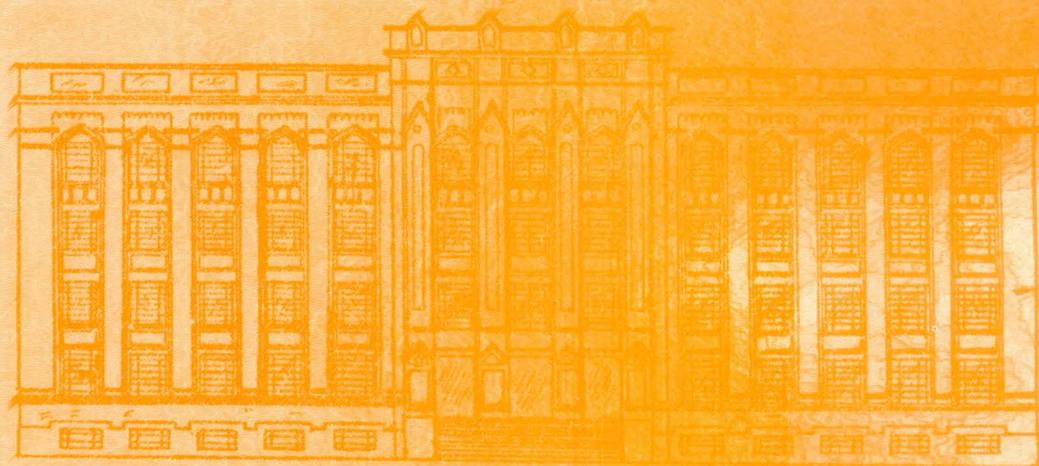


REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ

ISSN 0073-9855
RIALA6



Volume 62 número 3, 2003



GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE

INSTITUTO ADOLFO LUTZ

DIRETOR RESPONSÁVEL

DR. CRISTIANO CORRÊA DE AZEVEDO MARQUES
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
THAÏS VALÉRIA MILANEZ - **MEMBRO CONVIDADO**
CLAYDES DE QUADROS ZAMBONI - **MEMBRO EMÉRITO**
MARIA LUISA BARBOSA - **MEMBRO CONVIDADO**

SETOR DE PUBLICAÇÕES

ROCELY APARECIDA de SOUZA BUENO

ENDEREÇO/ ADDRESS

Biblioteca do Instituto Adolfo Lutz
Av. Dr. Arnaldo, 355
01246 – 902 – São Paulo – SP - Brasil
Caixa Postal 1783 – CEP 01059-970
Tel/Fax: 3082-9939
Site: www.ial.sp.gov.br
E mail: rial@ial.sp.gov.br

Publicação semestral/ Bi-annual publication
Solicita-se permuta/ Exchange desired

Ano 2003

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

1941 – 2003,
2003, 62 (3)

ISSN 0073-9855
RIALA 6

CDD₁₈ 614.07205

(*) ASSOCIAÇÃO PAULISTA DE BIBLIOTECÁRIOS. Grupo de Bibliotecários Biomédicos. *Normas para catalogação de publicações seriadas nas bibliotecas 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

www.ial.sp.gov.br

AOS COLABORADORES

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 somente serão recebidos se redigidos de acordo com as seguintes normas:

NORMAS PARA A 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 científicos, de revisões, de atualizações, relatórios técnicos, relatos de casos, comunicações científicas e resumos de teses e dissertações. Os autores devem escrever na carta de encaminhamento qual a natureza do trabalho. Os originais serão publicados em língua portuguesa ou inglesa preferencialmente. Deverão ser encaminhados em três vias, 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. O trabalho, após aprovado, deve ser encaminhado ao Setor de Publicações, em uma cópia impressa e em disquete 3 ½ conforme instruções que serão enviadas após a aprovação.

O **artigo científico** deve ser elaborado com a seguinte estrutura:

Página de rosto: **a)** título do artigo; **b)** nome do(s) autor(es); **c)** filiação científica indicando o autor e endereço a quem deverá ser encaminhada a correspondência.

Texto: **a)** título: deve ser curto e específico em inglês e português, indicando precisamente o conteúdo; em título longo, recorrer a subtítulo; **b)** autores: nome e último sobrenome por extenso, e o último sobrenome em caixa alta (Ana Maria C. D. da SILVA); **c)** filiação científica indicada por número sobrescrito, e o autor e endereço a quem deverá ser encaminhada a correspondência indicada por asterisco (*); **d)** resumo: deve ser claro e conciso num único parágrafo, contendo objetivo, metodologias, resultados e conclusões. Não exceder 200 palavras; **e)** palavras-chave: podem ser utilizados até seis descritores que identifiquem o conteúdo do artigo; **f)** introdução: deve conter os objetivos da pesquisa, justificativa de sua importância, apresentação das principais variáveis da pesquisa, definições, se necessárias, e discussão do problema à luz de bibliografia pertinente; **g)** material e métodos: claramente descritos e validados, de modo a possibilitar a sua reprodução. Qualquer modificação, em métodos já publicados, deve ser devidamente explicitada; **h)** resultados: devem ser claros e concisos, tabelas e figuras devem ser usadas somente quando necessárias e devem ser auto explicativas; **i)** discussão: pode ser apresentada conjuntamente aos resultados; **j)** conclusões: em alguns casos podem ser incluídas no item discussão, sendo assim, não há necessidade de repeti-las em item à parte; **k)** agradecimentos: (se for o caso); **l)** title, abstract e key words: em inglês antecedendo as referências; **m)** referências.

Os **artigos de revisão, atualização e relatórios técnicos** devem apresentar:

Página de rosto: como no artigo científico. **Texto:** **a)** título, **b)** autores, **c)** resumo, **d)** palavras-chave. Deve ser dividido em seções

com títulos e subtítulos apropriados. Incluir title, abstract e key words antecedendo as referências.

O **relato de caso** deve ser elaborado com a seguinte estrutura:

Página de rosto: como no artigo científico. **Texto:** **a)** título, **b)** autores, **c)** resumo, **d)** palavras-chave. Deve ser dividido em introdução, relato de caso e discussão. Incluir title, abstract e key words antecedendo as referências.

A **comunicação científica** deve ser elaborada com a seguinte estrutura:

Página de rosto: como no artigo científico. **Texto:** **a)** título, **b)** autores, **c)** resumo, **d)** palavras-chave. Não deve dividi-lo, ou seja, introdução, métodos, dados experimentais e outros devem compor de único texto. Incluir no máximo duas tabelas ou figuras ou uma tabela e uma figura, title, abstract e key words antecedendo as referências.

Os **resumos de teses e dissertações** deverão conter o nome do autor, título da obra, nome da Instituição para a qual foi apresentado o trabalho e ano da defesa.

IMPORTANTE: os textos devem ser redigidos com processador de texto WORD for WINDOWS 6.0 ou compatível, no formato A4, espaço duplo, letra Times New Roman e tamanho de letra 12. Se usar versão superior, enviar o arquivo em Rich Text Format (.rtf). Não serão aceitos arquivos compactados por ZIP, ARJ etc.

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. A localização aproximada destas 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.

Na ausência de um dado numérico, empregar os seguintes sinais convencionais:

- (-) Quando pela natureza do fenômeno, não puder existir o dado;
- (z) Quando o dado for rigorosamente zero;
- (...) Quando não se dispuser de dado;
- (0,0) Quando a aplicação dos critérios de arredondamento não conseguir alcançar respectivamente, os valores 1; 0,1; 0,01, etc.;
- (x) Quando o dado for omitido para evitar a individualização da informação.

ILUSTRAÇÕES (fotografias, gráficos, desenhos, mapas etc.) – Serão designadas no texto como “Figuras”: terão numeração única e seguida, em algarismos arábicos.

Todas as ilustrações devem ser identificadas com número, nome do autor, título do artigo e número da página do texto onde serão inseridas; 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 respectivas legendas devem estar escritas fora da área de reprodução. As ilustrações coloridas estão sujeitas à con-

firmação. Se as ilustrações enviadas já tiverem sido publicadas, mencionar a fonte e a permissão para a reprodução.

REFERÊNCIAS - Devem ser mencionadas somente as de trabalhos consultados diretamente ligados ao assunto.

A exatidão das referências é de responsabilidade dos autores.

No texto – As referências serão citadas por meio de número índice correspondente ao da lista de referências, escritas em versal. Assim, para um autor: “Taunay³¹ verificou”; para até dois autores todos deverão ser mencionados, separados pela letra **e**: “Pereira e Maia¹⁹, pesquisando...”. para mais de dois autores usar a expressão et al: “no trabalho de Tsunoda et al ⁶”; ou ainda...“ Segundo vários autores ^{1,3,7,8} ”.

Observação: nomes científicos somente em itálico.

As referências – terão numeração crescente e ordenadas alfabeticamente pelo último sobrenome do autor (regra geral). Quando existirem mais de três autores, indicar o primeiro seguido da expressão et al.

Para artigos periódicos

Último sobrenome do(s) autor(s) seguido das iniciais dos outros componentes do nome, título do artigo, título do periódico em negrito e abreviado conforme estilo usado na Lista de Periódicos Indexados no Index Medicus, nº do volume, páginas inicial e final, ano da publicação.

Exemplo:

Morley, A.; Trainor, K.; Blake, M.A. A primary stem-cell lesion in experimental chronic hypoplastic marrow failure. **Blood**, 45: 681-8, 1975.

Livro no todo

Último sobrenome do (s) autor (s) seguido das iniciais dos outros componentes do nome, título da obra, edição, imprensa (local de publicação, editora e ano de publicação), descrição física (nºs páginas ou volumes), notas especiais.

Exemplo:

Naoum, P.C. **Hemoglobinopatias e talassemias**. São Paulo: Sarvier; 1997. 171 p.

Capítulo de Livro

Último sobrenome do (s) autor (s) da parte referenciada, seguido das iniciais dos outros componentes do nome título da parte referenciada, último sobrenome do (s) autor (s) da publicação (precedido por In:), título da publicação, número da edição, local de publicação, editor, ano de publicação, página inicial e final da parte referenciada e/ou volume.

Exemplo:

Mansfield, J.M. Non pathogenic trypanosomes of mammals. In: Kreier, J.P., editor. **Parasitic protozoa I Taxonomy, kinetoplastids, and flagellates of fish**. New York: Academic Press; 1977. p.297-327.

Gomes, S. Informática e soberania. In: Benakouche, R.(org.). **A questão da informática no Brasil**. São Paulo: Brasiliense; 1985.

p.30-36.

Dissertações e Teses

Silva, R.M. **ELISA-IgG em Estudos Epidemiológicos da Esquistossomose Mansônica em Área de Baixa Endemicidade: Comparação com RIF-IgM e o Método Parasitológico Kato-Katz**. São Paulo, 1998. [Dissertação de Mestrado - Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo].

Referência da Internet: último sobrenome do(s) autor(es) do “site” seguido das iniciais dos outros componentes do nome, título do artigo, título do periódico (se for o caso), (em negrito e abreviado), nome do “site” entre colchetes. Data da consulta.

Exemplo:

Trucksess, M.W.; Chou, J. P.; Young, K.; Page, S. W. Determination and survey of ochratoxin A in barley, green coffee and roasted coffee. **FDA Science Forum Poster Abstract**, [http://Vm.cfsan.fda.gov/~firf/forum 97/97 A 30.html]. 5 maio 1997.

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.

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 nota prévia, 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.

