tabela 1 mostra que as quinze amostras fecais apresentaram resultado positivo para *Cryptosporidium* pelo método parasitológico (KINYOUN), duas mostraram resultado negativo pelo método de ELISA (amostras 4 e 9) e quatro foram negativas pelo método N-PCR (amostras nº 4, 9, 12 e 15). As amostras 4, 9 e 15 foram avaliadas mais de uma vez pelos métodos parasitológico e ELISA.

Na análise das 14 amostras fecais negativas para *Cryptosporidium* pelo método parasitológico (KINYOUN) mas positivas para outras parasitoses detectadas anteriormente pelos métodos parasitológicos (Direto, Hoffmann, Kato-Katz e Rugai) ou com presença de Bacilos Álcool Ácido Resistente (BAAR), pode-se observar que as amostras nº 2, 3, 9, 11 e 12 apresentaram resultados positivos para *Cryptosporidium* pelo método molecular (N-PCR), mas foram todas negativas no método imunológico (ELISA). As amostras 2, 3, 9, 11 e 12 foram avaliadas mais de uma vez pelo método ELISA (Tabela 2).

A análise comparativa dos resultados obtidos nos métodos de detecção de *Cryptosporidium* (ELISA e KINYOUN) e (N-PCR e KINYOUN) pode ser observada na Tabela 3. Das 29 amostras testadas no método de KINYOUN, 15 foram positivas

e 14 foram negativas. No método ELISA, 13 foram positivas e 16 foram negativas. No método N-PCR, 16 foram positivas e 13 foram negativas. Os índices de concordância e discordância para os métodos estudados apresentaram coeficiente Kappa = 0,862 para os métodos (ELISA e KINYOUN) e coeficiente Kappa = 0,378 para os métodos (N-PCR e KINYOUN).

## DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

No presente trabalho a coloração de auramina como método de triagem permitiu observar os oocistos de *Cryptosporidium* fluorescentes, facilitando assim um rastreamento rápido na lâmina com a objetiva de 40X. Nas lâminas com organismos fluorescentes, foi feita a confirmação por meio da coloração de Kinyoun, identificando os oocistos de *Cryptosporidium* pelas suas características morfológicas e pela coloração rosa intenso ou vermelho brilhante.

A sensibilidade do método é diminuída em amostras contaminadas com grande quantidade de leveduras ou baixa concentração de oocistos nas fezes e a correta identificação dos oocistos ao microscópio requer um profissional experiente e bem treinado. Estas observações já foram anteriormente apontadas por outros autores<sup>6,14,17</sup>.

Em nosso estudo os resultados obtidos no método ELISA apresentou índice Kappa de 0,862 em relação ao método parasitológico (Tabela 3), nível de concordância

**Tabela 1.** Resultados obtidos em amostras fecais de pacientes portadores do vírus HIV e com AIDS utilizando os métodos imunológico (ELISA) e molecular (N-PCR) para 15 amostras positivas para *Cryptosporidium* pelo método parasitológico (KINYOUN), sendo algumas associadas a outras parasitoses detectadas anteriormente pelos métodos parasitológicos (Direto, Hoffmann, Kato-Katz e Rugai).

| AMOSTRA | OUTROS PARASITOS ASSOCIADOS                          | KINYOUN | ELISA | N-PCR |
|---------|--|---------|-------|-------|
| 1       | <i>Cryptosporidium</i>                               | P       | P     | P     |
| 2       | <i>Cryptosporidium</i>                               | P       | P     | P     |
| 3       | <i>Cryptosporidium</i>                               | P       | P     | P     |
| 4       | <i>Cryptosporidium</i>                               | P*      | N*    | N     |
| 5       | <i>Cryptosporidium</i>                               | P       | P     | P     |
| 6       | <i>Entamoeba coli</i> e <i>Cryptosporidium</i>       | P       | P     | P     |
| 7       | <i>Ascaris lumbricoides</i> e <i>Cryptosporidium</i> | P       | P     | P     |
| 8       | <i>Cryptosporidium</i>                               | P       | P     | P     |
| 9       | <i>Cryptosporidium</i>                               | P*      | N*    | N     |
| 10      | <i>Cryptosporidium</i>                               | P       | P     | P     |
| 11      | <i>Cryptosporidium</i>                               | P       | P     | P     |
| 12      | <i>Cryptosporidium</i>                               | P       | P     | N     |
| 13      | <i>Cryptosporidium</i>                               | P       | P     | P     |
| 14      | <i>Giardia duodenalis</i> e <i>Cryptosporidium</i>   | P       | P     | P     |
| 15      | <i>Cryptosporidium</i>                               | P*      | P*    | N     |

P = Positivo; N = Negativo; \* = amostras avaliadas mais de uma vez

ELISA = Ensaio imunoenzimático; N-PCR = "Nested"- Reação de Polimerase em Cadeia; KINYOUN = coloração para análise parasitológica

aceitável entre os métodos<sup>7</sup>. Apenas duas amostras apresentaram resultados discordantes entre as 29 amostras testadas, foram positivas pelo método morfológico e negativas pelo ELISA (Tabelas 1 e 2). A especificidade do ELISA foi máxima (100%), quando testadas com 14 amostras negativas para *Cryptosporidium* pelo método parasitológico (Tabela 2). Os dois resultados negativos obtidos no teste ELISA, podem ter ocorrido por fatores de interferência como presença de inibidores, baixa concentração de oocistos, variação antigênica entre espécies e outros<sup>14</sup>.

Neste trabalho, o método de ELISA apresentou muita facilidade no manuseio e foi de rápida execução, levando em

consideração o número de testes realizados. A leitura pode ser feita visualmente ou em leitor de ELISA, não tendo sido observados resultados inconclusivos. As instruções contidas no *kit* comercial empregado não contemplam informações quanto à espécie ou o genótipo de *Cryptosporidium* utilizado para a produção de anticorpo anti-CSA. A possibilidade de ocorrência em nosso meio de diferentes espécies de *Cryptosporidium*, apresentando configurações antigênicas não reconhecidas pelo anticorpo anti CSA do *kit*, poderia justificar os dois resultados negativos. Doing et al.<sup>6</sup> mencionam que a sensibilidade do ELISA é superior ao método parasitológico, mas citam problemas com relação à especificidade.

**Tabela 2.** Resultados obtidos em amostras fecais de pacientes portadores do vírus HIV e com AIDS utilizando os métodos imunológico (ELISA) e molecular (N-PCR) para 14 amostras negativas para *Cryptosporidium* no método parasitológico (KINYOUN), mas positivas para outras parasitoses detectadas anteriormente pelos métodos parasitológicos (Direto, Hoffmann, Kato-Katz e Rugai) ou amostras com presença de Bacilo Álcool Ácido Resistente (BAAR).

| AMOSTRA | AGENTES PARASITÁRIOS                                 | ELISA | N-PCR |
|---------|--|-------|-------|
| 1       | <i>Giardia duodenalis</i>                            | N     | N     |
| 2       | <i>Giardia duodenalis</i>                            | N*    | P     |
| 3       | <i>Giardia duodenalis</i>                            | N*    | P     |
| 4       | <i>Isospora belli</i>                                | N     | N     |
| 5       | <i>Entamoeba histolytica</i> + <i>Entamoeba coli</i> | N     | N     |
| 6       | <i>Strongyloides stercoralis</i>                     | N     | N     |
| 7       | <i>Strongyloides stercoralis</i> + Ancilostomatidae  | N     | N     |
| 8       | <i>Strongyloides stercoralis</i> + Ancilostomatidae  | N     | N     |
| 9       | Ancilostomatidae                                     | N*    | P     |
| 10      | Ancilostomatidae                                     | N     | N     |
| 11      | <i>Trichuris trichiura</i>                           | N*    | P     |
| 12      | <i>Endolimax nana</i>                                | N*    | P     |
| 13      | BAAR   | N     | N     |
| 14      | BAAR   | N     | N     |

P = Positivo; N = Negativo; \* = amostras analisadas mais de uma vez

ELISA = Ensaio imunoenzimático; N-PCR = "Nested"- Reação de Polimerase em Cadeia; KINYOUN = coloração para análise parasitológica

**Tabela 3.** Resultado comparativo entre os métodos imunológico (ELISA), molecular (N-PCR) e parasitológico (Kinyoun), para detecção de *Cryptosporidium* em 29 amostras fecais de pacientes portadores do vírus HIV e com AIDS.

|         | ELISA (1) |    | N-PCR (2) |    | TOTAL DE AMOSTRAS |    |
|---------|-----------|----|-----------|----|-------------------|----|
|         | P         | N  | P         | N  |                   |    |
| KINYOUN | P         | 13 | 2         | 11 | 4                 | 15 |
|         | N         | ∅  | 14        | 5  | 9                 | 14 |
| TOTAL   |           | 13 | 16        | 16 | 13                | 29 |

Índice Kappa (1) = 0,862; Índice Kappa (2) = 0,378

P = Positivo; N = Negativo; ∅ = Zero

ELISA = Ensaio imunoenzimático; N-PCR = "Nested"- Reação de Polimerase em Cadeia; KINYOUN = coloração para análise parasitológica

Diferentes protocolos foram propostos para detectar infecção por *Cryptosporidium* a partir de amostras fecais, por meio do método molecular<sup>2,19,20,22</sup>.

Os estudos realizados por Balatbat et al.<sup>2</sup>; Pedraza-Diaz et al.<sup>22</sup> demonstraram que algumas variações da técnica de PCR, como Nested-PCR, podem apresentar sensibilidade 100 vezes maior em relação à técnica de imunofluorescência. No presente trabalho utilizou-se a Nested PCR (N-PCR), realizando uma primeira amplificação gerando um fragmento de 769 pb, do gene COWP, com os “primers” BCOWPF e BCOWPR, e posteriormente uma segunda amplificação gerando um fragmento de 553 pb, com os “primers” CRY9 e CRY15.

A técnica de N-PCR possibilitou o encontro de cinco amostras positivas, que haviam sido negativas por Kinyoun e ELISA (Tabela 2). Entretanto, quatro amostras positivas pelo parasitológico e ELISA apresentaram resultados negativos por N-PCR (Tabela 1). Resultados negativos obtidos por método molecular, em amostras positivas no método morfológico, foram também observados por vários autores, que alegam diferentes fatores de interferência, como a baixa concentração de oocistos, condições inadequadas de armazenagem e conservação das amostras, existência de grande quantidade de substâncias inibidoras de PCR em material fecal, falhas na extração e outros<sup>2,3,11,19,20,21,22</sup>.