SUMÁRIO/CONTENTS

Artigo/Article

- 951 **Determinação de vitamina A em pescado: adaptação de metodologia**
Vitamin A determination in fish: methodology adaptation
Nilson G. LANKHE; Glênio MAGAGNIN e Eliana B. FURLONG 151 - 158
- 952 **Controle de qualidade em laboratório de microbiologia de alimentos e avaliação de desempenho de meios de cultura no isolamento de *Salmonella* spp.**
Quality Control in food microbiology laboratory and evaluation of performance from the culture medium in the *Salmonella* spp. Isolation.
Dilma Scala GELLI; Christiane Asturiano RISTORI e Adriana Aparecida BUZZO 159 - 164
- 953 **Teores de nitrito de sódio em produtos cárneos comercializados em Maceió-AL.**
Sodium nitrite concentration in meat products sold in Maceió – AL.
Giselda Macena LIRA; Maria de Lourdes da SILVA NETA; Jailton Barros de SOUZA e Edna Santos de BARROS 165 - 170
- 954 **Soroprevalência de HIV em caminhoneiros usuários da Rodovia Anhanguera, SP 330, Brasil.**
HIV seroprevalence in truck drivers users of Anhanguera highway, SP 330, Brazil.
José Antonio P. BERRA; Liliana B. BACETTI; Kaiser J. F. ALVES e Vânia L. P. FIÓRIO 171 - 176
- 955 **Ocorrência de Aflatoxinas em amendoim e produtos de amendoim comercializados na região de Marília – SP, Brasil no período de 1999-2001.**
Occurrence of Aflatoxins in peanut and peanut products commercialized in the region of Marília - SP, Brazil in the period of 1999-2001.
Luzia SHUNDO; Rosângela A. SILVA e Myrna SABINO 177 - 181
- 956 **Ocorrência de Aflatoxinas em amendoim e seus produtos comercializados no Estado da Bahia durante o ano de 2002.**
Occurrence of Aflatoxins in peanut and peanut products commercialized in the state of Bahia during the year 2002.
Maria José M. BATATINHA; Monica M. dos SANTOS; Mariana B. BOTURA; Gisele N. ALMEIDA; Luciana F. DOMINGUES; Claudia H. KOWALSKI e Carlos A. MALLMANN 183 - 187
- 957 **A proposal of an alternative *in vitro* method for the evaluation of the safety of shampoos.**
Proposta de método alternativo *in vitro* para avaliação da segurança de shampoos.
Janice Campos de AZEVEDO; Áurea Silveira CRUZ e Terezinha de Jesus Andreoli PINTO 189 - 193
- 958 **A melancia como fonte de licopeno.**
Watermelon as source of lycopene.
Patrícia Y. NIIZU e Delia B. RODRIGUEZ-AMAYA 195 - 199

- 959 **Febre amarela silvestre no estado de São Paulo, Brasil: casos humanos autóctones.**
Jungle yellow fever in São Paulo state, Brazil: human autochthonous cases.
Iray M. ROCCO; Gizelda KATZ e Rosa M. TUBAK 201 - 206
- 960 **Estudo comparativo de soluções-tampão para determinação de fluoreto em águas para diálise.**
Comparative study of buffer solution for determination of fluoride in water used in dialysis.
Valéria P.Silva FREITAS; Berenice M. BRÍGIDO; Maria Irene C. BADOLATO;
Elaine M. A. MAZON e Janete ALABURDA 207 - 212
- 961 **Influência da relação superfície/volume em frituras de batata palito.**
Ratio surface/volume influence on french fries potato frying.
Patrícia V. DEL RÉ; Ana Lúcia COLTRO; João Cláudio Pimenta Penteadado MANENTE;
Gemma E. MARTI e Neuza JORGE 213 - 219
- 962 **Cultura primária de condrócitos articular humana em monocamada.**
Culture of human articular chondrocyte in monolayer.
Fabio Takashi Kitadai; Cristina Adelaide Figueiredo; Suely Pires Curti;
Luis Eugênio Garcez Leme; Clara De Rosa Carelli e Marco Martins AmatuZZi 221 - 226
- 963 **Composição química e estudo anatômico dos frutos de buriti do Município de Buritizal, Estado de São Paulo.**
Chemical composition and anatomic study of buriti fruits from Buritizal City, São Paulo State, Brazil.
Mário TAVARES; Sabria AUED-PIMENTEL; Leda Conceição Antonia LAMARDO;
Norberto Camilo CAMPOS; Luzia Ilza Ferreira JORGE; e Eduardo GONZALEZ 227 - 232
- 964 **Isolamento de micobactérias em espécimes clínicos, utilizando o sistema automatizado MB/BacT™.**
Mycobacteria isolation in clinical specimens using the MB/BacT™ system.
Dalva C. G. AILY; Daisy N. SATO; Maria Conceição MARTINS; Maria Alice da Silva TELLES e
Rede Estadual de Laboratórios da Tuberculose 233-237
- 965 **Composição e qualidade de pólen apícola comercializado em algumas cidades nos estados de São Paulo e Minas Gerais – Brasil.**
Composition and quality of bee-collected pollen commercialized in some country towns in São Paulo and Minas Gerais – Brazil.
Deborah H. Markowicz BASTOS; Cássia Isabel ROCHA; Ildenize Barbosa da Silva CUNHA;
Patricia de Oliveira CARVALHO e Elizabeth A. Silva TORRES 239 - 244

Comunicação Científica/ Brief Communication

- 966 **A questão da higiene de manipuladores das lanchonetes localizadas ao redor do campus do CEFET/ Química de Nilópolis, RJ.**
The question of hygiene of handlers in foodservice establishments located around the campus of CEFET/ Química de Nilópolis, RJ
Adriano G. da CRUZ; Bruno Jorge G. LOUZA; Cláudio N. CORNO; Edimir FERNANDEZ-FERREIRA;
Felipe M. TEIXEIRA; Gabriel de O. SANTOS; Marco Antônio L. SOUZA; Olidirenne R. MARTINS;
Rodrigo S.TAVARES e Rosangela da C. TEIXEIRA 245 - 248

RESUMOS DE TESES E DISSERTAÇÕES

- Fish residue valorization: application in the quail diet and study of effects in the eggs.**
Seibel, N. F 249
- Infecção pelos vírus linfotrópicos de células T humanas dos tipos 1 (HTLV-1) e 2 (HTLV-2) em indivíduos infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) em Londrina e região, Paraná, Brasil.**
Morimoto, H. K. 250
- Neurocisticercose: Aspectos clínicos, epidemiológicos e análise de 171 prontuários do Instituto de Infectologia Emílio Ribas de 1980 a 1990. São Paulo, 2003.**
Bedaque, E. A 251

Determinação de vitamina A em pescado: adaptação de metodologia

Vitamin A determination in fish: methodology adaptation

Nilson G. LANKHE¹
Glênio MAGAGNIN²
Eliana B. FURLONG^{3*}

RIALA6/951

Lankhe, N. G.; Magagnin, G. e Furlong, E. B.- Determinação de vitamina A em pescado: adaptação de metodologia. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 62(3): 151 - 158, 2003.

RESUMO. O objetivo deste trabalho foi extrair e determinar a vitamina A em músculo de pescado através de um método simples e confiável. A metodologia adaptada consistiu em determinar espectrofotometricamente palmitato de retinila extraído de lipídios de músculo de pescado pelo método de Bligh e Dyer (1959). No extrato lipídico aplicou-se uma técnica de limpeza empregando cromatografia de partição em minicoluna de alumina neutra, para separar a vitamina sem o emprego da saponificação, seguida de quantificação espectrofotométrica a 325 nm pela técnica de adições sucessivas. Para avaliação do potencial do método foram avaliados os coeficientes de variação (4 a 7%) e a recuperação média (90,7%). Estes dados de recuperação são promissores quando comparados a valores obtidos quando se empregou o método colorimétrico de Carr Price às amostras, contendo concentrações conhecidas de padrão, eliminando interferentes pelo método oficial (57%) e pelo proposto (75%). O método adaptado foi aplicado em amostra *in natura*, industrializada (enlatada) e processada termicamente (assada), mantendo suas características de repetibilidade e recuperação, a exceção de quando aplicado às amostras de pescado enlatado. A aplicação do método a amostras *in natura* de enchova (*Pomatomus saltatrix*) e de tainha (*Mugil brasiliensis*), porção comestível, resultou em níveis de 303 ER/100g (CV=5%) e 214 ER/100g (CV=7%) de vitamina A. Em enchova assada foi encontrado 255 ER/100g (CV=4%) de vitamina A.

PALAVRAS-CHAVE. palmitato de retinila, vitamina A, pescado.

¹Mestre em Engenharia de Alimentos pela Fundação Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS, Brasil.

²Estudante de graduação em Engenharia de Alimentos da Fundação Universidade Federal do Rio Grande, RS, Brasil.

³Departamento de Química, Fundação Universidade Federal do Rio Grande, RS, Brasil.

*Endereço para correspondência - Rua Engenheiro Alfredo Huch, 475 - 96201-900 Rio Grande, RS, Brasil

f: 053 2338645 fax: 053 2329716 - email: dqmebf@super.furg.br

INTRODUÇÃO

Os pescados são ricos em proteína, e algumas espécies também em ácidos graxos do tipo ômega três e vitaminas lipossolúveis que contribuem para o valor nutricional^{2,14}.

A vitamina A, retinol, é um álcool diterpênico formado por um anel trimetilcicloexenil e uma cadeia lateral de isoprenos, que se acumula nos depósitos de gordura, estando presente no fígado de peixes e de outros animais, na gordura do leite e na gema do ovo. O óleo de fígado de numerosas famílias de elasmobrânquios é rico em vitamina A^{10,12,14}.

Segundo Sikorski¹³, a carne de peixes magros pode atingir concentrações de vitamina A de até 100 UI/100g enquanto que em peixes gordos até 4500 UI/100g de carne, predominantemente como ésteres de ácidos graxos. Em peixes de água doce e anádromos predomina a forma de vitamina A2 que possui 40% da atividade do trans retinol^{4,9,10}.

A presença destes ésteres de retinol em pescados chama atenção por suas quantidades excederem em muito as necessidades biológicas e por permanecerem em níveis constantes mesmo que variem os teores de gorduras durante o ciclo de vida dos peixes⁴. No entanto, informações sobre a composição química dos pescados mais consumidos na América Latina são escassas, principalmente no que se refere aos nutrientes traços, como as vitaminas^{5,6}.

Parte desta situação se deve à dificuldade oferecida pelos métodos oficiais que sendo acessíveis são muito susceptíveis aos efeitos operacionais. Além disso uma mesma vitamina pode aparecer nos alimentos em diferentes formas químicas apresentando atividades vitamínicas distintas que podem ser determinadas para uma melhor avaliação do valor nutricional^{2,4,12}. Os métodos que permitem distinguir as diferentes formas químicas exigem instrumentação cromatográfica nem sempre disponível na maioria dos laboratórios de países em desenvolvimento, onde o conhecimento dos nutrientes dos alimentos é fundamental para definir políticas de desenvolvimento social^{10,12}.

O objetivo deste trabalho foi extrair e determinar a vitamina A em músculo de pescado e para tal foi adaptado um método. Desta forma poder-se-ia disponibilizar um procedimento menos susceptível aos erros inerentes do manuseio analítico de amostras contendo as diferentes formas de vitamina A e acessível a laboratórios que não disponham de condições para empregar rotineiramente técnicas mais sofisticadas de separação e quantificação. Para demonstrar o potencial do método proposto foram avaliados os níveis de recuperação, a repetibilidade, os resultados obtidos foram comparados com o método recomendado pela AOAC e os valores encontrados nas amostras de diferentes tipos de pescado com os registrados em bibliografia específica^{5,6}.

O método oficial de Carr Price, indicado pela AOAC possui dois pontos críticos: a necessidade de saponificação, que expõe a vitamina A a temperatura elevada, e a instabilidade do complexo colorido formado pelo retinol e o tricloreto de

antimônio, que gera resíduos tóxicos após as determinações^{6,10,12}. Na tentativa de diminuir estes problemas o método adaptado procurou efetivar a extração e determinação do palmitato de retinila, uma das principais formas da vitamina presente nos músculos, sem saponificação e empregando a absorvidade deste na região do ultra violeta a 325 nm¹².

MATERIAL E MÉTODOS

1. Amostras

As amostras de enchova (*Pomatomus saltatrix*) foram coletadas diretamente de barcos pesqueiros no porto da cidade do Rio Grande, RS, tomando um mínimo de 0,8% da captura para compor a amostra bruta. Foi aleatoriamente tomado 1% da amostra bruta para constituir a amostra de laboratório (aproximadamente 10 kg de pescado fresco). As amostras foram evisceradas e colocadas em recipientes fechados sob atmosfera de nitrogênio e congeladas até o momento das determinações.

As amostras de tainha (*Mugil brasiliensis*) foram adquiridas no mercado público da cidade do Rio Grande, RS, em três diferentes períodos do ano 2000, abril, agosto e outubro. Estas foram evisceradas e fileteadas no entreposto pesqueiro da cidade do Rio Grande, RS, levadas ao laboratório e homogeneizadas antes da tomada das amostras analíticas, para a determinação sem congelamento prévio.

O atum enlatado foi adquirido no comércio local e o lote foi formado por uma única marca, produzida por uma fábrica local. Após a homogeneização foram tomadas as amostras analíticas.

As enchovas assadas foram adquiridas numa festa popular da região, onde o pescado foi eviscerado, colocado em espetos fincados perpendicularmente no fogo, conforme o hábito regional.

2. Determinação de umidade e lipídios totais

O conteúdo de água presente foi determinado em todas as amostras de pescado pelo método de secagem em estufa a 100 – 110°C, até atingir peso constante, de acordo com AOAC nº 935.29¹. Lipídios totais foram determinados pelo método gravimétrico de Bligh e Dyer^{3,11}.

3. Determinação de palmitato de retinila em porção comestível de Pescado

Os pescados frescos eviscerados foram homogeneizados em liquidificador, bem como os outros tipos de amostras. Destes homogeneizados foram pesados exatamente 5 g de amostra, transferidos para um gral e macerados com 10 ml de metanol e 5ml de clorofórmio. Posteriormente foram acrescentados 5ml de clorofórmio e 5ml de água, macerando a cada acréscimo de solvente. O conteúdo do gral foi transferido quantitativamente para um tubo de centrífuga separando suas fases com força de 2500 G por 10 minutos.

A camada inferior, clorofórmica, foi transferida para um frasco âmbar previamente tarado, e o solvente evaporado sob

atmosfera de nitrogênio.

O resíduo seco foi dissolvido com hexano, eluído por uma coluna cromatográfica contendo celite (aproximadamente 10g) e o eluato coletado num balão volumétrico de 25ml completando o volume com hexano, preparando assim uma solução de concentração expressa em g de óleo.

Foi preparada uma coluna de vidro com 12 cm de comprimento contendo aproximadamente 9g de óxido de alumínio (alumina) neutro com atividade I (partículas entre 63 e 200 μ M) e sulfato de sódio anidro (0,1g) na parte superior. Os adsorventes foram tratados primeiramente com álcool isopropílico a 50% em hexano, seguido de 10ml de hexano.