A coloração feita pelo Kinyoun pode ser ainda considerada como uma boa estratégia diagnóstica pra ser utilizado na rotina laboratorial, pois apresenta boa sensibilidade e baixo custo, embora apresente limitações quanto a subjetividade na microscopia e tempo para execução de todas as etapas.

O teste ELISA, devido à possibilidade de automação, constitui método de escolha para estudos epidemiológicos e investigação de surtos de diarreia, em situações onde há necessidade de processar grande número de amostras.

A introdução de um método molecular (PCR e N-PCR) aplicável ao diagnóstico da criptosporidiose tem como limitação o desenvolvimento de uma técnica de extração do DNA, de fácil execução e baixo custo, a partir de matéria fecal, uma vez que é comum a presença de inibidores de PCR neste tipo de material. O método molecular (N-PCR), necessita ainda de aprimoramentos quanto a sua praticidade de execução, antes de ser introduzida como método diagnóstico no nosso meio. A sua utilização abriu perspectivas para se introduzir estudos de caracterização genotípica dos isolados encontrados em indivíduos imunocomprometidos ou não, permitindo uma melhor investigação quanto às fontes de infecção nos vários surtos de diarreia por criptosporidiose que vem sendo relatados em nosso meio, principalmente em creches<sup>1,15</sup>. O desconhecimento por parte dos clínicos e demais profissionais da saúde com relação à importância de *Cryptosporidium* como um dos possíveis agentes patogênicos a serem pesquisados em situações de diarreia, deixam sem investigação casos de criptosporidiose e mesmo surtos de diarreia por este patógeno, pois a técnica de

concentração da amostra fecal pelo formol-éter e as técnicas de coloração (auramina e Kinyoun) não são normalmente utilizadas pelos laboratórios clínicos que realizam o exame parasitológico de fezes, portanto não detectam *Cryptosporidium*. O método específico além de auxiliar o clínico para uma conduta terapêutica correta, pode também, fornecer subsídios para estudos epidemiológicos, e nesses casos os métodos moleculares seriam de grande valia para a caracterização genotípica dos isolados.

Os métodos moleculares aplicados e adaptados para detecção e caracterização de *Cryptosporidium* em amostras ambientais, podem favorecer uma melhor compreensão dos mecanismos de transmissão desse parasito cosmopolita e de ampla distribuição em nosso meio.

## AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio à pesquisa concedido.

À Renata Alarcon bolsista da FAPESP na UNITAU-SP e Izabel M. Armelin funcionária do Instituto Adolfo Lutz – Laboratório I de Sorocaba pela colaboração prestada durante a execução dos ensaios laboratoriais.

## REFERÊNCIAS

1. Alcântara, L. M. et al. Infecção por *Cryptosporidium* em crianças de creche de uma comunidade marisqueira em Encarnação de Salinas – BA. **J. Bras. Parasitol.** Anais -XV Congresso Latino- Americano de Parasitologia (Suppl), 94, 2001 – São Paulo – Brasil.
2. Balatbat, A. B. et al. **Detection of *Cryptosporidium parvum* DNA in human feces by Nested PCR.** *J. Clin. Microbiol.*, **34**: 1769-72, 1996.
3. Da Silva, A. J. et al. Fast and reliable extraction of protozoan parasite DNA from fecal specimens. **Mol. Diagn.**, **4**: 57-64, 1999.
4. Dean A, G. et al. Epi Info, version 6: a word processing database, and statistics program for epidemiology on microcomputer. **Center of Disease Control on Prevention**, Atlanta, Georgia, U.S.A, 1994.
5. De Carli, G. A. Exame macroscópico e microscópico da amostra fecal fresca e preservada. In: \_\_ **Parasitologia Clínica**. São Paulo: Atheneu. 2001. p. 27-81.
6. Doing, K. M. et al. False positive results obtained with the Alexon ProSpect *Cryptosporidium* Enzyme Immunoassay. **J. Clin. Microbiol.** **37**: 1582-3, 1999.
7. Fleis, A. R. Clinical epidemiology. In: \_ **The architecture of clinical research**. Philadelphia: WB Saunders. 1985, p. 185-6.
8. Gamba, R. C. et al. Detections of *Cryptosporidium sp* oocysts in groundwater for human consumption in Itaquaquecetuba city, São Paulo – Brazil. **Braz. J. Microbiol.** **31**: 151-3, 2000.
9. Garcia, L. S; Shimizu, R. Y. Evaluation of nine immunoassay Kits (enzyme immunoassay and direct fluorescence) for detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* in human fecal specimens. **J. Clin. Microbiol.** **35**: 1526-9, 1997.
10. Gatei, W. et al. Molecular analysis of the 18S rRNA gene of *Cryptosporidium* parasites from patients with or without humam immunodeficiency virus infections living in Kenya, Malawi, Brazil, the United Kingdom, and Vietnam. **J. Clin. Microbiol.**, **41**: 1458-62, 2003.
11. Gobet, F. et al. A detection of *Cryptosporidium parvum* DNA in formed human feces by a sensitive PCR- based assay including Uracil-N-Glycosylase inactivation. **J. Clin. Microbiol.** **35**: 254-6, 1977.

12. Gomes, A. H. S. et al. Monitoramento das condições higiênico sanitárias das alfaves produzidas no município de Ibiúna- SP, Brasil. [Suplemento científico, Anais XXV Congresso Latino- Americano de Parasitologia de 7 a 11 de outubro de 2001 – São Paulo – Brasil]. **J. Bras. Parasitol.** 37: 94, 2001.
13. Healy, G. R.; Garcia, L. S. Intestinal and Urogenital Protozoa. In: Murray, P. R.; Baron. et al. **Manual of Clinical Microbiology**. 6<sup>th</sup> ed. Washington (D.C) ASM Press. 106: 1204-28, 1995.
14. Ignatius, R. et al. Efficacy of different methods for detection of low *Cryptosporidium parvum* oocyst numbers or antigen concentrations in stool specimens- **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.** 16: 732-6, 1997.
15. Informenent- DTA. Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (tabela de 1995 a 2002). Dados Estatísticos São Paulo, 2002. DDTHA/CVE-SES/ SP. Available from:URL:<http://www.cve.saude.sp.gov.br> [cited sept 2003].
16. Johnson, D.W. et al. Development of a PCR protocol for sensitive detection of *Cryptosporidium* oocysts in water samples. **Appl. Environ Microbiol.** 61: 3849-55, 1995.
17. Kehl, K.S.; Cicirello, H.; Havens, P.L. Comparison of four different methods for detection of *Cryptosporidium* species. **J. Clin. Microbiol.** 33: 416-8, 1995.
18. Lasser, K. H.; Lewin, K. L.; Rynning, F. W. Cryptosporidial enteritis in a patient with congenital hypogammaglobulinemia. **Hum. Pathol.** 10: 234-40, 1979.
19. Laxer, M.A.; Timblin, B.K.; Patel, R. J. DNA sequences for the specific detection of *Cryptosporidium parvum* by the polymerase chain reaction. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 45: 688-94, 1991.
20. Morgan, U. M. et al. Comparison of PCR and microscopy for detection of *Cryptosporidium parvum* in human fecal specimens: clinical trial. **J. Clin. Microbiol.** 36: 995-8, 1998.
21. Orlandi, P. A.; Lampel, K. A. Extraction-free, filter-based template preparation for rapid and sensitive PCR detection of pathogenic parasitic Protozoa. **J. Clin. Microbiol.** 38: 2271-7, 2000.
22. Pedraza-Dias, S. et al. Nested Polymerase chain reaction for amplification of the *Cryptosporidium* oocysts wal protein gene. **Emerg. Infect. Dis.** 7: 49-56, 2001.
23. Perez-Schael, I. et al. Cryptosporidiosis in Venezuelan children with acute diarrhea. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 34: 721-2, 1985.
24. Pieniazek, N. J. et al. New *Cryptosporidium* genotypes in HIV- infected persons. **Emerg. Infect. Dis.** 5: 444-9, 1999.
25. Spano, F. et al. PCR-RFLP analysis of the *Cryptosporidium* oocysts wall protein (COWP) gene discriminates between *C. wairi* and *C. parvum*, and between *C. parvum* isolates of human and animal origin. **FEMS Microbiol Lett.** 150: 209-17, 1997.

# Avaliação da capacidade de absorção e distribuição de amostras de sangue total em diferentes tipos de papel-filtro

## Evaluation of the efficacy of total blood sample absorption and the blood smear diffusion on different types of filter paper

RIALA6/1007

Aparecida Helena S. GOMES<sup>1\*</sup>; Maria de Lourdes B. ARINE<sup>2</sup>; Rosa Maria SZAROTA<sup>3</sup>; Mayra David LANGER<sup>4</sup>

\* Endereço para correspondência: Instituto Adolfo Lutz, Seção de Parasitologia – Rua Júlio Hansen, nº 105, Sorocaba, SP, CEP:18031-490

<sup>1</sup> Instituto Adolfo Lutz - Pesquisador Científico – Mestre em Ciências,

<sup>2</sup> Instituto Adolfo Lutz – Química – Mestre em Educação,

<sup>3</sup> FATEC- Faculdade de Tecnologia de Sorocaba – Professora de Parasitologia,

<sup>4</sup> Graduanda do Curso de Tecnologia em Saúde - FATEC – Sorocaba.

### RESUMO

Realizou-se uma avaliação da capacidade de absorção e distribuição de sangue total em diferentes tipos de papel filtro, como meio alternativo para a coleta, o transporte e a conservação de amostras de sangue total em estudos epidemiológicos de diferentes patologias detectadas para métodos imunológicos. Foram analisados os papéis-filtro Whatman nº 1, Nalgon 80g, Nalgon 3550, Nalgon 3551, Nalgon 3552, Macherey-Nagel 640d, Macherey-Nagel 640m, Macherey-Nagel 640w, Macherey-Nagel 640we, Melitta, Jovita, Extra e Jprolab 42 os quais foram impregnados com sangue humano de um único doador. Após secagem dos papéis foram confeccionados confetes de 6 mm e eluídos em tampão PBS pH 7,2 +/- 0,1. A capacidade de absorção foi mensurada por espectrofotometria a 406,5 nm. Os papéis estudados apresentaram absorção não homogênea em toda a sua extensão, embora os papéis-filtro MN 640m, Nalgon 3551 e Nalgon 3552 e os papéis-filtro Mn 640 w e Nalgon 80g são equivalentes entre si em capacidade e absorção média de sangue total. Apesar de alguns papéis apresentarem similaridade de absorção, maiores estudos serão necessários para avaliar a qualidade dos resultados dos exames realizados por diferentes técnicas imunológicas, com o emprego das diferentes especificações de papel filtro, para que se observe a existência ou não de fatores de interferência.

**Palavras-Chave.** coleta, sangue, papel-filtro.

### ABSTRACT

Evaluation of the total blood total blood sample absorption and the blood diffusion on different types of filter paper, was carried out. This surrogate procedure has been used as an alternative way for collection, transporting and storing up the blood samples for epidemiological studies of different diseases detected by means of immunological methods. Filter papers Whatman nº .1, Nalgon 80 g, Nalgon 3550, Nalgon 3551, Nalgon 3552, Macherey-Nagel 640d, Macherey-Nagel 640m, Macherey-Nagel 640w, Macherey-Nagel 640we, Melitta, Jovita, Extra and Jprolab 42 were analyzed. These filter papers were impregnated with human blood sample collected from a single donor. After the papers being dried, 6mm punches were made, and the respective eluates were obtained adding PBS pH 7.2 +/- 0.1. The blood absorption capacity was measured by spectrophotometry at 406.5 nm. The analyzed filter papers presented no homogeneous blood absorption in the whole extension, although the filter papers MN 640m, Nalgon 3551 and Nalgon 3552, and filter papers MN 640w and Nalgon 80g were equivalent among themselves respectively, as to their efficacy and average absorption of total blood. Although some filter papers showed similarity in blood absorption, further studies are necessary in order to assess the quality of the assays results carried out by means of different immunologic techniques, using diverse filter paper specifications, as to evaluate whether there is an occurrence of interfering factors.

**Key Words.** evaluation, collection, blood, filter paper



## INTRODUÇÃO

A maioria dos estudos epidemiológicos, envolvendo testes imunológicos, necessita de coleta prévia de sangue e posterior centrifugação para obtenção do soro. Para executar os procedimentos de coleta do sangue, armazenamento e transporte são necessárias condições adequadas que, em determinadas regiões, não existem ou são precárias. A inexistência de energia elétrica, clima inadequado com variações bruscas de temperatura e umidade, têm sido os principais obstáculos na conservação desses materiais quando encaminhados até o laboratório de destino.

Estudos realizados em campo, como os inquéritos sorológicos relacionados com doenças de Chagas, toxoplasmose e leishmaniose visceral canina, tem sido motivo da busca de métodos alternativos na solução dos problemas aqui mencionados<sup>1,6</sup>.

O método de coleta de sangue total por punção venosa oferece risco de perda, pois as condições de armazenagem e transporte podem ocasionar, a quebra do frasco<sup>8</sup> ou desnaturação da amostra, resultando em alterações que prejudicam o estudo proposto. Estas dificuldades foram apontadas por pesquisadores em todo o mundo<sup>6,15</sup> o que incentivou pesquisas de metodologia alternativa como o uso do papel-filtro para coleta. É uma técnica rápida, simples, barata, permitindo "maior facilidade de conservação e transporte do espécime"<sup>8</sup>. Estas características podem ser aliadas à praticidade das amostras poderem ser enviadas pelo correio, o paciente não precisa ser deslocado da sua cidade, podendo a amostra também ser coletada por pessoal não especializado, mas treinado para tal<sup>6,8,21</sup>.

Embora muitos pesquisadores tenham demonstrado resultados similares com os obtidos utilizando soro, na detecção de anticorpos contra o vírus da Dengue<sup>16</sup> e hepatite A, HIV-I<sup>2</sup>, contra parasitos da malária<sup>20</sup>, doença de Chagas<sup>10,14</sup>, toxoplasmose<sup>19</sup> e leishmaniose<sup>1</sup>, determinações de PGL-I em pacientes com hanseníase<sup>15</sup>, níveis de glicose<sup>21</sup>, dosagem de ciclosporina<sup>8,9</sup>, hemoglobinas<sup>5</sup>, entre outros, foi mencionada a tendência de títulos serem mais baixos quando eluatos eram utilizados, principalmente naqueles próximos do limite de positividade<sup>20</sup>.

Os papéis-filtro, após serem impregnados com sangue, podem ser armazenados por um período de 15 a 30 dias sob temperatura ambiente<sup>9</sup>. Após esse período, é necessário manter a temperatura entre 2 e 4°C por um período de 3 a 5 meses. Segundo Walton<sup>19</sup>, passado esse período, o resultado dos exames sorológicos não serão mais confiáveis.

Os papéis-filtro impregnados com sangue, para realização de exames sorológicos quantitativos, devem ser picotados em tamanhos e áreas definidas e eluídos em volume de solução salina tamponada de fosfatos (PBS) ideal para a concentração desejada. Obtém-se assim o eluato<sup>1</sup>.

Apesar desta técnica ser empregada com mais frequência devido à sua praticidade, observam-se alguns erros,

relacionados à concentração do eluato<sup>20</sup>, ou seja, variação da quantidade de sangue absorvido por unidade de área de papel-filtro com diferentes especificações e do volume de diluente utilizado.

O objetivo deste trabalho foi o de avaliar as características de diferentes especificações de papéis-filtro levando em consideração a quantidade de sangue absorvido por unidade de área.

## MATERIAL E MÉTODO

### Papel-filtro

Algumas especificações dos papéis-filtro utilizados neste estudo foram as mesmas utilizadas por outros trabalhos citados na literatura como o Melitta®, Whatman® n°1 e o Schleicher & Schuell® (distribuído no Brasil pela Nalgon®). Os papéis-filtro estudados estão discriminados na Tabela 1. Foram confeccionadas fitas de 20x5cm para cada tipo de papel-filtro.

Para medir a espessura dos papéis sem informação, foi utilizado o micrômetro, Mitutoyo Sul América. Sua faixa de medição é de 0 a 25mm.

### Sangue

O sangue foi coletado por punção venosa sem anticoagulante segundo as Normas de Ética em Pesquisa, resolução 196/96, com consentimento livre e esclarecido do doador. A coleta de sangue e todos os procedimentos práticos

**Tabela 1.** Especificações dos papéis-filtro estudados.

| Especificações |                          |                |                |
|----------------|--------------------------|----------------|----------------|
| Papel-filtro   | Peso (g/m <sup>2</sup> ) | Espessura (mm) | Porosidade     |
| Extra®*        | 55                       | 0.14           | Sem referência |
| Jovita®*       | 52                       | 0.12           | 13 micra       |
| JP 42®         | 82                       | 0.13           | Sem referência |
| Melitta®*      | 55                       | 0.15           | 15 micra       |
| MN 640d®**     | 85                       | 0.17           | 1.5 micra      |
| MN 640m®**     | 85                       | 0.20           | 5.5 micra      |
| MN 640w®**     | 85                       | 0.20           | 9.5 micra      |
| MN 640we®**    | 85                       | 0.22           | 18.5 micra     |
| N 3550®**      | 80                       | 0.18           | 6.5 micra      |
| N 3551®**      | 80                       | 0.19           | 7.5 micra      |
| N 3552®**      | 80                       | 0.16           | 2.0 micra      |
| N 80g®**       | 80                       | 0.20           | 3.0 micra      |
| Whatman 1®*    | 87                       | 0.16           | 11 micra       |

\*Papéis-filtro qualitativos (são usados em análises qualitativas para determinar e identificar elementos).

\*\*Papéis-filtro quantitativos (são usados para análises gravimétricas e preparação de amostras para análise em equipamentos específicos).

foram realizados no Instituto Adolfo Lutz Laboratório Regional I Sorocaba.

O sangue total, com o auxílio de pipeta, foi rapidamente impregnado nos papéis até que absorvessem dos dois lados<sup>16</sup>. A rapidez foi necessária, uma vez que o sangue não continha anticoagulante simulando, assim, uma situação que ocorreria na zona rural. Posteriormente, foram secos à temperatura ambiente<sup>14,16,19,21</sup>. Após a secagem foram colocados entre películas de plástico formando “caderninhos” e colocados em um saco plástico<sup>6,9,14</sup> para armazenamento em temperatura ambiente e posteriormente em refrigerador<sup>7,8,10,19</sup>.

Para a confecção dos confetes, foi utilizado um picotador de uso laboratorial com um furo de 6mm de diâmetro. Os confetes foram identificados e armazenados em tubos plásticos em refrigerador à temperatura entre 2 e 4°C<sup>5,16,15,9</sup>.

### Comprimento de onda

Foram escolhidos três papéis-filtro mais citados na literatura: Melitta®, Schleicher & Schuell® e Whatman® nº1. Dois confetes de cada tipo de papel foram eluídos em 10mL de tampão PBS, utilizando o agitador do tipo KLINE, por cerca de 40 minutos, para eluir o sangue. A varredura dos espectros dos eluatos foi realizada entre 350 e 500 nm de forma a obter uma varredura de 10nm/min, usando-se o espectrofotômetro da marca HITACHI®, modelo Model U-2010.

O melhor comprimento de onda foi escolhido em função do menor erro de concentração e do valor máximo de absorbância encontrado.

### Curva padrão

Cada picote de 6 mm de cada tipo de papel-filtro foi impregnado com volumes conhecidos de sangue total, variando de 1 a 6 µL, eluídos em 10 mL de PBS e homogeneizados em agitador do tipo KLINE por 40 minutos. Traçadas as curvas padrões para cada tipo papel os resultados das leituras foram lançados no Programa Prisma GraphPad obtendo-se o gráfico de distribuição das absorbâncias mínima e máxima dos papéis.

A curva padrão foi construída com a respectiva equação da reta, na qual foi interpolado a média da absorbância, procedimento este, realizado para cada tipo de papel estudado.