Seca a coluna cromatográfica foram eluídos 5ml da solução amostra com o triplo deste volume de hexano em três porções iguais, o eluato foi coletado em frasco âmbar e evaporado sob atmosfera de nitrogênio. O eluato foi reconstituído com 5ml de hexano com agitação em banho ultra sônico e sua absorbância lida em 325nm.

A quantificação final de palmitato de retinila, nas diferentes amostras estudadas, foi realizada usando a técnica de adições sucessivas. Neste caso foram adicionados a 5 ml de solução de extrato purificado, 5 ml de solução padrão de palmitato de retinila contendo 13; 18; 23 e 32 μ M. Os solventes dessas misturas foram evaporados sob atmosfera de nitrogênio e as novas soluções reconstituídas com 5ml de hexano. A partir das concentrações de padrão adicionadas e absorbâncias lidas em 325nm foram determinados os parâmetros da curva de adição empregada para a quantificação.

A curva padrão foi preparada a partir de uma solução estoque contendo 0,0264g de palmitato de retinila (Sigma Chemical Corporation) em 50 ml de hexano. A partir desta foram preparadas soluções de concentrações que variaram entre 2 e 15 μ mol/L cujas absorbâncias foram lidas a 325 nm.

4. Repetibilidade

Após o estabelecimento do procedimento de extração, limpeza e clarificação do extrato vitamínico, a repetibilidade foi testada empregando o procedimento em seis alíquotas de polpa de enchovas provenientes do mesmo lote e os coeficientes de variação foram calculados⁷. Tais experimentos foram realizados em três períodos diferentes durante o desenvolvimento do trabalho.

5. Recuperação

A exatidão do método foi testada pela recuperação em três níveis diferentes, foram eles 67, 100 e 134 μ g de palmitato de retinila adicionados respectivamente a 10 g de massa de amostra de enchova homogeneizada. Os testes foram realizados em duplicata seguindo o procedimento de determinação de vitamina A, descrito no ítem 3.

6. Limite de detecção

O limite de detecção foi determinado diluindo soluções de palmitato de retinila padrão (a partir de 5 μ l /L) e avaliando a

linearidade da relação concentração e absorbâncias em valores menores que 0,2⁷. Para estimar o limite de detecção na amostra foi empregado o procedimento recomendado por Horwitz et al.⁷, determinando a absorbância de soluções de amostras diluídas que resultavam em valores entre 0,15 e 0,2. Estes foram convertidos nas respectivas concentrações na curva padrão de adições sucessivas. Considerou-se o limite de detecção a concentração correspondente ao dobro do valor do desvio padrão de 6 determinações.

7. Comparação com outro método de determinação de vitamina A

Para estudo de comparação dos níveis de vitamina A obtidos pelos métodos de Carr Price (AOAC, nº 974.29) e pelo proposto foram usadas amostras de enchova, provenientes da mesma coleta. Foi avaliada a recuperação pelos dois métodos, empregando os mesmos níveis de palmitato de retinila descritos no ítem 5. O palmitato de retinila foi adicionado de duas formas diferentes, ao extrato e diretamente nas amostras de músculo homogeneizadas. Os experimentos foram realizados em triplicatas.

8. Aplicabilidade do método proposto

Para avaliar a aplicabilidade do método proposto foram tomadas amostras homogeneizadas de músculos de enchovas (*Pomatomus saltatrix*) e de tainhas (*Mugil brasiliensis*) “in natura”, de atum enlatado e de enchova processada termicamente (assada). Todas as determinações foram realizadas em triplicatas em dois períodos diferentes.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. O método, quanto à extração dos lipídios

Os experimentos foram realizados na ausência de luz procurando prevenir a decomposição da vitamina A, sob a forma de palmitato de retinila. As determinações de umidade e lipídios totais foram úteis para informar o desempenho do método de extração utilizado e a integridade da composição química do pescado no que diz respeito às quantidades desses componentes, pois segundo Ogawa e Maia⁹ a soma dos teores de umidade e lipídios em pescado in natura está ao redor de 80% em relação à massa.

No método proposto a extração dos lipídios foi realizada segundo o método de Bligh e Dyer³, o que é uma vantagem pois as amostras não foram submetidas a temperaturas superiores a 50°C, foram extraídos os lipídios apolares e os polares³. A Tabela 1 apresenta os resultados médios da umidade (U) e dos lipídios totais (LT) determinados por métodos gravimétricos em músculos das amostras de enchovas e tainhas, coletados durante o desenvolvimento do trabalho (2000-2001).

Os resultados expressos na Tabela 1 concordam com Ogawa e Maia¹⁰ no que diz respeito à soma dos teores de umidade e lipídios. Os níveis de lipídios encontrados nas enchovas está conforme Contreras-Guzmán⁴, pois segundo o autor, “a enchova apresenta de 9,6 a 16% de gordura, estando

ela localizada na parte ventral e a soma U + LT permanecendo relativamente constante”.

Os coeficientes de variação para os LT foram baixos para as enchovas, 14,5% a 16,1%, o que decorre de os espécimes de pescado coletados na mesma amostragem, possuíam tamanhos similares e possivelmente não apresentavam influência das variações próprias do ciclo de vida⁹.

As tainhas não apresentaram essa regularidade, sendo seus LT de 1,7% até 11,1%, pois as amostras foram tomadas em diferentes locais de captura e épocas do ano.

2. Verificação da etapa de remoção de interferentes

Aplicando-se o procedimento de remoção de interferentes do método proposto em soluções hexânicas dos óleos extraídos de músculos de enchovas e de tainhas foram obtidos eluatos com espectros de absorção que foram comparados com o espectro do palmitato de retinila padrão submetido às mesmas condições.

A observação dos espectros da Figura 1 ilustra o que levou a considerar o procedimento de partição em colunas de alumina proposto (item 3) como satisfatório. Observa-se no palmitato de retinila uma banda larga de absorção entre 320 e 330nm, sendo possível observar o mesmo comportamento no espectro do extrato hexânico purificado do óleo de enchova, embora ambos difiram nas regiões de comprimentos de onda menores que 300 nm.

Tendo em vista que a espectroscopia de ultravioleta/visível não é conclusiva, principalmente na região de maior absorção do composto em estudo, foram adotados outros procedimentos que corroborassem com esta observação.

Um deles consistiu em submeter uma solução de padrão puro e soluções de extratos lipídicos de enchova e tainha puros e respectivamente acrescidos com palmitato de retinila, em concentrações conhecidas, ao procedimento de limpeza adotado. Os resultados médios de seis repetições mostraram que 99% (CV = 2%) do palmitato de retinila foram eluidos, quando estava puro. Nos extratos hexânicos de amostras em que se adicionou padrão foi observado um aumento de absorção, esperado em função dos níveis adicionados de padrão, que em média corresponderam a 95% (CV=3%).

A remoção dos interferentes dos extratos hexânicos de enchova foi estimada a partir da quantificação de retinol sem passa-los pelas colunas cromatográficas de limpeza. Foi observada uma diferença na absorção que correspondeu a uma remoção média de 81% (CV = 5%), dos interferentes.

A observação de todos estes dados indicaram que a eluição do palmitato de retinila (PR) pela coluna cromatográfica do método proposto é praticamente de 100%. Tal resultado poderia estar mascarado pela volatilidade do solvente, o que concentraria a solução ou pela instabilidade da vitamina A que facilmente sofre oxidação, dimerização e isomerização, o que o diminuiria¹⁴. No entanto, ambos os efeitos podem ocorrer simultaneamente e se compensarem, conforme indicam os resultados.

No caso do experimento realizado com a solução de amostras com ou sem o procedimento de limpeza, a informação prestada pelo resultado é que o método de partição usado removeu mais de 80% das substâncias que interferem na absorbância do palmitato de retinila, existente no óleo de enchova, e que o eluato hexânico possivelmente contenha este composto absorvendo em 325nm com menos interferentes.

Os mesmos experimentos realizados para avaliação da remoção de interferentes na tainha sugeriram a necessidade de se adequar o volume de solvente usado para eluir a forma vitamínica a ser determinada. Considerando esta observação ao trabalhar com amostras de tainhas e as processadas termicamente foi duplicada a fase estacionária e a remoção de interferentes obtida apresentava valores médios de remoção de 80%

Tabela 1. Umidade e lipídios totais em músculos de enchovas e tainhas

Espécies	Umidade	CV	LT	CV	Umidade + LT
		(%)		(%)	(%)
Enchova	63,3	1,0	15,2	3,9	78,5
Tainha	72,3	5,6	6,5	45,3	78,8

LT = lipídios totais e CV = coeficiente de variação

Estas observações nortearam a quantificação das amostras usando a técnica das adições sucessivas, pois desta forma seria minimizado o efeito dos interferentes, ainda presentes após a limpeza realizada, nos resultados finais de quantificação de palmitato de retinila.

3. Repetibilidade

Considerando-se que se trata da quantificação de traços possuidores de instabilidade química (o palmitato de retinila sofre fotoxidação e isomerizações) e o uso de um solvente com instabilidade física (volatilidade), podem ser considerados como satisfatórios coeficientes de variação até 20%^{7,10}. Nas determinações realizadas esses coeficientes foram, inclusive, inferiores a 10%, como pode ser observado na Tabela 2.

Tabela 2. Repetibilidade do método proposto em diferentes amostras

Amostra	ER/100g	CV(%)
Enchova (<i>Pomatomus saltatrix</i>)	303	4,6
Tainha (<i>Mugil brasiliensis</i>)	255	7,4
Enchova assada em braseiro	214	3,9
Atum enlatado	378	4,0

ER/100g = equivalente de retinol CV = coeficiente de variação

4. Recuperação

Os procedimentos de recuperação foram realizados de acordo com o descrito no item 5 de material e métodos em amostras de enchovas. Estas foram escolhidas por terem sido amostradas num sistema mais homogêneo, ou seja num único barco pesqueiro onde possivelmente foram capturadas de cardumes que se encontravam próximos e tomando espécimes de tamanhos semelhantes para comporem a amostra analítica.

A média obtida foi de 91%, com coeficiente de variação (CV) de 4% entre os diferentes níveis de adição, quando se considera as seis determinações. Novamente vale ressaltar que por se tratar de determinações em quantidades traços estes valores podem ser considerados bons para os níveis de adição abrangendo a faixa de linearidade do método (2 a 15 $\mu\text{moles/L}$)^{7,10}. Os resultados aparecem na Tabela 3.

6. Aplicabilidade do método proposto

O método proposto e avaliado foi aplicado nas amostras mencionadas no item material e métodos e os resultados médios de seis determinações estão na Tabela 3. Nesta os valores são expressos como equivalentes de retinol por grama de óleo e por 100g de amostra, pelo fato de que os níveis podem diferir consideravelmente em pescados que apresentem conteúdos diferentes de óleo. Este tipo de apresentação também possibilita que se faça uma estimativa da porcentagem de equivalentes de retinol de uma espécie a partir do seu conteúdo de lipídios totais, sempre lembrando que estes podem ser influenciados por variáveis bióticas e abióticas^{4,9,13}.

Sikorski¹³ mostrou que nas espécies gordas como o arenque, por exemplo, foram encontradas de 333,3 a 15000 UI de vitamina A em 100g de carne. A enchova é uma espécie gorda e segundo Contreras-Guzmán⁴ podem ser encontrados de 30 a

Tabela 3. Recuperação de palmitato de retinila em amostras de enchova *in natura*

Amostra	$\mu\text{g PR/g am.}$	$\mu\text{g PR/g adicionado}$	$\mu\text{g PR/g recup.}$	% recuperação
Enchova a	2,9	-	2,7	-
Enchova b	3,3	-	3,0	-
Enchova a sp1	9,6	6,7	6,1	90
Enchova b sp1	10	6,7	6,2	93
Enchova a sp2	12,9	10,01	9,3	93
Enchova b sp2	13,3	10,01	8,4	84
Enchova a sp3	16,2	13,34	11,6	87
Enchova b sp3	16,6	13,34	12,4	93

a, b = duplicata sp = solução padrão 1,2,3 = níveis adicionados resultados médios de 6 determinações

5. Limite de Detecção

Considerando-se que o limite de detecção depende da absorvidade do analito e do equipamento empregado, adotou-se a comparação da linearidade de concentrações de soluções que apresentaram absorbâncias inferiores a 0,2 com as obtidas em valores superiores a este. Os resultados mostraram que a curva padrão usando valores entre 2 e 5 $\mu\text{moles/L}$ apresentaram um coeficiente de correlação de 0,9951 e declividade 0,0504 comparada a 0,9917 e 0,0505, respectivamente, das curvas obtidas com maiores concentrações. Tal resultado permitiu empregar o método a amostras com menores níveis de concentração de palmitato de retinila.

A estimativa mostrou que a menor quantidade de palmitato de retinila presente na amostra para ser detectada deveria estar em torno de 1 $\mu\text{g/g}$ de amostra.

1350 ER em 100g de carne. Para Ludorf e Meyer⁸, os óleos da porção comestível dos pescados gordos contêm escassas percentagens de vitaminas lipossolúveis, mas proporcionam, em termos absolutos, notáveis quantidades de vitaminas para a dieta, por ser muito elevado o seu conteúdo em gordura.

Os valores encontrados nas amostras estudadas aparecem na Tabela 4.

Em amostra de pescado industrializada (enlatado de atum), o resultado de ER pareceu elevado, principalmente se comparado com os disponíveis na literatura, em que o percentual de vitamina A em atum em conserva varia de 6,5 a 25 ER/100g^{2,5}. Isso tornou a observação do espectro de absorção desse eluato, o qual se encontra na Figura 2, importante para outras discussões.

No espectro acima foi percebido que entre 290-350nm existem dois picos de absorção, um ao redor de 300nm e o outro,

Tabela 4. Equivalentes de retinol (ER) por grama de óleo e 100g de músculo em pescados *in natura* e processados

Tipo de amostra	ER/g de óleo	ER/100g de amostra (porção comestível)
Enchova in natura	21 (CV= 4%)	303 (CV = 5%)
Enchova assada	15 (CV= 8%)	255 (CV = 7%)
Tainha in natura	24 (CV= 9%)	214 (CV = 4%)
Atum enlatado	-	378 (CV = 4%)

CV= coeficiente de variação

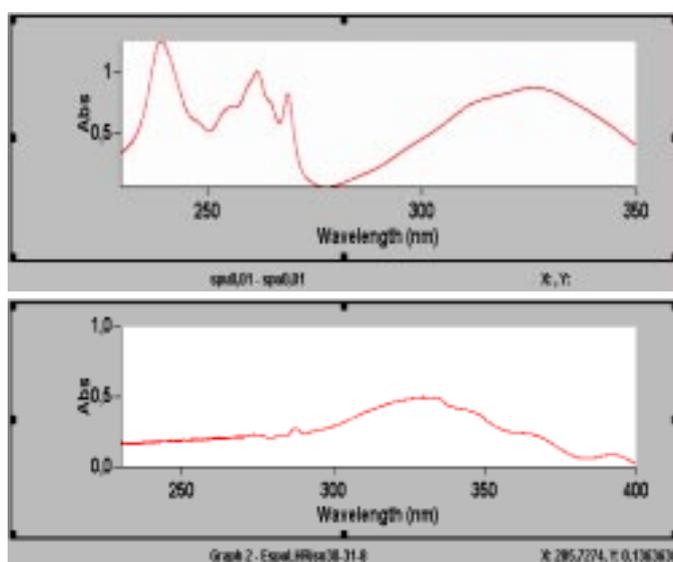


Figura 1. Espectros de absorção de soluções hexânicas de palmitato de retinila (1) e de óleo extraído de músculo de enchova após a remoção de interferentes(2)

de 315nm, esse provavelmente devido a uma das formas da vitamina A ou um produto de sua degradação, enquanto o segundo, poderia ser o do α -tocoferol, antioxidante cujo uso industrial é permitido e cuja absorvância máxima, de acordo com Parrish et al é 298nm¹⁰. Além disso os valores das absorvâncias, encontradas durante o registro do espectro destas amostras, estavam muito acima do que foi encontrado para outras empregando as mesmas massas analíticas.

Logo, a forma de vitamina A existente no atum em conserva pode não ser todo trans palmitato de retinila, e portanto não teria 100% de atividade biológica. Isso é explicável uma vez que, o processo de industrialização pode promover isomerizações e oxidações na vitamina A, além de acrescentar substâncias ao produto¹⁴. Tais resultados mostram que para determinações de palmitato de retinila em amostras de pescado processada com outras fontes de lipídios será necessário realizar adaptações no procedimento proposto para remoção dos interferentes.

Em enchova assada foi verificada a necessidade de utilização de uma coluna com dimensões duplicadas para a remoção dos interferentes. O resultado, quanto ao percentual

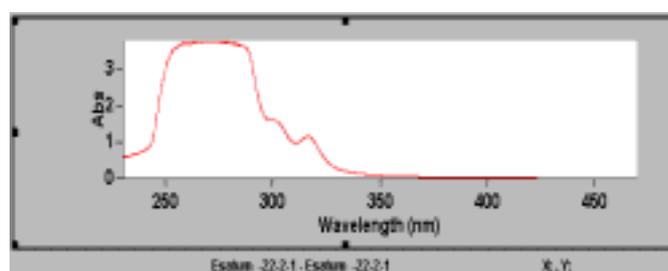


Figura 2. Espectro de absorção do eluato hexânico da amostra de atum industrializado removidos os interferentes pelo método proposto.

de óleo (de 17 a 19%), pareceu coerente uma vez que o mesmo sofreu pequeno acréscimo em termos quantitativos pois a massa total diminuiu pela perda de água devido ao processamento, ocasionando um aumento no percentual lipídico.

Comparações com dados de literatura mostraram que os valores determinados encontram-se nas faixas esperadas, porém tendo em vista o fato que especificamente determinações nas espécies em que se realizou o estudo não estão disponíveis, considerou-se mais adequado comparar os resultados obtidos com metodologia adaptada em um lote de amostras de enchova com os obtidos nas mesmas pelo método de Carr Price¹.

O resultado médio de três repetições com o método de Carr Price foi de 8,5 ER/g de óleo extraído de músculo do pescado, com um CV de 13%. Enquanto que usando o método proposto o resultado médio foi de 19,1 ER/g desse óleo com um CV de 4%, ou seja, 2,25 vezes superior ao obtido pelo método oficial.

O teste de recuperação, empregando extratos hexânicos purificados com o procedimento proposto, mostrou uma recuperação média de 75% (CV = 13%) para os mesmos níveis de palmitato de retinila da Tabela 3. Quando o método oficial foi testado adicionando os padrões nas amostras de músculo de enchova a recuperação média foi de 57% (CV = 16%).

No caso o menor valor era esperado se considerarmos a instabilidade do complexo colorido do analito com o tricloreto de antimônio, demonstrado pela recuperação após a limpeza dos extratos pelo método proposto e o efeito da temperatura de saponificação, demonstrado quando se adicionou padrões às amostras, antes de extração e eliminação de interferentes pelo método oficial. Estas observações indicam o que vem sendo mencionado, que o método oficial pode subestimar os níveis de palmitato de retinila presentes em amostras de pescado. As

diferenças observadas entre os resultados dos dois métodos mostraram que não seria necessário recorrer a testes estatísticos de significância.

CONCLUSÕES

A remoção de interferentes, no método alternativo proposto, foi realizada por uma técnica cromatográfica de partição em coluna, que substituiu a saponificação, rotineiramente utilizada para esse fim, e mostrou-se capaz de atingir esse objetivo, sendo isso demonstrado pelos experimentos nos quais 80% dos interferentes da determinação foram removidos quando o método foi testado em pescado “in natura”.

O indicativo de exatidão do método foi demonstrado pela recuperação média dos três níveis de adição 91%; a precisão indicada pela repetibilidade caracterizou-se por coeficientes de variação inferiores a 10% e pela possibilidade de detectar até 1 µg de palmitato de retinila/ grama de amostra.

A comparação com o método oficial, Carr Price, mostrou que a eliminação das etapas de saponificação e de derivação colorimétrica resultavam numa diferença superior a 20%, nas etapas de extração e quantificação, nos níveis de recuperação e em valores quantificados cerca de 2,5 vezes superiores de palmitato de retinila.

A determinação de palmitato de retinila pelo método proposto mostrou que as amostras de enchova possuíam valores de 19 a 21 ER/g de óleo (280 a 334 ER/100g de músculo) quando *in natura* e de 15 a 20 ER/g de óleo (255 a 374 ER/100g de enchova) quando assada, enquanto que o músculo cru de tainha apresentava de 22 a 25 ER/g de óleo (170 a 213 ER/100g de músculo). Para o atum enlatado os resultados não foram considerados confiáveis.

A simplicidade do método adaptado, os seus indicadores de precisão e exatidão mostram que o objetivo de disponibilizar procedimento confiável para possibilitar o melhor conhecimento dos alimentos consumidos pela população foi atingido com as adaptações realizadas.

RIALA6/951

Lankhe, N. G.; Magagnin, G. e Furlong, E. B - Vitamin A determination in fish: methodology adaptation.
Rev. Inst. Adolfo Lutz, 62(3): 151 - 158, 2003.

ABSTRACT. The aim of this study was the extraction and determination of Vitamin A in fish muscle by a simple and reliable method. The adapted methodology consisted of spectrophotometric determination of retinil palmitate in fish muscle, by using Bligh and Dyer³ method. To cleaned up the fish muscle extactact it was used a neutral alumina minicolumn and the determination of vitamin A was at 325 nm. The coefficient of variation ranged from 4 to 7% and recovery was 91%. It was higher when compared to the obtained on Carr Price's colorimetric method, 57 and 75%. The methodology was applied to determine vitamin A in fish samples “in natura”, industrialized and heat processed (baked), maintaining their characteristics of accuracy and precision, exception when sample was canned tuna. Edible parts of bluefish (*Pomatomus saltatrix*) and mullet (*Mugil brasiliensis*) *in natura* resulted in 303 RE/100g (VC= 5%) and 214 RE/100g (VC=7%) respectively. In the processed products – baked bluefish 255 ER/100g (VC= 4).

KEY WORDS. retinil palmitate, vitamin A, fish

REFERÊNCIAS

1. Association of Analytical Chemists Society. **Official Methods of Analysis of A.O.A.C.**, 15. ed., 1995.
2. Anderson, L. et. al. **Nutrição**. 17. ed., Rio de Janeiro: Guanabara, 1988.
3. Bligh, E.G.; Dyer, W.J. A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification, **Can. J. of Biochem. and Phys.**, 37(8): 911 – 917, 1959.
4. Contreras-Guzmán, E. S. **Bioquímica de pescados e derivados**, Jaboticabal : FUNEP, 1994.
5. Franco, G. **Tabela de Composição Química dos Alimentos**. 9. ed., São Paulo – Rio de Janeiro – Belo Horizonte: Atheneu, 1997.
6. Hole, S; Hole, M.; Taylor, K.D. Methods of Extraction Composition and Stability of Vitamin A and Other Components in Dogfish (*Squalus acanthias*) Liver Oil, **Food Chemistry**, 55 (3): 215 – 220, 1996.
7. Horwitz, W.; Kamps, L.R.; Boyer, K.W. Quality assurance in the analysis of foods for trace constituents. **J Assoc. Off.**

- Anal. Chem.** 63 : 1344-1355, 1980.
8. Ludorff W.; Meyer, V. **El Pescado y los Productos de la Pesca**, Zaragoza(España): Acribia, 1988.
 9. Ogawa, M.; Maia, E.L. **Manual de Pesca. Ciência e Tecnologia do Pescado**. vol. 1, São Paulo: Varela, 1999.
 10. Parrish, D. R. et al. Vitamin A. In: Augustin, J. et al; **Methods of Vitamin Assay**. 4th ed.; New York: John Wiley & Sons, 1985, Chap. 7, p. 153-184.
 11. Reguly, J.C. **Introdução à analítica e à tecnologia dos carboidratos, lipídios, proteínas e enzimas**. Rio Grande do Sul: Editora da FURG, 1983.
 12. Santana, D. M. N. **Determinação de palmitato de retinil, retinol e β -caroteno em margarina vegetal, manteiga e leite por cromatografia líquida de alta eficiência**, Campinas: Faculdade de Engenharia dos Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, 1993. 125 p. [Tese de Doutorado em Ciência de Alimentos].
 13. Sikorski, Z. E. **Tecnologia dos produtos do mar: recursos, composição nutritiva e conservação**, Zaragoza: Acribia, p. 130, 1994.
 14. Wong, D. W. S. **Química dos alimentos: mecanismos e teoria**, Zaragoza Acribia, 1995.

Recebido em 23/04/2002; Aprovado em 12/11/2003

Controle de qualidade em laboratório de microbiologia de alimentos e avaliação de desempenho de meios de cultura no isolamento de *Salmonella* spp.

Quality Control in food microbiology laboratory and evaluation of performance from the culture medium in the *Salmonella* spp. isolation.

Dilma Scala GELLI¹
Christiane Asturiano RISTORI^{1*}
Adriana Aparecida BUZZO¹

RIALA6/952

Gelli, D. S.; Ristori, C. A. e Buzzo, A. A. - Controle de qualidade em laboratório de microbiologia de alimentos e avaliação de desempenho de meios de cultura no isolamento de *Salmonella* spp. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 62(3): 159 - 164, 2003.

RESUMO. Os dados de laboratório devem ser reais e confiáveis, pois orientam os sistemas de controle de patógenos aplicáveis em toda a cadeia de produção de alimentos, especialmente para os de incidência e severidade consideráveis. Dentre as bactérias patogênicas de maior interesse à saúde pública estão as do gênero *Salmonella*, que podem estar presentes nos alimentos em baixos números ou em estado fisiológico de "stress", dificultando seu isolamento. Diversos laboratórios de pesquisa têm se preocupado com a validação de métodos analíticos para seu isolamento e detecção, avaliando a eficiência dos meios de enriquecimento e de isolamento seletivo. Com este propósito, foi desenvolvido e avaliado o desempenho de uma mistura de *Salmonella* Typhimurium e microrganismos competidores/interferentes (*E.coli*, *P.mirabilis*, *P.aeruginosa*, *C.freundii* e *S.aureus*), mantidos sob congelamento à (-)18°C por 30 dias, a fim de referendar e validar a metodologia usada para o isolamento de salmonelas a partir de alimentos. Os resultados diários foram satisfatórios quanto à recuperação da *S.Typhimurium* utilizada como controle e demonstraram que é possível o preparo prévio da mistura controle. Os testes ecométricos, de seletividade e produtividade e de recuperação demonstraram a adequacidade geral dos meios de cultura e temperaturas usados nas diferentes etapas analíticas. Observou-se que o caldo Rappaport-Vassiliadis modificado apresentou melhor desempenho, por inibir a formação de véu (crescimento invasor) de *Proteus* nos meios sólidos usados.