### Volume de sangue absorvido nos confetes

Uma vez que a absorbância ou transmitância é correlacionada com a concentração do analito responsável pela absorção e com o caminho óptico do recipiente<sup>1</sup>, o volume dos papéis-filtro foram calculados por duas maneiras diferentes: geometricamente utilizando-se a área do picote pela espessura de cada tipo de papel-filtro e por meio de curva padrão de absorção, onde determinou-se o volume absorvido, pela média das absorbâncias obtidas para 10 picotes de cada tipo de papel-filtro eluído em 10 mL de PBS, lidos nas respectivas curvas padrões. Através das similaridades das médias de absorbância os diferentes papéis-filtro foram separados em 8 grupos.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A varredura do espectro de absorção do eluato utilizando papéis-filtro (Whatman® nº1, Melitta® e Nalgon® 80g) apresentou o comprimento de onda de 406,5 nm como o de máxima absorção (Figura 1), sendo este o comprimento de onda escolhido para realizar as curvas padrões para os diferentes papéis-filtro. A figura 2 é um exemplo de curva padrão (papel-filtro MN 640we) cuja equação da reta foi de  $y = 0,1142x + 0,0217$ . As curvas para os demais papes foram:

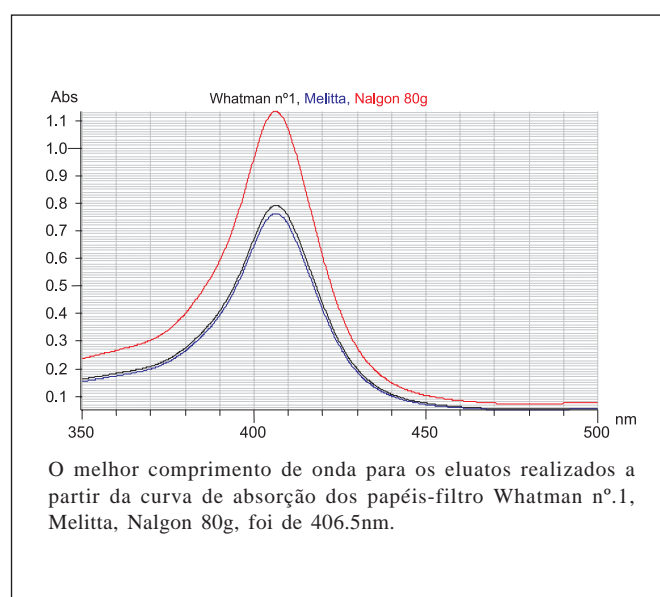


Figura 1. Curva de absorção dos eluatos realizados a partir dos papéis-filtro Whatman nº.1, Melitta, Nalgon 80g.

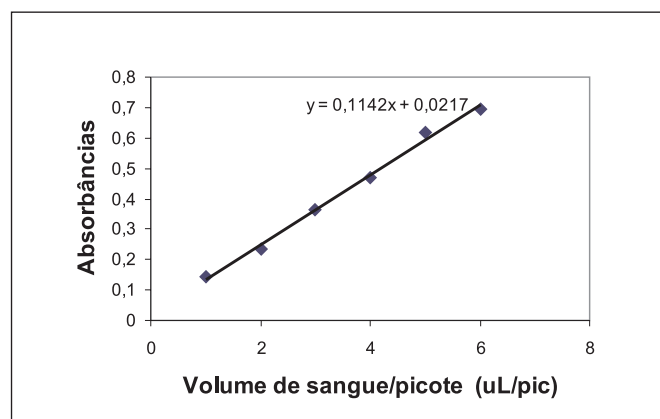


Figura 2. Curva padrão ( $\lambda = 406,5$  nm) para Papel-filtro MN 640we.

**Tabela 2.** Médias das absorbâncias e respectivos desvios-padrão, obtidos de 10 amostras de cada um dos diferentes tipos de papel-filtro.

| Papel-filtro     | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     | 7     | 8     | 9     | 10    | Média | Desvio Padrão |
|------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|---------------|
| <b>Extra</b>     | 0,231 | 0,24  | 0,263 | 0,226 | 0,222 | 0,242 | 0,24  | 0,206 | 0,312 | 0,235 | 0,24  | 0,03          |
| <b>Jovita</b>    | 0,477 | 0,473 | 0,479 | 0,524 | 0,522 | 0,463 | 0,483 | 0,501 | 0,469 | 0,393 | 0,48  | 0,04          |
| <b>JP 42</b>     | 0,31  | 0,389 | 0,362 | 0,275 | 0,529 | 0,41  | 0,314 | 0,42  | 0,401 | 0,355 | 0,38  | 0,07          |
| <b>Melitta</b>   | 0,313 | 0,429 | 0,333 | 0,469 | 0,441 | 0,378 | 0,424 | 0,443 | 0,501 | 0,549 | 0,43  | 0,07          |
| <b>MN 640d</b>   | 0,503 | 0,368 | 0,345 | 0,463 | 0,454 | 0,384 | 0,366 | 0,333 | 0,383 | 0,443 | 0,40  | 0,06          |
| <b>MN 640m</b>   | 0,499 | 0,565 | 0,515 | 0,435 | 0,521 | 0,627 | 0,489 | 0,54  | 0,468 | 0,564 | 0,52  | 0,05          |
| <b>MN 640w</b>   | 0,741 | 0,521 | 0,59  | 0,575 | 0,595 | 0,619 | 0,65  | 0,542 | 0,649 | 0,702 | 0,62  | 0,07          |
| <b>MN 640we</b>  | 0,691 | 0,599 | 0,769 | 0,825 | 0,578 | 0,693 | 0,801 | 0,684 | 0,578 | 0,649 | 0,69  | 0,09          |
| <b>N3550</b>     | 0,386 | 0,571 | 0,504 | 0,428 | 0,414 | 0,588 | 0,495 | 0,356 | 0,381 | 0,475 | 0,46  | 0,08          |
| <b>N3551</b>     | 0,559 | 0,573 | 0,498 | 0,598 | 0,433 | 0,502 | 0,396 | 0,612 | 0,394 | 0,604 | 0,52  | 0,09          |
| <b>N3552</b>     | 0,59  | 0,52  | 0,411 | 0,515 | 0,473 | 0,497 | 0,494 | 0,648 | 0,551 | 0,592 | 0,53  | 0,07          |
| <b>N80g</b>      | 0,64  | 0,712 | 0,671 | 0,585 | 0,668 | 0,556 | 0,637 | 0,555 | 0,592 | 0,565 | 0,62  | 0,06          |
| <b>Whatman 1</b> | 0,349 | 0,369 | 0,468 | 0,467 | 0,412 | 0,492 | 0,514 | 0,482 | 0,555 | 0,484 | 0,46  | 0,06          |

**Tabela 3.** Agrupamento por similaridade de absorção e distribuição dos diferentes papéis-filtro em função da comparação das médias das absorbâncias.

| Especificações | Média das absorbâncias | Grupo |
|----------------|------------------------|-------|
| Whatman 1      | 0,461                  | 1     |
| Nalgon 3550    | 0,460                  |       |
| Mellita        | 0,428                  | 2     |
| MN 640d        | 0,404                  |       |
| Nalgon 3551    | 0,517                  |       |
| Nalgon 3552    | 0,529                  | 3     |
| MN 640m        | 0,522                  |       |
| Nalgon 80g     | 0,618                  | 4     |
| MN 640w        | 0,618                  |       |
| Jovita         | 0,487                  | 5     |
| Extra          | 0,242                  | 6     |
| JP 42          | 0,376                  | 7     |
| MN 640we       | 0,687                  | 8     |

Os papéis-filtro Nalgon 3550 e Whatman nº1, os papéis-filtro Melitta e MN 640d, os papéis-filtro MN 640w e Nalgon 80g, os papéis-filtro Nalgon 3551, Nalgon 3552 e MN 640m, foram os papéis que apresentaram áreas mais homogêneas quanto a absorção.

**Tabela 4.** Volume geometricamente calculado e volume real calculado por meio da média das absorbâncias dos 10 picotes dos papéis-filtro de diferentes especificações e das respectivas equações da reta para os diferentes papéis-filtro.

| Papel-filtro | Volume geométrico(µL) | Média das Absorbâncias | Volume obtido pela curva padrão (µL) |
|--------------|-----------------------|------------------------|--------------------------------------|
| Extra        | 3,95                  | 0,242                  | 1,59                                 |
| Jovita       | <b>3,39</b>           | 0,481                  | <b>4,26</b>                          |
| JP 42        | <b>3,67</b>           | 0,376                  | <b>2,97</b>                          |
| MN 640we     | <b>6,22</b>           | 0,687                  | <b>5,82</b>                          |
| Melitta      | <b>4,24</b>           | 0,428                  | <b>3,24</b>                          |
| MN 640d      | <b>4,80</b>           | 0,404                  | <b>3,33</b>                          |
| MN 640m      | <b>5,65</b>           | 0,522                  | <b>4,46</b>                          |
| Nalgon 3551  | <b>5,37</b>           | 0,517                  | <b>4,98</b>                          |
| Nalgon 3552  | <b>4,52</b>           | 0,529                  | <b>5,10</b>                          |
| Nalgon 3550  | <b>5,10</b>           | 0,460                  | <b>4,31</b>                          |
| Whatman nº1  | <b>4,52</b>           | 0,461                  | <b>4,41</b>                          |
| MN 640w      | <b>5,65</b>           | 0,618                  | <b>4,92</b>                          |
| Nalgon 80g   | <b>5,65</b>           | 0,618                  | <b>5,77</b>                          |

**Tabela 5.** Proporção em número de confetes dos diferentes papéis-filtro entre a similaridade das absorbências para realizar diluição de 1:40 em solução PBS.