PALAVRAS-CHAVE. *Salmonella* spp., controle de qualidade, alimentos, metodologia de isolamento.

¹ Seção de Microbiologia Alimentar do Instituto Adolfo Lutz - São Paulo, S.P.

*Endereço para correspondência:

Instituto Adolfo Lutz - Av. Dr. Arnaldo, 355 - São Paulo, S.P. - CEP 01246-902 - e-mail: car@usp.br

INTRODUÇÃO

A validação das metodologias analíticas para o isolamento de patógenos em alimentos tem implicações importantes na saúde pública e do consumidor. Seu isolamento, para identificar as vias de transmissão ao homem e contaminação do meio ambiente é importante, pois pode permitir a adoção de medidas de controle. Entretanto, para que o dado científico e a monitorização de sua presença sejam confiáveis, podendo servir de base real para as atividades de controle, o método analítico deve ser comprovadamente efetivo e eficaz. Este diferencial é o que determina a confiabilidade do resultado e a sua adequabilidade para indicar onde uma medida de controle é aplicável em cada um dos elos da cadeia produtiva do alimento e garantindo a segurança (inocuidade) do alimento frente ao microrganismo em questão⁴.

Dentre os agentes de agravo à saúde, a *Salmonella* spp. tem importância e interesse consideráveis. Mundialmente, é um dos principais agentes responsáveis por doenças de origem alimentar^{3,9,13}. É um dos principais a ser controlado pelos sistemas de gestão da segurança dos alimentos: aplicação das Boas Práticas, do Sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle - APPCC, estabelecimento de parâmetros e procedimentos de normatização por órgãos públicos e interessados, entre outros.

As salmonelas pertencem à Família Enterobacteriaceae e são encontradas no trato intestinal do homem e de outros animais de sangue quente. Estão amplamente distribuídas na natureza, podendo contaminar produtos alimentícios^{9,13}.

Entretanto, o isolamento desta bactéria a partir de alimentos tem interferências, tais como sua distribuição heterogênea entre unidades de um mesmo lote ou partida de alimentos, números baixos de células viáveis na amostra, diversidade e números proporcionalmente elevados de microbiota competidora presente, além do "stress" fisiológico (injúria física)¹.

A análise laboratorial para a detecção desta bactéria é um processo de importância no contexto de saúde pública e da garantia do controle de produtos. As legislações e as condições endêmicas e epidêmicas exercem pressão para que o resultado seja confiável e caracterize a distribuição desta bactéria entre os produtos alimentícios. Portanto, não só por razões de credibilidade do laboratório, mas sobretudo pelas implicações sociais, de saúde pública e econômica, os resultados analíticos devem ser exatos e confiáveis.

As metodologias descritas para o isolamento da *Salmonella* spp. podem ser classificadas como padrão (pré-enriquecimento, enriquecimento seletivo e isolamento a partir de meios seletivos) e métodos simplificados ou rápidos, para os quais o método padrão é referência⁶.

Segundo a "American Public Health Association" (APHA), a ocorrência de resultados não confiáveis é decorrente também da preparação imprópria dos meios de cultura ou da

ausência de controles biológicos pertinentes. A utilização de controles positivos (cepas padrão de *Salmonella*), controles negativos (teste de esterilidade e controles biológicos com outros microrganismos não-salmonela) e testes de recuperação de salmonela são necessários nos laboratórios de rotina diagnóstica e de pesquisa. Os controles de qualidade dos meios de cultura e dos métodos já estão descritos e são indispensáveis para referendar os resultados analíticos^{6,8}. Entretanto, esses demandam atividades laboriosas, como por exemplo a necessidade diária de preparação das cepas para as provas de recuperação que acompanham a análise de amostras.

O objetivo deste trabalho é apresentar modelo de validação de meios de cultura e temperatura de incubação para o isolamento de *Salmonella* spp. em alimentos, utilizando uma cepa de *S.Typhimurium* e uma mistura de microrganismos competidores e interferentes (*E.coli*, *P.mirabilis*, *P.aeruginosa*, *C.freundii* e *S.aureus*), mantidos sob congelamento à (-)18°C em presença de crioprotetor, no Laboratório de Microbiologia Alimentar no Instituto Adolfo Lutz Central e propor sistemática de conservação de cepas controle necessárias para as atividades de controle analítico.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Cepas e seu preparo

As cepas de *Salmonella* *Typhimurium* Thomasville 1B, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Citrobacter freundii* ATCC 8090, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Proteus mirabilis* IAL 1022, *Staphylococcus aureus* IAL 1606 cedidas pela Seção de Coleção de Culturas Bacterianas do IAL, liofilizadas, foram reativadas em caldo infusão de cérebro e coração (BHI - Brain Heart Infusion Broth), incubado a 35°C/18h. Em seguida foi realizado um subcultivo das mesmas utilizando este mesmo meio.

2. Teste ecométrico

Os meios de cultura seletivos diferenciais foram testados pelo método ecométrico, segundo Mossel¹¹. Os meios usados no presente trabalho foram: ágar *Salmonella-Shigella* (SS), ágar Verde Brillante (VB) e ágar Sulfito de Bismuto (ASB).

O teste ecométrico permite avaliar a capacidade seletiva e de produtividade da bactéria desejada. A avaliação dos resultados é baseada na formação de estrias de crescimento dos microrganismos nos meios sólidos testados, sendo dado o valor de 0,2 para cada estria. A soma total de cada estria formada é denominada de valor de Índice de Crescimento Absoluto (ICA)¹¹. Para um meio de cultura ser considerado produtivo o ICA deve ser de pelo menos 3,5 e para ele ser seletivo a cepa desejada deve ter o ICA maior que 3,0 e as cepas não desejadas menor que 2,0.

3. Avaliação da seletividade, produtividade e recuperação da *S.Typhimurium* nos caldos de enriquecimento

3.1. Recuperação da *S.Typhimurium* nos caldos de enriquecimento

Tubos contendo 3 mL dos caldos BHI, selenito-cistina (SC) e Rappaport-Vassiliadis modificado (RV), respectivamente, foram inoculados com uma gota da cultura da cepa de salmonela, em fase estacionária. Este procedimento foi realizado em duplicata, para que a incubação fosse realizada em duas temperaturas, a 35°C e 42°C/18-24h. Após esse período foi realizada a partir de cada cultura, a Contagem Padrão em Placas (CPP)¹², em ágar nutritivo, em profundidade, para a quantificação da cepa de salmonela, seguido da incubação a 35°C/24h.

3.2. Seletividade e produtividade dos meios de enriquecimento seletivos⁸

A cultura da cepa de *S.Typhimurium* cultivada em caldo BHI e em fase estacionária de desenvolvimento (18-24h de incubação a 35°C, que continha cerca de 10⁹ UFC/mL), foi diluída até 10⁻¹² em água peptonada tamponada a 1% (APT). De cada uma das diluições, foram transferidas alíquotas de 1,5 mL para cada dois tubos contendo 15 mL de caldo selenito-cistina e de 0,1 mL para dois tubos contendo 10 mL de caldo Rappaport-Vassiliadis, modificado. A cada um dos tubos de meio de cultura de enriquecimento seletivo foi acrescentado 0,2 mL da mistura das culturas das bactérias interferentes, diluída a 10⁻² (em APT), ou seja, mistura das culturas das cepas de *E.coli*, *C.freundii*, *P.aeruginosa*, *P.mirabilis* e *S.aureus* (cerca de 10⁵ UFC/mL de interferentes).

Um conjunto de tubos dos meios de enriquecimento seletivo (SC e RV), foi incubado a 35°C e o outro a 42°C por 18 horas. Após este período cada tubo foi semeado, por estrias, em superfície nos meios seletivos VB, SS e ASB e incubados a 35°C/18h.

As colônias características de *Salmonella* spp. foram isoladas em meio para identificação presuntiva de enterobactérias (IAL) e incubadas a 35°C/18h. As cepas que apresentavam provas bioquímicas características foram submetidas a provas sorológicas com anti-soros polivalentes somático e flagelar.

Estes testes foram repetidos quatro vezes e o resultado expresso foi a média destes.

4. Preparação e conservação da mistura *S.Typhimurium* e interferentes, para uso como controle do método analítico

A partir da cultura de *S.Typhimurium* em caldo BHI, fase estacionária, foram realizadas CPP, em profundidade, com ágar nutritivo e incubação a 35°C/24h¹². Considerando a contagem obtida e os resultados dos testes de seletividade e produtividade, foi selecionada a diluição 10⁻⁷, que continha níveis de centenas de células viáveis/mL, para o preparo do controle. Em um pequeno tubo para congelamento (tubete) com capacidade para 2 mL, foi distribuído 1 mL de uma suspensão preparada com: 10 mL da diluição selecionada, 0,2 mL da mistura de interferentes e 2 mL de glicerol, como crioprotetor das células das bactérias. Os tubetes foram conservados a (-)18°C até o momento do uso.

5. Avaliação do uso dos tubetes congelados para o controle do método analítico

Diariamente, no período de um mês, um tubete controle foi descongelado a temperatura ambiente e usado para o controle do método. O conteúdo do tubete foi transferido para um frasco contendo 225 mL de APT. O controle foi analisado em paralelo com as amostras de alimentos para a determinação de salmonelas, utilizando-se as mesmas etapas analíticas, estufas e lotes de meios de cultura: pré- enriquecimento em APT, enriquecimento seletivo em SC e RV incubados a 35°C e 42°C, isolamento nos meios em placas SS, VB e ASB, isolamento das colônias em meio IAL e sorologia polivalente.

RESULTADOS

Teste ecométrico dos meios seletivos diferenciais

O teste realizado demonstrou valores de Índice de Crescimento Absoluto (ICA) máximos (5,0) para *S.Typhimurium*, *P.mirabilis*, *P.aeruginosa* e *C.freundi* nos meios SS, VB e ASB; para *E.coli* o valor do ICA foi de 0,2 no ágar SS e 5,0 nos outros dois meios, enquanto o *S.aureus* teve seu desenvolvimento inibido nos ágar SS e ASB e um ICA de 0,2 para o meio VB.

Recuperação da *S.Typhimurium* nos caldos de enriquecimento

O valor médio obtido para a produtividade dos caldos SC e RV foi de 10⁸ e o obtido no BHI de 10⁹ (Tabela 1). Pode-se considerar que a diferença encontrada entre os meios não foi significativa, demonstrando, portanto, números finais de células viáveis de *S.Typhimurium* satisfatórios entre os meios de enriquecimento não seletivo (BHI) e de enriquecimento seletivo (SC e RV).

Teste de seletividade e produtividade nos caldos de enriquecimento seletivo, a 35 e 42°C

Os resultados das quatro repetições da avaliação de produtividade e seletividade dos caldos de enriquecimento SC e RV em conjunto com os meios seletivos (SS, VB, ASB), revelaram a recuperação da cepa de *S.Typhimurium* até a diluição 10⁻¹⁰. Nas menores diluições (até 10⁻⁴) a bactéria foi isolada com facilidade, exceto para a combinação SC-VB onde houve produção de véu (crescimento invasor) de *P.mirabilis* que dificultou seu isolamento. Os resultados obtidos indicam, portanto, melhor desempenho do caldo Rappaport-Vassiliadis modificado nas duas temperaturas testadas, em relação ao selenito-cistina (Tabela 2).

Avaliação da mistura de culturas/controle mantidas sob congelamento

Os resultados dos tubetes controle analisados no período de um mês, mostraram a recuperação da salmonela pela metodologia usada (com referência aos meios usados para o isolamento das salmonelas) durante todo o período considerado.

Tabela 1. Recuperação de *S.Typhimurium* (UFC/ml) nos caldos infusão de cérebro e coração (BHI), selenito-cistina e Rappaport-Vassiliadis, incubados a 35°C e 42°C/18-24h.

Temperatura de incubação \ Meios	Caldo BHI	Caldo selenito-cistina	Caldo Rappaport-Vassiliadis
35°C	1,2x10 ⁹	2,7x10 ⁸	4,9x10 ⁸
42°C	1,6x10 ⁹	2,6x10 ⁸	4,6x10 ⁸

Tabela 2. Média dos testes de seletividade e produtividade dos caldos selenito-cistina e Rappaport-Vassiliadis, incubados a 35°C e 42°C/18h-24h, para recuperação de *S.Typhimurium*.