| Grupos | 2                       |          | 3           |          |             | 4        |            | 5        | 6        | 7        | 8        |
|--------|-------------------------|----------|-------------|----------|-------------|----------|------------|----------|----------|----------|----------|
|        | Melitta                 | MN 640d  | Nalgon 3551 | MN 640m  | Nalgon 3552 | MN 640w  | Nalgon 80g | Jovita   | Extra    | JP 42    | MN 640we |
| 1      | Whatman 1<br>1 / 1,07   | 1 / 1,15 | 1,12 / 1    | 1,13 / 1 | 1,15 / 1    | 1,35 / 1 | 1,35 / 1   | 1,04 / 1 | 1 / 1,90 | 1 / 1,22 | 1,49 / 1 |
|        | Nalgon 3550<br>1 / 1,07 | 1 / 1,15 | 1,12 / 1    | 1,13 / 1 | 1,15 / 1    | 1,35 / 1 | 1,35 / 1   | 1,04 / 1 | 1 / 1,90 | 1 / 1,22 | 1,49 / 1 |
| 2      | Melitta                 |          | 1,20 / 1    | 1,22 / 1 | 1,25 / 1    | 1,45 / 1 | 1,45 / 1   | 1,12 / 1 | 1 / 1,77 | 1 / 1,14 | 1,60 / 1 |
|        | MN 640d                 |          | 1,30 / 1    | 1,30 / 1 | 1,31 / 1    | 1,55 / 1 | 1,55 / 1   | 1,20 / 1 | 1 / 1,67 | 1 / 1,07 | 1,70 / 1 |
|        | Nalgon 3551             | 1 / 1,20 | 1 / 1,30    |          |             | 1,19 / 1 | 1,19 / 1   | 1 / 1,07 | 1 / 2,15 | 1 / 1,37 | 1,33 / 1 |
| 3      | MN 640m                 | 1 / 1,22 | 1 / 1,30    |          |             | 1,18 / 1 | 1,18 / 1   | 1 / 1,08 | 1 / 2,15 | 1 / 1,39 | 1,32 / 1 |
|        | Nalgon 3552             | 1 / 1,25 | 1 / 1,31    |          |             | 1,17 / 1 | 1,17 / 1   | 1 / 1,10 | 1 / 2,20 | 1 / 1,41 | 1,30 / 1 |
| 4      | MN 640w                 | 1 / 1,45 | 1 / 1,55    | 1 / 1,19 | 1 / 1,18    |          |            | 1 / 1,28 | 1 / 2,55 | 1 / 1,64 | 1,11 / 1 |
|        | Nalgon 80g              | 1 / 1,45 | 1 / 1,55    | 1 / 1,19 | 1 / 1,18    |          |            | 1 / 1,28 | 1 / 2,55 | 1 / 1,64 | 1,11 / 1 |
| 5      | Jovita                  | 1 / 1,12 | 1 / 1,20    | 1,07 / 1 | 1,08 / 1    | 1,28 / 1 | 1,28 / 1   |          | 1 / 2,00 | 1,28 / 1 | 1,43 / 1 |
| 6      | Extra                   | 1,77 / 1 | 1,67 / 1    | 2,14 / 1 | 2,16 / 1    | 2,55 / 1 | 2,55 / 1   | 2,00 / 1 |          | 1,55 / 1 | 2,84 / 1 |
| 7      | JP 42                   | 1,14 / 1 | 1,07 / 1    | 1,38 / 1 | 1,39 / 1    | 1,64 / 1 | 1,64 / 1   | 1 / 1,28 | 1 / 1,55 |          | 1,83 / 1 |
| 8      | MN 640we                | 1 / 1,60 | 1 / 1,70    | 1 / 1,33 | 1 / 1,32    | 1 / 1,30 | 1 / 1,11   | 1 / 1,43 | 1 / 2,84 | 1 / 1,83 |          |

→ Cruzamento de dados

| Especificações Papel-filtro | Curva Padrão           |
|-----------------------------|------------------------|
| Extra®                      | $y = 0,0888x + 0,1009$ |
| Jovita®                     | $y = 0,1114x + 0,0059$ |
| JP 42®                      | $y = 0,1221x + 0,0129$ |
| Melitta®                    | $y = 0,098x + 0,11$    |
| MN 640d®                    | $y = 0,1062x + 0,0505$ |
| MN 640m®                    | $y = 0,1168x + 0,0005$ |
| MN 640w®                    | $y = 0,1308x + 0,0261$ |
| MN 640we®                   | $y = 0,1142x + 0,0217$ |
| N 3550®                     | $Y = 0,099x + 0,0327$  |
| N 3551®                     | $y = 0,0967x + 0,0355$ |
| N 3552®                     | $y = 0,0957x + 0,0403$ |
| N 80g®                      | $y = 0,1049x + 0,0125$ |
| Whatman 1®                  | $Y = 0,102x + 0,0106$  |

As diferentes absorções observadas a partir de eluatos de um mesmo papel-filtro utilizado neste estudo demonstraram que pode haver interferência, justificando a tendência de títulos de anticorpos em ensaios imunológicos mais baixos, principalmente quando próximos do limite de positividade em relação à utilização de soro<sup>20</sup>.

Através do cálculo das médias de absorção pode-se agrupá-los segundo a equivalência de absorvância (Tabela 3) dos diferentes papéis-filtro. Observando a Tabela 4, verificamos uma variação da capacidade de absorção entre o volume teórico, calculado geometricamente e o volume real absorvido e na Tabela 5 observa-se a proporcionalidade entre os vários papéis-filtro.

Para utilização do papel-filtro (eluato) como meio alternativo de conservação e transporte de amostras de sangue para realização de ensaios imunológicos são necessários alguns critérios: ensaios quantitativos requerem papel-filtro com especificações adequadas para garantir a confiabilidade das diluições, o volume de sangue absorvido no papel e o volume de diluente a ser utilizado.

Este estudo demonstrou que os papéis-filtro Nalgon 3550 e Whatman nº1, MN 640w e Nalgon 80g; MN 640m, Nalgon 3551 e Nalgon 3552 apresentaram certa equivalência entre si, considerando a capacidade de absorção de sangue total. Foi observado que alguns papéis não apresentaram nenhuma similaridade de absorção entre si. Entretanto, o volume de sangue observado nos confetes de um mesmo papel-filtro demonstrou que não há homogeneidade na distribuição do sangue sobre a superfície do papel-filtro.

Fatores como tipo e disposição das fibras de celulose, tratamento químico utilizado na fabricação do papel e existência de resíduos podem interferir nas análises imunológicas, sugerindo a necessidade de maiores estudos para avaliar a qualidade dos resultados obtidos em tais análises, considerando os níveis de anticorpos ou de antígenos.

A técnica da coleta de sangue total em papel-filtro, utilizada para diagnóstico de várias doenças, apresenta algumas vantagens em relação ao uso de tubos de vidro convencional, pois são fáceis de armazenar, transportar e são inquebráveis.

Tomimori-Yamashita et al.<sup>15</sup>, em 1999, mostraram que as análises dos eluatos do sangue total coletado em papel-filtro poderiam substituir a tradicional sorologia, sendo útil na investigação de campo, principalmente nos países em desenvolvimento, onde há muitas regiões de difícil acesso e condições precárias de armazenamento das amostras, inviabilizando, assim, a adoção de método tradicional de coleta de sangue por punção venosa.

Apesar de alguns papéis apresentarem similaridade de absorção, maiores estudos serão necessários para avaliar a qualidade dos resultados obtidos por diferentes técnicas imunológicas, sejam quantitativas ou qualitativas, considerando as especificações do papel, para poder realizar diluições corretas, verificar a existência ou não de interferência de medicamentos que o indivíduo esteja tomando na ocasião, e de alguns compostos químicos utilizados na composição do papel, além da disponibilidade no mercado, facilitando sua aquisição e diminuindo custos provenientes de importações.

Pelos dados preliminares obtidos os papéis dos grupos 1, 2, 3 e 4 da Tabela 4 poderão ser substituídos entre si, desde que observando a proporcionalidade da Tabela 5.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos as funcionárias da Seção da Parasitologia Ana Luiza Vitori, Sueli Zafalon Menon pela colaboração e pelo apoio técnico e à CARVALHAES Produtos para Laboratório pela doação dos papéis filtro Nalgon 3550, Nalgon 3551, Nalgon 3552, Schuleicher & Schuell, Macherey Nagel 640 W.

## REFERÊNCIAS

1. Braga, M.D.M. et al. Controle do calazar canino: comparação dos resultados de um programa de eliminação rápida de cães sororreagentes por ensaio imuno-enzimático com outro de eliminação tardia de cães sororreagentes por teste de imunofluorescência indireta de eluato de papel filtro. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 31(5): 1998.
2. Cassol, S.A. et al. Dried blood spots collected on filter paper: an international resource for the diagnosis and genetic characterization of human immunodeficiency virus type-1. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 91(3): 351-8, 1996.
3. Cervo, A.L.; Bervian, P.A. Metodologia Científica. **McGraw-Hill**, 3ª. ed. São Paulo, 249 p. 1983.
4. Ferreira, C.S.; Carvalho, M.E. Padronização de uso de papel-filtro como suporte de material para reações sorológicas. *Rev Bras. Malariol. D. Trop.* 34: 82-6, 1982.
5. Garrick, M.D.; Dembure, P.; Guthrie, R. Sickle-cell anemia and other hemoglobinopathies: procedures and strategy for screening employing spots of blood on filter paper as specimens. *N. Engl. J. Med.* 288(24): 1265-8, 1973.
6. Guimarães, M.C.S. et al. Almacenamiento a largo plazo de IgG e IgM en papel filtro para su uso en encuestas seroepidemiologicas de enfermedades parasitarias. *Bol. Sanit. Panam.* 100(2): 129-44, 1996.
7. Hill, J.B.; Palmer, P. Filter paper blood collection and punching as a means of quantification. *Clin. Chem.* 15(5): 381-9, 1996.

8. Lin-Wang, H.T.; Manrique, R. Dosagem de ciclosporina em amostras transportadas de sangue absorvido em papel de filtro. **Laes & Haes** 118: 120-32, 1999.
9. Lin-Wang, H.T.; Manrique, R. Aplicação da técnica de imunoensaio enzimático de multiplicação (EMIT) para dosagem de ciclosporina na amostra de sangue absorvido em papel-filtro. **J. Bras. Patol. Lab.** 38(1), 2002.
10. Marinkelle, C.J. et al. Recomendaciones para el almacenamiento de sueros absorbidos en papel de filtro bajo condiciones rurales, para el diagnóstico de infección chagásica con la prueba de inmunofluorescencia. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo** 20(2): 112-4, 1978.
11. Mello, G.V.P. et al. **Bras. Medicina.** 3(6), 30 p, 1987.
12. Moura, R.A. et al. Técnicas de Laboratório, 3ª ed. São Paulo: Livraria Atheneu, 511p., 1987.
13. Ohlweiler, O.A. Fundamentos de Análise Instrumental. **Livros Técnicos e Científicos.** Ed. S.A. 63-105, 1981.
14. Palacios, X.; Belli, A.; Espino, A.M. Detección de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* en Somoto, Nicaragua, mediante ELISA indirecto e IFI en muestras de sangre en papel de filtro. **Rev. Panam. Salud Publica/Pan. Am. J. Public Health** 8(6): 411-7, 2000.
15. Tomimori-Yamashita, J. et al. Anti-phenolic glycolipid-1 (PGL-1) determination using blood collection on filter paper in leprosy patients. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo** 41(4), 1999.
16. Vázquez, S. et al. Detección de IgM contra el virus del dengue en sangre entera absorbida en papel de filtro. **Rev. Panam. Salud Publica/Pan. Am. J. Public. Health** 3(3): 174-8, 1998.
17. Verrastro, T.; Lorenzi, T.F.; Neto, S.W. Hematologia e Hemoterapia: Fundamentos de Morfologia, Fisiologia, Patologia e Clínica. São Paulo.ed. Atheneu, 303p, 1998.
18. Vogel, A. Análise Química Quantitativa. 5ª. ed. **Livros Técnicos e Científicos S/A**, 522-41; 1992.
19. Walton, B.C.; Arjona, I. Utilization of whole blood specimens on filter paper for the indirect fluorescent antibody tests for toxoplasmosis. **J. Parasitol.** 57(3): 678-80, 1971.
20. Wanderley, D.M.V. et al. Confronto de resultados de reações de imunofluorescência indireta (RIFI) realizadas para diagnósticos de malária utilizando-se amostras de sangue coletadas em papel de filtro e em tubos capilares. **Rev. Bras. Malariol. D. Trop.** 34: 87-92, 1982.
21. Ward, L.S. et al. Determination of glucose levels using dried filter paper blood spots: new perspective in home monitoring. **São Paulo Med J/RPM** 114(1): 1100-3, 1996.