Caldos (Temperatura de incubação) \ Meios sólidos	<i>S.Typhimurium</i> (Última diluição em que houve recuperação)		
	Ágar <i>Salmonella-Shigella</i> (SS)	Ágar verde-brilhante (VB)	Ágar sulfito de bismuto (ASB)
Selenito-cistina (35°C)	10 ⁻⁴	Recuperação prejudicada*	10 ⁻⁷
Selenito-cistina (42°C)	10 ⁻⁷	Recuperação prejudicada*	10 ⁻⁷
Rappaport-Vassiliadis (35°C)	10 ⁻¹⁰	10 ⁻¹⁰	10 ⁻¹⁰
Rappaport-Vassiliadis (42°C)	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁸

* = Recuperação prejudicada, pois houve produção de véu de *P.mirabilis*, dificultando o isolamento da *S.Typhimurium*

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

O isolamento de *Salmonella* spp. em alimentos requer procedimentos complexos, com alguns fatores conhecidos e outros ainda não bem esclarecidos. Segundo Busse², o sucesso da utilização de meios de enriquecimento antes do isolamento foi um passo decisivo para a detecção de *Salmonella*, necessário para melhorar os meios e procedimentos analíticos para o seu isolamento e identificação.

A produtividade dos meios de cultura, seletivos ou não, depende de fatores intrínsecos (nutrientes, potencial de óxido redução, pH, atividade de água, tipo e atividade dos antimicrobianos e/ou formação destes durante o aquecimento), fatores extrínsecos (temperatura de incubação e suas flutuações, pressão de O₂ e CO₂ do ambiente) e fatores implícitos (dependência nutricional do microrganismo, os fenômenos antagônicos e sinérgicos entre os componentes da microbiota e da amostra). Conforme os resultados obtidos no teste de recuperação, pode-se observar que a diferença no ciclo logarítmico não foi superior a 1,0 quando da comparação dos meios seletivos (RV e SC) com um meio não seletivo de referência (BHI).

A seletividade dos meios é dada pela presença de agentes inibidores na sua composição que possam, ao mesmo tempo suprimir, mesmo que parcialmente, a microbiota competidora e promover o desenvolvimento do microrganismo desejado. Selenito-cistina e Rappaport-Vassiliadis são meios comumente utilizados na detecção de salmonelas em alimentos e demonstram resultados satisfatórios, como os obtidos nos testes em questão. A recuperação da *S.Typhimurium* foi obtida até a diluição de 10⁻¹⁰ da cultura inicial e isto ocorreu mesmo na presença de interferentes em número proporcionalmente maior, para as combinações de meios usadas nas etapas analíticas: RV-ASB, RV-SS e RV-VB, demonstrando ênfase maior para o caldo Rappaport-Vassiliadis que mostrou melhor recuperação que o caldo selenito-cistina (recuperação até 10⁻⁷). Quanto as temperaturas de incubação dos caldos, o desempenho do caldo Rappaport-Vassiliadis foi maior a 35°C e do caldo selenito-cistina a 42°C.

O comportamento dos contaminantes *P.mirabilis*, *E.coli*, *P.aeruginosa* e *C.freundii* no meio ASB, demonstrado por valores altos do Índice de Crescimento Absoluto, pode ter tido origem na etapa de preparação do meio e indicou que a seletividade do mesmo não foi satisfatória. Quanto à

seletividade, o meio SS foi o mais seletivo. Na presente avaliação, o fator decisivo para o isolamento de números baixos de salmonelas (nível de unidades de células presentes) foi o uso dos meios de enriquecimento seletivo (SC e RV).

Os resultados obtidos no presente estudo demonstram a importância da utilização de mais de uma combinação de meios de cultura, ou seja, pelo menos dois tipos de caldo de enriquecimento e três meios de cultura sólidos para o isolamento de *Salmonella* spp. a partir de amostras de alimentos.

Os testes de controle de qualidade dos meios de cultura para salmonelas, geralmente, demonstram a utilização de culturas puras e/ou material naturalmente contaminados (ex.: material de esgoto), porém, apesar de apresentarem a vantagem da avaliação da seletividade e produtividade no conjunto, tem a desvantagem da falta de uniformidade do material naturalmente contaminado. O método passa a não ser adequado para padronização do controle entre os laboratórios¹⁰. Além disso, o número de bactérias presente é também importante, estando diretamente relacionado com os resultados positivos de isolamentos⁷.

A preparação das cepas de *S. Typhimurium* e interferentes, mantidas sob congelamento para seu uso no controle do método e para validação dos resultados obtidos, não requer preparação diária e facilita a operacionalização de controle reprodutível, eficiente e rápido. Permite avaliar os fatores que possam interferir com o isolamento da salmonela a partir de alimentos e possibilita o estabelecimento de parâmetros e critérios de controle de qualidade dos meios de cultura, das etapas analíticas e do próprio analista. Estas questões, que podem ser abordadas separadamente, podem ser respondidas pelos resultados obtidos por um único teste e validadas. A seleção dos microrganismos interferentes tem

por base controles já descritos⁸, porém, foi adicionado o *S. aureus*, considerando que o mesmo está frequentemente presente nos alimentos e que sua presença poderia influir no resultado do isolamento da salmonela, em função da etapa de pré-enriquecimento. Pelos resultados obtidos, a recuperação da cepa controle de *Salmonella* spp. não foi prejudicada pela presença do *S. aureus*.

A padronização do controle deve ser realizada semestralmente. O teste ecométrico e a avaliação de seletividade e produtividade dos caldos de enriquecimento devem ser realizados a cada mudança de lote de meio de cultura desidratado recebido.

Sugere-se a realização dos testes utilizando-se como cepa padrão controle outros sorotipos de *Salmonella* para avaliar o desempenho do método, respectivo controle e preparação e, conservação das cepas-teste, conforme descrito no presente trabalho. Observa-se ainda, a necessidade de estabelecer diluições da bactéria que contenham apenas unidades de células viáveis, avaliação da utilização de outros crioprotetores, como o DMSO (dimetilsulfoxido)⁵ e o aumento do prazo de congelamento dos tubetes.

O controle de qualidade em Microbiologia é mais uma arte que uma ciência e envolve aspectos inatingíveis, tais como senso comum, critério e atenção constante aos detalhes. Os programas devem ser organizados, considerando-se objetivos bem definidos. Ainda, por necessidade do processo de avaliação de riscos microbiológicos, os resultados de análises laboratoriais, para serem considerados válidos para os processos de gestão dos perigos bacterianos no alimento, tais como a aplicação das Boas Práticas e do Sistema APPCC, devem ser verdadeiros, confiáveis e reprodutíveis.

RIALA6/952

Gelli, D. S.; Ristori, C. A. e Buzzo, A. A. - Quality Control in food microbiology laboratory and evaluation of performance from the culture medium in the *Salmonella* spp. isolation. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 62(3):159 - 164, 2003.

ABSTRACT. The laboratory data should be real and reliable because they guide the systems of control of applicable pathogens in the whole chain of production of foods, especially for the one of incidence and considerable severity. Amongst the pathogens of greater interest to the public health, there are the *Salmonella* spp. which can be present in foods in a small quantity or in a physiological state of stress that makes difficult its isolation. Many research laboratories are studying the validation of analytical methods for its isolation, detection and evaluating the efficiency of the enrichment and selective medium isolation. It was studied the isolation of *Salmonella* Typhimurium from a mixture containing as well as the competitors/interfering microorganisms: *E. coli*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa*, *C. freundii* and *S. aureus*, maintained at (-)18°C during 30 days with the proposal to validate the same methodology in the isolation of *Salmonella* from foods. The daily results have shown good recovery of *S. Typhimurium* in the above mixture and it was shown as well as the possibility of using the control mixture. The recovery, ecometrics, selectivity and productivity tests showed that the conditions of culture and temperatures were adequate. It was observed that the modified Rappaport-Vassiliadis broth presented better performance due the inhibition of *Proteus* veil (swarm) in the solid samples used.

KEY WORDS. *Salmonella* spp., laboratorial quality, food, isolation.

REFERÊNCIAS

1. Andrews, W.A. Methods for recovering injured "classical" enteric pathogenic bacteria (*Salmonella*, *Shigella* and Enteropathogenic *Escherichia coli*) from foods. In: **Injured Index and Pathogenic Bacteria: Occurrence and Detection in Foods, Water and Feeds**, Florida: Ray, B., 1989. c. 3, p.55-104.
2. Busse, M. Media for *Salmonella*. **Int. J. Food Microbiol.** 26(1):117-131, 1995.
3. Eley, A.R. Infective bacterial food poisoning. In: Sheffield, U.K., Adrian R. Eley. **Microbial Food Poisoning**, 2nd edition, 1996. p.15-21.
4. FAO Food and Nutrition Paper. **Manual of food quality control 12**. Quality assurance in the food control microbiological laboratory. 1991. p.1-8.
5. Floccari, M.E. Métodos de conservacion de cultivos bacterianos. **Rev. Arg. Microbiol.** 30(1):42-51, 1998.
6. Flowers, R.S. et al. *Salmonella*. In: Vanderzant, C.; Splittstoesser, D.F.. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**, 3rd ed., Washington, D.C., 1992. c. 25, p. 371-422.
7. Harvey, R.W.S.; Price, T.H. A Review Principles of *Salmonella* Isolation. **J. Appl. Bacteriol.** 46:27-56, 1979.
8. International Journal of Food Microbiology. Testing Methods for use in Quality Assurance of Culture Media. **Appendix (I)** 5:291-6, 1987.
9. 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** 58(1):47-51, 1998.
10. Mackey, B.M. Quality control monitoring of liquid selective enrichment media used for isolating salmonellae. **Int. J. Food Microbiol.** 2:41-8, 1985.
11. Mossel, D.A.A., et al. Quality control of solid culture media: a comparison of the classic and the so-called ecometric technique. **J. Appl. Bacteriol.** 49:439-454, 1980.
12. Swanson, K.M.J. et al. Colony count methods. In: Vanderzant, C.; Splittstoesser, D.F. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**, 3rd ed., Washington, D.C., 1992. c. 4, p.75-95.
13. Varnam, A.H.; Evans, M.G. **Foodborne Pathogens**. Wolfe Publishing Ltd, c.4, 1991. p.51-85.

Recebido em 09/10/2002; Aprovado em 08/11/2003

Teores de nitrito de sódio em produtos cárneos comercializados em Maceió-AL

Sodium nitrite concentration in meat products sold in Maceió – Al

Giselda Macena LIRA^{1*}
Maria de Lourdes da SILVA NETA^{1,2}
Jailton Barros de SOUZA³
Edna Santos de BARROS³

RIALA6/953

Lira, G. M. et al - Teores de nitrito de sódio em produtos cárneos comercializados em Maceió - AL . **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 62(3): 165 - 170, 2003.

RESUMO . Nitrito de sódio é um aditivo intencional utilizado em produtos cárneos com o objetivo de fixar a cor, conferir sabor e aroma característicos, retardar a oxidação lipídica e inibir o crescimento do *Clostridium botulinum*, cuja toxina causa o botulismo. A adição deste aditivo preocupa a comunidade científica mundial, pois, é fator de riscos toxicológicos à saúde humana, dependendo da quantidade ingerida e susceptibilidade do organismo. Visando controlar o nível deste aditivo em produtos cárneos, a legislação brasileira estabeleceu limites de teores residuais de nitrito. No presente trabalho objetivou-se quantificar o teor de nitrito de sódio em produtos cárneos provenientes de estabelecimentos comerciais da cidade de Maceió-AL. Os resultados obtidos para nitrito de sódio residual para: *Jerked beef* (traços: 0,3 a 0,5 ppm ou mg/kg); presunto (1,7 a 3,5 ppm ou mg/kg); lingüiça toscana (0,5 a 1,6 ppm ou mg/kg); lingüiça calabresa defumada (1,6 ppm ou mg/kg) e mortadela (traços: 0,3 a 1,7 ppm ou mg/kg), estão todos abaixo do limite máximo residual permitido pela legislação brasileira. Apesar das amostras analisadas encontrarem-se dentro dos padrões, medidas preventivas devem continuar sendo tomadas como controle de qualidade pelas indústrias e vigilância sanitária dos alimentos envolvidos.

PALAVRAS-CHAVE. nitrito; produtos cárneos; qualidade; segurança.

¹ Departamento de Nutrição – Centro de Ciências da Saúde – Universidade Federal de Alagoas.

² Bolsista de Iniciação Científica – CNPq/LACEN/AL.

³ Apoio Técnico LACEN-AL.

* Endereço para correspondência: Departamento de Nutrição – Centro de Ciências da Saúde – Universidade Federal de Alagoas – Maceió, AL, Brasil. CEP 57.072-900. Fax: 082.2141665. E-mail: gmlira@ofm.com.br

INTRODUÇÃO

Os produtos curados são alimentos habituais em todas as partes do mundo e, as suas características peculiares somente são obtidas pelo uso do nitrito¹. Nitrito de sódio é um aditivo intencional utilizado em produtos cárneos com o objetivo de fixar a cor, conferir sabor e aroma característicos, retardar a oxidação lipídica e inibir o crescimento do *Clostridium botulinum*, cuja toxina causa o botulismo.

Pode-se afirmar com certeza que a introdução de nitrato na cura de carnes foi feita puramente ao acaso, como conseqüência da sua presença como contaminante do cloreto de sódio, empregado no processo de salga. A utilização direta do nitrito na cura de carnes foi desenvolvida somente em 1926, quando se verificou que esse procedimento diminuía consideravelmente o tempo de cura².

O *Jerked beef*, um sucedâneo do charque^{3,4}, é produzido utilizando matéria prima de melhor qualidade e salmoura contendo nitrito e nitrato de sódio injetada automaticamente nas peças de carne. Estas são submetidas ao processo de salga seca climatizada. Após o processamento, o *Jerked beef* é embalado a vácuo, forma na qual é comercializado. O uso de embalagem a vácuo, garante até certo ponto a estabilidade do produto, porém há possibilidade do crescimento de *Clostridium botulinum*. A utilização de nitrito e nitrato confere a proteção contra *Clostridium botulinum*⁵.

No Brasil, dado ao preço acessível de algumas marcas, destaca-se o consumo de mortadelas e salsichas, que participam da dieta como fonte de proteínas de origem animal, contribuindo desta forma, para a redução de “déficit” nutricional, principalmente da população de menor renda⁶. Salsichas e mortadelas, produtos tipo emulsão, têm como principais componentes: água, proteínas e gorduras. O equilíbrio entre estes componentes determina o rendimento de produção, a aparência, o paladar e a aceitação popular⁷. Segundo Hsu et al. e Muciolo et al. *apud* Souza et al.⁷, durante a elaboração destes produtos há adição de gelo, amido e nitrito de sódio, além de outros aditivos e condimentos. Sua elaboração deve atender a padrões estabelecidos pela legislação para garantir a qualidade do produto final quanto aos aspectos de composição geral, características químicas e físico-químicas⁸.

As lingüiças, em geral, são produtos comestíveis elaborados com diferentes carnes de animais de açougue, adicionados de ingredientes de cura ou não, submetidos a diferentes processamentos tecnológicos e embutidos com tripas naturais ou artificiais, são comercializadas em grande escala por se tratar de um produto de valor comercial acessível a todos os setores da sociedade, logo são facilmente encontrados em supermercados, açougues, mercearias e feiras-livres, neste local em particular a comercialização de alimentos de origem animal é realizada com mínimo ou nenhum controle por parte dos órgãos de Saúde Pública, fato que proporciona o aumento da comercialização de embutidos produzidos irregularmente, chamados “caseiros” sem autorização dos órgãos competentes⁹.

O uso de nitrito preocupa a comunidade científica mundial, pois, é fator de riscos toxicológicos à saúde humana, dependendo da quantidade ingerida e susceptibilidade do organismo. Nitritos combinam-se com a hemoglobina, transformando-a em metemoglobina, reduzindo a eficiência no transporte de oxigênio, principalmente em crianças^{10,11}. Nos alimentos e *in vivo*, nitritos podem reagir com aminas secundárias e terciárias formando N-nitrosaminas, algumas das quais apresentam atividade carcinogênica, mutagênica, teratogênica e embriopática^{12,13}.

Devido a todos esses fatos, existem sugestões no sentido da eliminação do nitrito como aditivo alimentar. Esta solução torna-se ainda mais comprometida pelo fato de não se ter descoberto nenhum outro agente de cura que promova todas as características peculiares das carnes curadas¹.

Visando controlar o nível desse aditivo em produtos cárneos, a legislação brasileira estabeleceu o limite de teor residual de nitrito, no produto cárneo a ser consumido¹⁴. Na medida em que a determinação deste componente é de fundamental importância na avaliação da tecnologia empregada, bem como na preservação da saúde pública, no presente trabalho objetivou-se determinar o teor de nitrito residual em produtos cárneos provenientes de estabelecimentos comerciais da cidade de Maceió-AL e comparar com os limites de segurança alimentar.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

Foram analisadas, em triplicata, 81 amostras de produtos cárneos de diferentes marcas comerciais, originadas de lotes diferentes, adquiridas aleatoriamente em épocas diferentes, nos diversos estabelecimentos comerciais de Maceió: supermercados e mercadinhos perfazendo um total de 21 amostras de *Jerked beef*, 22 amostras de mortadela, 20 amostras de presunto e 18 amostras de lingüiça, durante o período de agosto de 2001 a abril de 2002. Os produtos cárneos adquiridos foram originados de marcas oriundas da região Sul do País (marcas E, F, L), Sudeste (marcas B, D, G), Centro-Oeste (marca H) e Nordeste (A, C, I). As amostras logo após a aquisição foram levadas ao Setor de Bromatologia do Laboratório Central de Alagoas – LACEN-AL, onde as análises foram realizadas.

Método

A determinação de nitrito foi baseada no método espectrofotométrico do Instituto Adolfo Lutz¹⁵, através das etapas de extração do nitrito associado à desproteínização das amostras e a posterior determinação com leitura em absorbância a 474nm. A equação que definiu a reta padrão utilizada para nitrito foi $y = 443,4109.x + 0,0069$, onde y corresponde a absorbância a 474 nm e x representa a concentração de NaNO_2 em mg/ml. O coeficiente de correlação foi $R = 0,9999$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1, são apresentados os resultados obtidos nas determinações de nitrito de sódio residual em amostras de *Jerked beef*, presunto, lingüiça (toscana e calabresa defumada) e mortadela de diferentes marcas.

Os resultados encontrados trazem informações relevantes, cuja interpretação merece uma fundamentação baseada na literatura científica. Evidenciou-se em algumas amostras valores elevados de desvio-padrão, em relação ao valor obtido na determinação do teor de nitrito, fato observado

nas amostras de *Jerked beef* marcas A e B, presunto marca E, lingüiça toscana marca H e mortadela marcas G e L. É importante salientar que as amostras foram obtidas em épocas diferentes e foram oriundas de lotes também diferentes, embora das mesmas marcas e os valores obtidos nas leituras das triplicatas apresentaram grande similaridade, o que evidencia a heterogeneidade entre os lotes das diversas amostras.

Tabela 1. Teores de nitrito de sódio em produtos cárneos comercializados em Maceió (Período de agosto de 2001 a abril de 2002).

Produtos Cárneos	Marcas	Nº de Amostras	Concentração de Nitrito de Sódio (ppm ou mg/kg)
Jerked Beef	A	6	0,4 (\pm 0,2)
	B	9	0,3 (\pm 0,1)
	C	3	0,4 (\pm 0,0)
	D	3	0,5 (\pm 0,0)
Presunto	E	7	1,7 (\pm 1,1)
	F	4	3,5 (\pm 0,8)
	G	3	2,6 (\pm 1,4)
	H	6	2,6 (\pm 1,7)
Lingüiça (Toscana)	H	5	0,7 (\pm 0,6)
	G	2	1,6 (\pm 0,6)
	I	3	0,5 (\pm 0,1)
	E	3	1,5 (\pm 0,3)
Lingüiça (Calabresa Defumada)	H	5	1,6 (\pm 0,8)
	H	3	2,1 (\pm 0,0)
Mortadela	J	3	0,8 (\pm 0,1)
	L	6	0,3 (\pm 0,1)
	E	5	1,7 (\pm 0,5)
	G	5	0,5 (\pm 0,2)

Os valores representam a média de amostras analisadas em triplicata, com desvio-padrão entre parêntesis.

Tabela 2. Níveis de NaNO_2 necessários para ocorrência dos diversos efeitos do seu emprego em produtos cárneos.

Efeito	Nível de NaNO_2 (ppm ou mg/kg)
Desenvolvimento de cor	30 a 50
Desenvolvimento de aroma	20 a 40
Efeito conservante	80 a 150
Efeito antioxidante	indeterminado

Fonte: Müller *apud* Pinto, 1998¹⁶.

Observou-se que 100% das amostras analisadas apresentaram teores abaixo dos limites máximos residuais permitidos pela legislação brasileira, que é de 0,015g/100g (150 ppm) do produto – Portaria n° 1004 de 11 de dezembro de 1998¹⁴. Os teores de nitrito necessários ao desenvolvimento dos efeitos desejáveis à sua utilização são apresentados na Tabela 2.

Verificou-se que todas as amostras analisadas apresentaram teores de nitrito insuficientes para o desenvolvimento dos efeitos desejáveis. Pinto¹⁷, demonstrou que, em amostras de *Jerked beef*, o nível inicial de nitrito, em torno de 50 ppm, cai rapidamente durante o processamento, certamente devido à sua decomposição, com formação de óxido nítrico (NO). Nesse trabalho, não foi considerado o tempo de elaboração das amostras adquiridas, é possível que os valores encontrados deva-se a esse processo de decomposição.

Pinto et al.¹⁶ avaliaram os teores de nitrito em linguiça “caseira” comercializada no município de Araçatuba-SP. Das 19 amostras analisadas, a grande maioria (15) não continha quantidade suficiente de nitrito para desenvolver qualquer efeito nos produtos (desenvolvimento de cor, aroma, efeito conservante). Uma amostra apresentou um teor de nitrito acima do estabelecido pela legislação vigente na época (200 ppm), demonstrando a falta de orientação por parte dos fabricantes, bem como a necessidade de fiscalização por parte das autoridades desse tipo de atividade “artesanal”.

Youssef et al.⁵, encontraram teores de nitrito de sódio entre traços, 2,90 a 10,0 ppm em amostras de *Jerked beef* coletadas em São Paulo, capital. Mársico *et al.*¹⁸, determinaram teores de nitrito em amostras de charque provenientes de estabelecimentos comerciais do estado do Rio de Janeiro, classificados como A (grandes redes de supermercados) e B (pequenos comerciantes). Os resultados demonstraram que 41,67% das amostras provenientes de estabelecimentos “A” apresentaram teor de nitrito acima de 50 ppm. As amostras provenientes de estabelecimentos classificados como “B”, apresentaram 33,3% para quantidade de nitrito acima de 50 ppm, ambas contrariando a nossa legislação que proíbe o uso de nitrito no processamento do charque, Brasil^{14,19}.

Em 1990, Souza et al.⁷ avaliaram teores de nitrito em 20 marcas de salsichas e 19 de mortadelas, comercializadas na cidade de Jaboticabal, SP. Os níveis de 20% das salsichas e 16% das mortadelas apresentaram-se superiores ao limite estabelecido, na época, de 200 ppm, indicando que os fabricantes não estavam atentos às recomendações dos órgãos governamentais quanto ao uso destes sais na formulação de salsichas e mortadelas. Melo Filho e Biscontin²⁰, analisaram nitrito residual em salsichas comercializadas na região metropolitana do Recife-PE, elaboradas por indústrias oriundas do sul do país, região Nordeste e amostras sem procedência, identificadas como comercializadas em feiras livres. Os autores concluíram que 67% das salsichas das feiras livres estavam acima do limite máximo permitido, de 150 ppm de nitrito de sódio¹⁴.

Komatsu et al.²¹, analisaram 510 marcas de embutidos diversos, coletados em supermercados e frigoríficos de São Paulo e não encontraram nenhum valor excedendo 200ppm – limite máximo estabelecido pela legislação anterior²².

CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos nesta pesquisa pode-se concluir que as indústrias que estão elaborando os produtos cárneos comercializados em Maceió estão se atendo às recomendações legais vigentes. No entanto, apesar das amostras analisadas encontrarem-se dentro dos padrões, medidas preventivas devem continuar sendo tomadas como controle de qualidade pelas indústrias e vigilância sanitária dos alimentos envolvidos, garantindo ao consumidor o fornecimento de produtos segundo os padrões de qualidade e segurança estabelecidos pela legislação vigente.

AGRADECIMENTOS

Ao Laboratório Central de Alagoas (LACEN-AL) pelo respaldo financeiro, ao CNPq pela Bolsa de Iniciação Científica e de Apoio Técnico.

Lira, G. M. et al - Sodium nitrite concentration in meat products sold in Maceió – AL . **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 62(3): 165 - 170, 2003.

ABSTRACT. Sodium nitrite is a food additive widely used in meat products to enhance their appearance, impart their characteristic flavor and odor, retard lipid oxidation, and prevent the development of the botulism-causing toxin *Clostridium botulinum*. The use of this additive remains a matter of concern for the scientific community worldwide, due to the fact that it poses toxicological risks to human health, depending on the ingested amount and on the susceptibility of each organism. Aiming to control the concentration of this additive in meat products, the legislation in Brazil states the permissible amounts of residual nitrite. The goal in this paper was to quantify the sodium nitrite content in meat products sold at retail outlets in the city of Maceió – AL. The study yielded trace results for residual sodium nitrite in jerked beef (0,3 – 0,5 ppm or mg/kg), ham (1,7 – 3,5 ppm or mg/kg), tuscan sausage (0,5 – 1,6 ppm or mg/kg), smoked calabrese sausage (1.6 ppm or mg/kg), and mortadella (trace: 0,3 – 1,7 ppm or mg/kg). These figures are all below the legal maximum permissible residual limit in Brazil. Notwithstanding the fact that the samples analyzed were all within the legal standards, preventive measures such as food quality control within the manufacturing organizations and government inspection must be kept in place.

KEY WORDS. nitrite; meat products; quality; safety.