# Infecção humana por *Lagochilascaris minor* Leiper 1909, no Vale do Ribeira, estado de São Paulo, Brasil (Relato de Caso)

## Human infection with *Lagochilascaris minor* observed in Vale do Ribeira, São Paulo state, Brazil (Case Report)

RIALA6/1008

Almir Venilton MONTEIRO<sup>1</sup>; Silvia Mayumi Koga ZAPOTOSKI<sup>2</sup>; Domingas M. A. G. Vieira TORRES<sup>4</sup>; Márcio A. BERENCHTEIN<sup>3</sup>; Pedro Luiz Silva PINTO<sup>4\*</sup>

\* Endereço para correspondência: Instituto Adolfo Lutz, Av Dr. Arnaldo, 355 CEP. 01246-902 – 8º andar Seção de Enteroparasitoses, Cerq. César – São Paulo

<sup>1</sup> Biologista do Laboratório Regional - CONSAÚDE (Consórcio Intermunicipal de Saúde do Vale do Ribeira)

<sup>2</sup> Diretora Técnica do Laboratório Regional – CONSAÚDE (Consórcio Intermunicipal de Saúde do Vale do Ribeira)

<sup>3</sup> Médico Responsável pela Equipe Local do Programa de Saúde da Família-Unidade de Saúde de Jujuiá

<sup>4</sup> Pesquisadores da Seção de Enteroparasitoses do Instituto Adolfo Lutz, Laboratório Central  
e-mail: plspinto@bol.com.br

### RESUMO

Os autores relatam um caso de lagoquilascariase em paciente de 26 anos, com lesão tumoral supurativa fistulizada na região cervical direita da cadeia jùgulo carotídea média, com eliminação de vermes adultos de ambos os sexos, estágios larvários e ovos de *Lagochilascaris minor*. Realizado o tratamento com Albendazol 400 mg/dia por trinta dias e posteriormente com uma dose de 12 mg de Ivermectina, houve regressão do quadro clínico, com formação de processo cicatricial. Ao que tudo indica, o caso relatado é o segundo descrito no estado de São Paulo e o primeiro no Vale do Ribeira.

**Palavras-Chave.** *Lagochilascaris minor*; abscesso cervical; Vale do Ribeira; Brasil.

### ABSTRACT

The authors report an human *Lagochilascaris minor* infection in a 26 year-old woman who presented tumoral suppurative fistulous affecting the cervical region at right side. Worms, larvae and eggs were eliminated through the fistula. Treatment with albendazol in 400mg/day dose for 30 days and subsequent single dose treatment with 12 mg of ivermectin promoted lesion healing. This has been the second case of human *Lagochilascaris minor* infection so far described in state of São Paulo, and the first one reported in Vale do Ribeira, SP - Brazil.

**Key Words.** *Lagochilascaris minor*; cervical abscess; Vale do Ribeira; Brazil

### INTRODUÇÃO

O Gênero *Lagochilascaris* reúne ascarídeos parasitos de animais silvestres, sobretudo de felídeos selvagens e marsupiais<sup>17,18</sup>. Algumas espécies foram encontradas parasitando animais domésticos como o cão e gato<sup>1,8,9</sup>. O parasitismo humano está relacionado com a espécie *L. minor* não sendo conhecido, para essa espécie, o hospedeiro definitivo natural<sup>2,6,13,14,15,19,21</sup>. Estudos experimentais mostraram que o gato doméstico pode albergar os parasitos adultos, comportando-se como hospedeiro definitivo<sup>4,5</sup>. Evidências baseadas também em modelos experimentais apontam os roedores silvestres como hospedeiros intermediários deste parasito<sup>12</sup>.

A lagoquilascariase humana é considerada uma parasitose emergente, que tem sido registrada em áreas silvestres de países do Continente Americano<sup>13,14</sup>. No Brasil foram descritos, até o momento, 88 casos que correspondem cerca de 80,7% do total de casos publicados na literatura mundial<sup>14</sup>. A maior parte dos casos foi procedente da região Norte do Brasil, principalmente das áreas correspondentes aos Vales dos rios Tocantins e Araguaia<sup>14,19</sup>. Casos isolados já foram relatados em outras regiões do país<sup>14</sup>. O primeiro registro nacional da parasitose foi descrito por Artigas et al em 1968 no estado de São Paulo em paciente natural do município de Piracicaba<sup>2</sup>. O objetivo dessa comunicação é de relatar o que parece ser o segundo caso da parasitose no estado de São Paulo em paciente da região do Vale do Ribeira.

## RELATO DO CASO

M.A.S., de 26 anos de idade, sexo feminino e de cor branca, natural do estado da Bahia, residente há 13 anos na área rural do município de Sete Barras, estado de São Paulo. Os sintomas iniciaram em 1998, com quadro clínico de linfadenite cervical de repetição. Neste período, sem diagnóstico conclusivo, foi submetida a diversos tratamentos clínicos com antibióticos e à intervenção cirúrgica (linfadenectomia), sem melhora completa do quadro. Em junho de 2000, foi atendida na Unidade Básica de Saúde (UBS) do município de Juquiá, pela equipe do Programa de Saúde da Família (PSF), apresentando emagrecimento acentuado, astenia, febrícula vespertina e tumoração abscessada, com diâmetro de seis centímetros, supurativa e fistulizada na região cervical da cadeia júbulo carotídea média (FIGURA 1). Solicitado hemograma e radiografia do tórax, estes se apresentaram normais. Formulada a hipótese inicial de tuberculose ganglionar foi iniciado antibióticoterapia específica e suporte clínico, com curativos diários da região fistulizada. Uma semana após o início do tratamento, observou-se intensa secreção necrótica. Encaminhada ao Laboratório Regional – CONSAÚDE para a confirmação do diagnóstico de tuberculose ganglionar foi verificado durante a coleta da secreção purulenta a saída de pequenos vermes de aspecto filiformes e cor esbranquiçada. Descartada de imediato a hipótese de miíase comum. A análise microscópica do material da lesão revelou a presença de ovos com características morfológicas semelhantes a de ascarídeos. Um novo material foi coletado e encaminhado ao Instituto Adolfo Lutz de São Paulo, Seção de Enteroparasitoses, onde foram encontrados e identificados vermes adultos de ambos os sexos, estágios larvários intermediários e ovos de *Lagochilascaris minor*. Para o diagnóstico diferencial das espécies de *Lagochilascaris* foi utilizada chave de classificação segundo Costa et al, 1986<sup>7</sup>. A partir do diagnóstico foi iniciado o tratamento com Albendazol, 400 mg diárias por um mês e, posteriormente, com uma dose de 12mg de Ivermectina (6 mg/Kg de peso de Revectina®). Realizado acompanhamento por quatro meses, foi observado regressão lenta do quadro clínico, com formação de processo cicatricial granuloso local. Nos últimos quatro anos a paciente vem sendo acompanhada periodicamente, não apresentando sinais e sintomas clínicos da parasitose neste período.

## DISCUSSÃO

A infecção humana por *L. minor* é rara em nosso meio e a maioria dos casos foi registrada no estado do Pará, Rondônia, Tocantins, Acre e Mato Grosso<sup>14,19</sup>. No estado de São Paulo foi registrado o primeiro caso da parasitose no Brasil, em paciente do sexo feminino, de 16 anos, natural do município de Piracicaba e que durante a infância residiu nos municípios de Leme, São Pedro e Botucatu<sup>2</sup>. O caso aqui relatado é de paciente natural do estado da Bahia, cuja família se instalou há treze anos na área

rural do município de Sete Barras-Juquiá, Vale do Ribeira, estado de São Paulo, onde mantiveram residência fixa até o momento deste relato. Anterior ao aparecimento dos sintomas a paciente negou ter viajado para localidades de maior prevalência da parasitose.

A evolução clínica ocorreu em um período de dois anos até a comprovação diagnóstica. Estes dados concordam com os casos já relatados que mostram que a infecção por *L. minor* evolui cronicamente, podendo apresentar períodos de menor intensidade clínica seguido de recidiva<sup>13,14,15,19,21</sup>. A localização e as características da lesão aqui relatadas mantêm uma similaridade com a maioria dos casos descritos de Lagoquilaríase, predominando na região cervical, seguida da região do mastóide e ouvido médio<sup>14,19</sup>. Quanto à faixa etária e sexo, a maior frequência tem sido observada entre crianças e adultos jovens com predominância para o sexo feminino<sup>13,14</sup>.

O mecanismo de transmissão não está completamente esclarecido, mas há evidências, baseadas em modelos experimentais, de que a infecção humana pode ocorrer pela ingestão de larvas do parasito encistadas na musculatura de animais silvestres, sobretudo de roedores e marsupiais<sup>4,12,13,17</sup>. Outro mecanismo apontado, mas não confirmado experimentalmente<sup>4,12</sup> é a possibilidade de ingestão de ovos larvados que contaminam o ambiente<sup>10,15,18,19</sup>. Neste caso a paciente confirmou o hábito de se alimentar de carne de pequenos roedores silvestres, paca, cotia, capivara e gambá e de beber água de ribeirão sem qualquer tratamento. Estes hábitos são de ocorrência comum entre os casos já relatados<sup>15,19,21</sup>.

O diagnóstico parasitológico foi realizado a partir das características morfológicas dos ovos e dos vermes adultos. Para a identificação do gênero foram consideradas as características da extremidade anterior dos vermes adultos<sup>7,18</sup> (Figura 2). O diagnóstico da espécie foi estabelecido a partir da caracterização morfológica dos ovos que apresentavam vinte e três escavações ao redor da casca externa (Figura 3) e pela extremidade posterior do macho que apresentava duto ejaculador maior que os espículos<sup>7,18</sup> (Figura 4).

O tratamento da Lagoquilaríase é ainda controverso. Vários anti-helmínticos empregados em diferentes esquemas terapêuticos têm mostrado ação parcial ou temporária<sup>14,21</sup>. Esta dificuldade pode estar relacionada com a possibilidade de auto-infecção, uma vez que tem sido observada nas lesões a presença de parasitos em todas as fases evolutivas<sup>14,19,21</sup>. O esquema terapêutico utilizado teve como base à eficiência do Albendazol e da Ivermectina no tratamento de casos humanos e de modelos experimentais<sup>3,20,21</sup>. Optou-se pelo duplo tratamento como forma de evitar recidivas que podem surgir após período inicial de cura clínica aparente<sup>14</sup>.

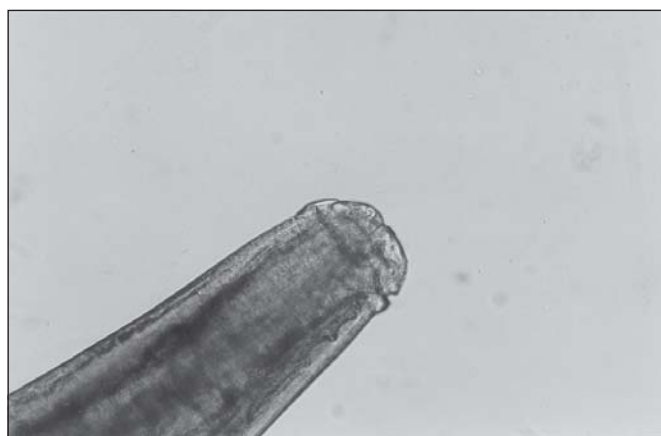
Dados epidemiológicos indicam que a Lagoquilaríase é uma zoonose que acomete habitantes de áreas rurais florestadas e que retiram destas o seu meio de subsistência<sup>14,15,21</sup>.

Sete Barras conta com uma área total de 1052 Km<sup>2</sup> e população fixa de 13714 habitantes, onde 66% da população está assentada na área rural<sup>11</sup>. A economia está baseada na

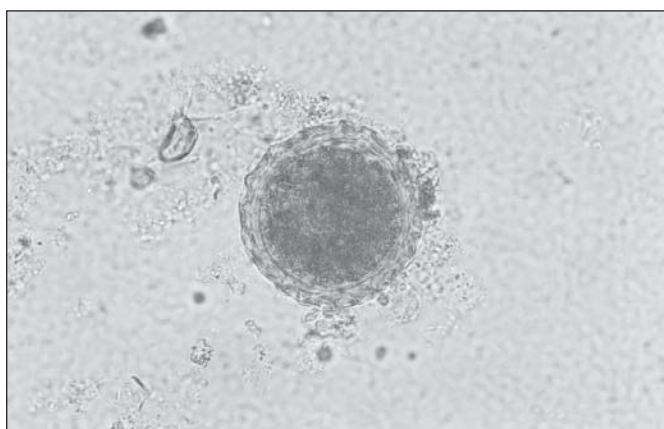




**Figura 1.** Aspecto da lesão na região cervical da cadeia jugulo carotídea média.



**Figura 2.** Vista lateral da extremidade anterior de um verme adulto de *Lagochilascaris minor* mostrando os lábios. Aumento de 100X.



**Figura 3.** Ovo de *Lagochilascaris minor*. Notar casca espessa apresentando vinte e três escavações ao seu redor. Aumento de 400X.



**Figura 4.** Vista lateral da extremidade posterior de um verme macho de *Lagochilascaris minor*. Notar duto ejaculador. Espículos não visíveis. Aumento de 100X.

produção de banana, borracha e lavoura temporária de arroz<sup>11</sup>. O município integra o Vale do Ribeira, região do estado de São Paulo que preserva cobertura vegetal de Mata Atlântica, sendo considerada área de proteção ambiental<sup>16</sup>. Por outro lado, compreende uma das regiões do estado com menores índices de crescimento e de desenvolvimento sócioeconômico<sup>16</sup>. Considerando estas características e com base na literatura consultada, este é o segundo caso de Lagoquilaríase humana descrita no estado de São Paulo e o primeiro no Vale do Ribeira.

#### AGRADECIMENTO

Os autores agradecem a Agostinha Agulha Cabrinha, técnica do Laboratório Regional – CONSAÚDE, pela colaboração na documentação fotográfica do caso clínico reportado.

#### REFERÊNCIAS

1. Amato, J.F.R.; Grisi, L.; Pimentel Neto, M. Two cases of fistulated abscesses caused by *Lagochilascaris major* in domestic cat. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 85: 471-3, 1990.
2. Artigas, P.T. et al. Sobre um caso de parasitismo humano por *Lagochilascaris minor* Leiper, 1909, no estado de São Paulo, Brasil. **Rev. Inst. Med. trop. São Paulo**, 10: 78-83, 1968.
3. Barbosa, C.A.L.B.; Campos, D.M.B. Avaliação da eficácia terapêutica da Ivermectina sobre larvas de quarto estágio de *Lagochilascaris minor* em gatos infectados experimentalmente. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 34: 373-6, 2001.
4. Campos, D.M.B. et al. Experimental life cycle of *Lagochilascaris minor* Leiper, 1909. **Rev. Inst. Med. trop. São Paulo**, 34: 277-87, 1992.
5. Campos, D.M.B.; Barbosa, C.A.L.; Paçô, J.M. Ocorrência do ciclo auto-infectante na lagochilascariase felina experimental. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, 2: 60, 1993.
6. Chieffi, P.P. et al. Infecção cutânea por *Lagochilascaris minor* - Tratamento e cura rápida pelo levamisol. **An. bras. Dermatol.**, 56: 141-4, 1981.

7. Costa, H.M.A. et al. *Lagochilascaris minor* Leiper, 1909 (Nematoda-Ascaridae) de origem humana. **Rev. Inst. Med. trop. São Paulo**, 28: 126-130, 1986.
8. Craig, T. M. et al. Parasitic nematode (*Lagochilascaris major*) associated with a purulent draining tract in a dog. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, 181: 69-70, 1982.
9. Dell'Porto, A.; Schumaker, T.T.S.; Oba, M.S.P. Ocorrência de *Lagochilascaris major* Leiper, 1910 em gatos (*Felis catus domesticus*) no Estado de São Paulo, Brasil. **Rev. Fac. Med. Zootec. Univ. São Paulo**, 25: 173-80, 1988.
10. Fraiha, H.; Leão, R.N.Q.; Costa, F.S.A. *Lagochilascariase* humana e de animais domésticos. **Zoon. Rev. Inst.**, 1: 25-33, 1989.
11. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. **Censo 2000**. [<http://www.ibge.gov.br/cidadesat/default.php>]. 18 maio 2004.
12. Paçô, J. M. **Comprovação experimental da importância de roedores silvestres na transmissão da lagochilascariase**. [Dissertação de Mestrado] Goiânia: Universidade Federal de Goiás, p.82, 1994.
13. Paçô, J.M.; Campos, D.M.B. *Lagochilascaris minor* Leiper, 1909: Nove décadas de revisão bibliográfica. **Rev. Pat. Trop.**, 27: 11-34, 1998.
14. Palheta-Neto, F.X. et al. Contribuição ao estudo da lagochilascariase humana. **Rev. Bras. Otorrinolaringol.**, 68: 101-5, 2002.
15. Santos, V.M. et al. Relato de caso de infecção humana por *Lagochilascaris minor*. **An. Bras. Dermatol.**, 65: 189-92, 1990.
16. São Paulo 92: **Perfil ambiental e estratégias** – Governo do Estado de São Paulo, Secretaria do Meio Ambiente, Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental – CETESB – São Paulo, 1992.
17. Smith, J.L.; Bowman, D.D.; Little, D.D. Life cycle and development of *Lagochilascaris sprengi* (Nematoda: Ascarididae) from opossums (Marsupialia: Didelphidae) in Louisiana. **J. Parasitolol.**, 69:736-745, 1983.
18. Sprent, G.F.A. Speciation and development in genus *Lagochilascaris*. **Parasitology**, 62: 71-112, 1971.
19. Veloso, M.G.P. et al. *Lagochilascariase* humana, sobre três casos encontrados no Distrito Federal, Brasil. **Rev. Inst. Med. trop. São Paulo**, 34: 587-91, 1992.
20. Vieira, M.A.; Oliveira, J.A.; Barbas, C.A.L. Avaliação da eficácia do Albendazol na lagochilascariase murina experimental. **Rev. Patol. Trop.**, 25: 253-62, 1996.
21. Vieira, M.A. et al. Relato de caso de lagochilascariase humana procedente do estado do Pará, Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 33: 87-90, 2000.

---

## Mycobacteria research in water buffalo milk

---

Jordão Junior, C. M. **Mycobacteria research in water buffalo milk**. Araraquara – SP. 2004. [Dissertação de Mestrado – Área: Ciência dos Alimentos - Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP Araraquara] Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Clarice Queico Fujimura Leite.

---

Milk is an important nutritional source to man, but it can also carry pathogenic mycobacteria, especially *Mycobacterium bovis*. In this study, we tried to evaluate the classical technique (culture) and molecular technique PCR (*Polymerase Chain Reaction*) and PRA (*PCR - Restriction Enzyme Analysis*) in the isolation and identification of mycobacteria from water buffalo's milk samples. First of all, it was standardized an efficient PCR method for *M. bovis* identification from milk. In this sense, a known number of *M. bovis* AN5 were inoculated in the milk that was submitted to a serial dilution. Then, two different PCR protocols were done to evaluate the threshold of *M. bovis* detection. Two pair of primers were tested, one to detect *Mycobacterium* spp (INS1 e INS2) and other to detect *M. bovis* (JB21 e JB22). Dilutions were also submitted for culture using Stonebrink medium and incubated at 37°C/90 days, to determine

the number of bacilli in the milk. After this, 23 samples of milk collected from water buffalos (*Bubalus bubalis*), 7 PPD+ and 16 PPD-, were analyzed by PCR technique and culture (Stonebrink medium) to detect the presence of *M. bovis*. Isolation of other mycobacteria were done by culture (Lowenstein-Jensen medium) and identified by mycolic acids and PRA. The results of PCR showed that the protocol using primer pair INS1/ INS2 was positive until 10<sup>-3</sup> dilution (800 CFU/mL). The protocol with primers JB21/JB22 was more sensitive and specific, detecting *M. bovis* until 10<sup>-4</sup> dilution (80 CFU/mL). *M. bovis* could not be identified by PCR and isolated in culture from milk samples of water buffalo. Other species of mycobacteria were identified as: *M. flavescens* (1 sample), *M. simiae* (3 samples) and *M. intracellulare* (1 sample). The last two species are considered pathogenic mycobacteria to human.

Dissertação está disponível na Biblioteca da  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP Araraquara.  
e-mail: clesojunior@uol.com.br

---

## Immunological activity evaluation of *Alchornea* spp in vitro on the production of hydrogen peroxide, nitric oxide and tumor necrosis factor- $\alpha$ by murine macrophages

---

Lopes, F.C.M. **Immunological activity evaluation of *Alchornea* spp in vitro on the production of hydrogen peroxide, nitric oxide and tumor necrosis factor- $\alpha$  by murine macrophages**. Araraquara – SP. 2004. [Dissertação de Mestrado – Área: Análises Clínicas - Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP Araraquara] Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Iracilda Zeppone Carlos.

---

The use of natural resources as treatment and healing for diseases is as old as the human species. However, most of all plant species were not investigated chemistry or biologically. Many plants used in the traditional medicine modulate the immunological response. The immune system is a remarkably

adaptive defense system that has evolved in vertebrates to protect them from invading pathogenic microorganisms and cancer. Macrophages play an important role in this system because they are cells capable to secrete many biological active products such as reactive nitrogen and oxygen species and

cytokines. In this work, methanolic extract and ethyl acetate fraction obtained from *Alchornea triplinervia* and *Alchornea glandulosa* were studied in the murine immune system using peritoneal macrophages cultures from Swiss mice. Cell viability assays were realized to assure the experimental development. Hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) and nitric oxide (NO) were determined by spectrophotometric procedures and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ). The ability of methanolic extract and ethyl acetate fraction to stimulate or inhibit the murine immune system was evaluated. These plants didn't show immunostimulating properties, once liberation of  $H_2O_2$ , NO and TNF- $\alpha$  were not observed. However, extracts and fractions from both plants, strongly inhibited NO and  $H_2O_2$  production induced by LPS and PMA, respectively. Production of TNF- $\alpha$  by LPS-stimulated macrophages was partially inhibited. The concentration of 15,62  $\mu\text{g/mL}$  from *A. triplinervia* methanolic

extract (cellular viability > 95%) showed to inhibit 88,35% of  $H_2O_2$ , 52,54% of NO and 10,41% of TNF- $\alpha$  production. The ethyl acetate fraction of the same plant and concentration (cellular viability > 90%), inhibited 72,25% of  $H_2O_2$ , 47,80% of NO and 16,41% of TNF- $\alpha$  production. Regarding the *A. glandulosa* methanolic extract in the concentration of 15,62 $\mu\text{g/mL}$  (cellular viability > 91%), there was a production inhibition of 88,62% of  $H_2O_2$ , 32,40% of NO and 11,61% of TNF- $\alpha$ . The ethyl acetate fraction of the same plant and concentration (cellular viability > 92%), inhibited 70,56% of  $H_2O_2$ , 21,67% of NO and 12,21% of TNF- $\alpha$  production. In the NO and TNF- $\alpha$  assays, the inhibition percentage grows according to increasing concentrations, but this fact was not noticed in  $H_2O_2$  determination. According to these results, it is suggested that methanolic extracts and ethyl acetate fractions from *A. triplinervia* and *A. glandulosa* can present anti-inflammatory activity, confirming their traditional use.

Dissertação está disponível na Biblioteca da  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP Araraquara.  
e-mail: fcmlopes@terra.com.br

## AGRADECIMENTOS AOS RELATORES

A COMISSÃO DE REDAÇÃO AGRADECE AOS COLABORADORES DESTA VOLUME

- AMIR GEBARA – INSTITUTO BIOLÓGICO
- ANA MARIA RAUEN OLIVEIRA MIGUEL - ITAL
- ANTONIO VALTER FERREIRA - USP/IMT
- AURORA MARQUES CIANCIARULLO – INSTITUTO BUTANTAN
- BENEDITO CORRÊA – USP/ ICB
- CARLOS ALBERTO RIBEIRO – UFMG/ Faculdade de Medicina
- CLARICE QUEICO FUJIMURA LEITE - UNESP/Araraquara
- CLAUDETE RODRIGUES PAULA - USP/ICB
- CLÁUDIA HELENA PASTOR CISCATO – INSTITUTO BIOLÓGICO
- CRISTIANE CANO - IAL
- CRISTINA NORTHFLEET ALBUQUERQUE – USP/FCF
- DANIEL ALTINO JESUS – LACEN/PR
- DEBORAH INÊS T. FAVARO - IPEN
- DELIA B. RODRIGUES AMAYA – UNICAMP/FEA
- DEMERVAL DE CARVALHO - UNAERP
- DENISE MARIA E. FORMAGGIA - NÚCLEO DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA/SP
- DILZA BASSI MONTAVANI – ITAL
- EDNA T. MIYAKE KATO - USP/FCF
- EDUARDO VICENTE – ITAL
- ELFRIEDE MARIANNE BACCHI - USP/FCF
- ELIANA RODRIGUES MACHADO PEIXOTO – FIOCRUZ/INCQS
- ELIETE VAZ DE FARIA - ITAL
- EMILIA MORI – ITAL
- EMY TAKEMOTO – ITAL
- FLÁVIO ANTONIO LÁZZARI - UFPR
- FERNANDO DE OLIVEIRA – UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO
- GILBERTO CASADEI DE BAPTISTA – USP/ESALQ
- GIUSEPPINA M. P. SAAD – DIR XIX - Santos
- GUILHERME PRADO – FUNED
- HELENA GODOY – UNICAMP/FEA
- HELOÍSA FRANKLIN – FUNED
- HERMÍNIA Y. KANAMURA – SES-SP/CCD
- IRMA N.G. RIVERA - USP/ICB
- ISABELA SIMONI – INSTITUTO BIOLÓGICO
- IZILDINHA MORENO – ITAL
- JACQUELINE T. MACRUZ PERESI - IAL
- JORGE CÉSAR MASINI – USP/IQ
- JORGE JOSÉ DO VALE OLIVEIRA – ITAL
- JORGE MANCINI FILHO – USP/FCF
- JOAO SARKIS YUNES - FURG
- KATIA M. V. A. B. CIPOLLI - ITAL
- LETICIA A. F. NAGATO - IAL
- LIGIA BICUDO DE ALMEIDA MURADIAN – USP/FCF
- LINA YAMACHITA OLIVERAS – CIENTEC
- LUCIA MARIA GUEDES DIEFENBECK - LACEN/RS
- LUCIA ROSSI - INSTITUTO DE BOTÂNICA
- LÚCIA VALENTE SOARES – UNICAMP/FEA
- LUIZ ANTONIO GIOIELLI – USP/FCF
- MÁRCIA HELENA BRAGA CATROXO - INSTITUTO BIOLÓGICO

- MARCIA REGINA BEAUX – UFPR
- MARCOS VINICIUS DA SILVA – HOSPITAL EMÍLIO RIBAS
- MARIA ANTONIA CALLORI DOMINGUES – USP/ESALQ
- MARIA APARECIDA AZEVEDO PEREIRA DA SILVA – UNICAMP/FEA
- MARIA DA GLÓRIA MATTOSIINHO DE CASTRO FERRAZ – UNIFESP
- MARIA LURDES FELSNER – SENAI
- MARIE SATAKE – IAMSPE
- MARISA LANDGRAF - USP/FCF
- MARISTELA SATOU MARTINS – IAL
- MASSAMI SHIMOKOMAKI - UEL
- NEURA BRAGAGNOLO – UNICAMP/FEA
- NEUZA JORGE – UNESP/São José do Rio Preto
- NIVALDO BACCAN – UNICAMP/IQ
- ORLANDO ZANCANARO JR. – USP/FCF
- PATRICIA SINNECKER – USP/FCF
- PAULO ROBERTO NOGUEIRA DE CARVALHO – ITAL
- PEDRO LUIZ DA SILVA PINTO – IAL
- PEDRO PAULO CHIEFF - USP/IMT
- PÉRICLES A. NOGUEIRA - USP/FSP
- RAYMUNDO S. AZEVEDO - USP/FM
- REGINA SORRENTINO RODRIGUES MINAZZI - IAL
- RENATO A. MORTARA - UNIFESP
- RITA MARIA DA SILVA – IAL
- ROGÉRIO PERUJO TOCCHINI – ITAL
- RONALDO ZUCATELLI – INSTITUTO BUTANTAN
- ROSA MARIA FÁVARO - IAL
- ROSEMAR ANTONIASSI - EMBRAPA
- SÉRGIO COLACIOPPO – USP/FSP
- SHIRLEY ABRANTES – FIOCRUZ/INCQS
- SIDINÉA FREITAS – EMBRAPA
- SILVANA BOSQUIROLI - LACEN/PR
- SILVANA DO COUTO JACOB – FIOCRUZ/INCQS
- SOLANGE CRISTINA MAZZONI-VIVEIROS - INSTITUTO DE BOTÂNICA
- SUMIE H. SHIMIZU – IAL
- SYLVIA CARDOSO LEÃO - UNIFESP
- TOMAZ HENRIQUE ARAUJO – ESCOLA DE FARMÁCIA E ODONTOLOGIA DE ALFENAS
- ÚRSULA MARQUES – USP/FCF
- VALDEREZ GAMBELE – USP/ICB
- VERA R. R. LEMES – IAL
- VIVIANE F. BOTOSSO- INSTITUTO BUTANTAN

Agradecimento especial pela revisão do inglês

- MIRTHES UEDA – IAL

ISSN 0073-9855



9 770073 985009