REFERÊNCIAS

1. Trugo, L. C. – **Dosagem de nitrato em presença de nitrito em carnes curadas**. Niterói, 1979. 78p. [Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária. Faculdade de Veterinária. Universidade Federal Fluminense]
2. Price, J. F.; Schweigter, B. S. **Ciência de la carne y de los productos cárnicos**. Zaragoza, Editorial Acribia, 1994. p. 462-479, 480-492.
3. Biscontini, T.M.B.; Lopes Filho, A.; Shimokamaki, M. – Jerkedbeef: uma evolução tecnológica do charque. *Rev. Nac. Carne*, 183:43, 1992 e transcrito na **Hig. Aliment**, 6(23):15-16, 1992.
4. Biscontini et al – An ultrastructural observation on charquis, salted and intermediate moisture meat products. **Meat Sci.**, 43(3-4): 351-358, 1996.
5. Youssef, E.Y.; Garcia, C.E.R; Shimokomaki, M. Ação antioxidante do nitrato e nitrito de sódio em Jerked beef. In: XVI Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Rio de Janeiro. **Anais do XVI Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos**; 1998, v. 02, p. 715-717.
6. Melo Filho, A. B. M; Guerra, N.B. - Avaliação da qualidade de produtos cárneos: salsichas e mortadelas comercializadas na região metropolitana do Recife. In: XVI Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Rio de Janeiro. **Anais do XVI Congresso Brasileiro de Ciências e Tecnologia de Alimentos**; 1998, v. 01, p. 77-79.
7. Souza, P.A.; Souza, H.B.; Faleiros, R.R.S. Avaliação química de algumas marcas de salsichas e mortadelas. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, 10(1):109-119, 1990.
8. **Castro, C. – O controle de qualidade na indústria da carne**. *Rev. Nac. Carne*, **196: 20-29, 1993**.
9. Carvalho, A.L.T. et al. Avaliação do teor de nitritos em lingüiças clandestinas comercializadas no município de Petrópolis, Rio de Janeiro. **Rev. Hig. Aliment**, 15(80/81):108-109, 2001.
10. Scanlan, R. A. – Formation and occurrence of nitrosamines in food. **Cancer Rev.**, 43: 2435, 1983.
11. Tavares, M. et al. Determinação de nitritos e nitratos em lingüiça e outras conservas de carne comercializadas na região metropolitana de São Paulo. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 47(1/2):5-10, 1987.
12. Oliveira, C. P. et al. – Nitrate, nitrite, and volatile nitrosamines in whey-containing food products. **J Agric. Food Chem.**, 43: 967-969, 1995.
13. Swann, P. F. – The toxicology of nitrate and N-nitroso compounds. **J. Sci. Food Agric.**, 26: 1761-1770, 1975.
14. Brasil. **Ministério da Saúde**. Portaria nº 1004, de 11 de dezembro de 1998.
15. Instituto Adolfo Lutz. – **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análises de alimentos**. São Paulo: IAL, 1985, v.1, p. 533.
16. Pinto et al. Teores de nitrito em lingüiça “caseira” comercializada no município de Araçatuba-SP. In: XVI Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Rio de Janeiro. **Anais do XVI Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos**; 1998, v. 01, p. 392-395.
17. Pinto, M. F. **Culturas iniciadoras – starters- no processamento de jerked beef, um derivado do charque**.

- São Paulo, USP, 1996. 96s. [Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo]
18. Mársico, E.T. et al. Determinação do teor de umidade e presença de nitrito em amostras em amostras de charque. **Rev. Hig. Aliment.**, 16(94): 45-49, 2002.
 19. Brasil. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA)**. Brasília, 1997, 241p.
 20. Melo Filho, A.B.; Biscontini, T.M.B. Nitrito residual em salsichas comercializadas na região metropolitana do Recife. In: **XVIII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 2002, p. 59-62.
 21. Komatsu, I. et al. O teor de nitritos e nitratos nos produtos cárneos fabricados no Estado de São Paulo. **Ciênc. Cult. Supl.**, 29(7):124, 1977. [Resumo 53 – A. 5.1].
 22. Brasil. **Ministério da Agricultura**. Decreto Federal nº1255 de 25 de junho de 1962.

Recebido em 16/12/2002; Aprovado em 12/11/2003

Seroprevalência de HIV em caminhoneiros usuários da Rodovia Anhanguera, SP 330, Brasil

HIV seroprevalence in truck drivers users of Anhanguera Highway, SP 330, Brazil

José Antonio P. BERRA^{1*}
Liliana B. BACETTI²
Kaiser J. F. ALVES³
Vânia L. P. FIÓRIO⁴

RIALA6/954

Berra, J. A. P. et al. - Soroprevalência de HIV em caminhoneiros usuários da Rodovia Anhanguera, SP 330, Brasil. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 62(3): 171 - 176, 2003.

RESUMO. Este estudo realizou uma avaliação sorológica para HIV em amostras de sangue coletadas de 1844 indivíduos, durante a Campanha Saúde na Boléia – Projeto Caminhoneiro, resultado de parceria entre Instituto Adolfo Lutz, Secretaria da Saúde, Coordenação DST / AIDS, Intervias e Uniararas. Do total de indivíduos, 1589 (86,2 %) eram caminhoneiros e 255 (13,8 %) outros usuários da Rodovia Anhanguera – SP 330, trecho compreendido entre os quilômetros 164 e 232. Foi realizada a triagem para HIV das amostras aplicando-se dois ensaios imunoenzimáticos (ELISA), paralelos e simultâneos. As amostras positivas e indeterminadas foram submetidas à reação de Imunofluorescência Indireta (IFI) e Western – Blot. Foram detectadas 15 amostras positivas entre os caminhoneiros, representando 0,9% deste grupo. Os outros indivíduos amostrados foram soronegativos.

PALAVRAS-CHAVE. HIV; soroprevalência; caminhoneiros; Rodovia Anhanguera, São Paulo, Brasil.

¹ Coordenador do Projeto Caminhoneiro no IAL – Rio Claro

² Pesquisador Científico do IAL – Rio Claro

³ Técnico de Laboratório

⁴ Diretora do IAL – Rio Claro

* Endereço para correspondência: pistarin@hotmail.com

INTRODUÇÃO

A síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) é causada pelo vírus HIV (Human Immunodeficiency Vírus), família *Retroviridae*, com genoma RNA, citopáticos e não oncogênicos, cuja infecção pode ser dividida em quatro fases clínicas: fase aguda, fase assintomática ou de latência, fase sintomática inicial ou precoce e AIDS^{14,21}.

As fases aguda e assintomática ocorrem em cerca de 50% a 90 % dos pacientes e muitas vezes são imperceptíveis, pois as manifestações clínicas podem indicar, entre outras doenças, um quadro gripal ou uma mononucleose. Durante o período de latência, embora os sintomas não apareçam, ocorre a replicação do vírus, provocando o fenômeno mais característico da síndrome, que é a diminuição progressiva dos níveis de linfócitos CD4, células - alvo do HIV, acompanhada de modificações nos valores dos demais linfócitos (CD8 e CD3). Esta é uma fase que pode durar muitos anos, dependendo do nível de exposição e do sistema imunológico do indivíduo. A fase inicial da infecção apresenta quadro clínico com sintomas inespecíficos, caracterizado por processos infecciosos oportunistas de pequena gravidade e neoplasias, principalmente na pele e mucosas. Nesta fase, baseando-se no perfil epidemiológico do paciente recomenda-se a realização do teste anti-HIV. A evolução da infecção pelo vírus HIV leva ao aparecimento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida, a AIDS, com sintomas bem mais graves do que na fase aguda e caracteriza-se por infecções oportunistas graves e neoplasias. O controle da síndrome pode ser realizado através de algumas medidas, tais como a prevenção e o diagnóstico precoce, que contribuem para evitar a contaminação, transmissão e evolução da doença^{2,3,14,21}.

No Brasil, a taxa de prevalência de indivíduos portadores do vírus HIV é estimada em 0,5 %, ou seja, cerca de 630 mil pessoas. Na última década o índice de mulheres com HIV cresceu consideravelmente, passando de 25 homens / 01 mulher contaminada, em 1985, para 02 homens / 01 mulher no fim da década de 1990. Este fato ocorreu devido à transmissão heterossexual, que passou a ser a principal via de contaminação, refletindo também no aumento de casos de HIV em recém nascidos⁴.

Com a criação do Sistema Único de Saúde (SUS), a política de saúde pública passou a integrar ações de promoção, prevenção, assistência e reabilitação da saúde da população brasileira, realizada por organizações públicas governamentais e entidades privadas vinculadas ao SUS ou por parcerias com Organizações da Sociedade Civil¹.

Em 1992 iniciou-se de forma sistemática a reestruturação do Programa Nacional de AIDS quando foram retomadas as bases de sustentação política com a rearticulação da sociedade civil e do Estado. Neste sentido algumas estratégias foram estabelecidas para o enfrentamento da epidemia, tais como: intervenção comportamental; estabelecimento de parcerias entre esferas de governo e o setor privado; mobilização social;

redes de diagnóstico e aconselhamento; distribuição universal e gratuita de anti-retrovirais, veiculação de campanhas informativas, etc.^{3,4,5}.

Algumas populações são consideradas grupos de riscos por estarem expostos a fatores propícios à contaminação, como por exemplo: usuários de drogas; profissionais do sexo; populações confinadas; homossexuais e outros^{9,11,12,13,17,19,20,22}.

De acordo com informações fornecidas pela Intervias, o setor de transporte é responsável por cerca de 7 % do PIB Nacional, com aproximadamente 2,5 milhões de trabalhadores e uma frota estimada em meio milhão de veículos, concentrando-se (cerca de 80 %) nos estados de São Paulo e nos do sul do país¹⁸.

Os profissionais deste setor (caminhoneiros) por apresentarem um particular estilo de vida: jornada de trabalho, distância da residência, grandes e constantes deslocamentos, promiscuidade e convívio com as mais diferentes situações e pessoas, encontram-se expostos aos fatores que favorecem contaminações, podendo ser considerados um grupo de risco^{11,22}.

Tais características levaram à criação do Projeto Caminhoneiro - Programa Saúde na Boléia, resultado da parceria entre Instituto Adolfo Lutz de Rio Claro, Intervias, DST / AIDS e Fundação Hermínio Ometto-Universidade de Araras (Uniararas), cujo objetivo foi realizar um estudo sorológico para HIV e sífilis, bem como informar os profissionais sobre as doenças, formas de contágio, prevenção, tratamento e diagnóstico.

O presente trabalho teve como objetivo realizar avaliação sorológica em amostras de sangue de caminhoneiros usuários da Rodovia Anhanguera (entre os quilômetros 164 e 232) a fim de conhecer a prevalência da infecção por HIV.

MATERIAL E MÉTODOS

Neste estudo foram analisadas 1844 amostras de sangue de voluntários, usuários da rodovia Anhanguera, SP-330, sendo 1589 caminhoneiros (86,2%) e 255 (13,9%) não caminhoneiros, colhidas em Unidades Móveis montadas nos postos de serviço da rodovia: Borsatto (Km 164), município de Araras; Atalaia (Km 185), município de Leme; Picapau (Km 201), município de Pirassununga e Sucão (Km 232), município de Porto Ferreira.

O protocolo de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa do DST / AIDS e cada participante voluntário preencheu e assinou o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, que encontra-se arquivado no IAL - Rio Claro.

A coleta de sangue, bem como outras atividades informativas, foi realizada pelos alunos e professores dos cursos de enfermagem e ciências biológicas da Uniararas, entre os dias 20 e 24 de maio de 2002.

As amostras foram colhidas em tubos plásticos para coleta a vácuo, com capacidade de 10 mL, contendo gel separador. O material foi enviado imediatamente ao Instituto Adolfo Lutz de Rio Claro, por veículos da Intervias, nos horários de 11:00, 15:00 e 18:00 hs, observando-se as normas de

Tabela 1. Resultados dos diferentes testes aplicados em amostras positivas e indeterminadas

Teste	ELISA - MUREX		ELISA - ORGANON		WESTERN BLOT	IFI
	D.O	Cut-off	D.O	Cut-off	Bandas encontradas / Interpretação dos resultados	Resultados
1	3,526	0,319	1,991	0,208	gp160; gp120; gp41; p66; p55; p51; p24; p17 POSITIVO	POSITIVO
2	Overflow	0,254	2,392	0,161	gp160; gp120; gp41; p66; p55; p51; p31; p39; p24; p17 POSITIVO	POSITIVO
3	Overflow	0,311	3,270	0,164	gp160; gp120; gp41; p66; p55; p51; p31; p39; p24; p17 POSITIVO	POSITIVO
4	3,801	0,350	2,823	0,171	gp160; gp120; gp41; p66; p55; p51; p31; p24 POSITIVO	POSITIVO
5	Overflow	0,338	2,769	0,158	gp160; gp120; gp41; p66; p55; p31; p39; p24; p17 POSITIVO	POSITIVO
6	3,715	0,377	3,129	0,206	gp160; gp120; gp41; p66; p55; p31; p24; p17 POSITIVO	POSITIVO
7	3,899	0,301	2,265	0,157	gp160; gp120; gp41; p66; p55; p51; p31; p24; p17 POSITIVO	POSITIVO
8	Overflow	0,340	2,267	0,155	gp160; gp120; gp41; p66; p51; p31; p39; p24 POSITIVO	POSITIVO
9	3,790	0,319	3,506	0,208	gp160; gp120; gp41; p66; p24; p17 POSITIVO	POSITIVO
10	Overflow	0,272	2,744	0,178	gp160; gp120; gp41; p66; p55; p51; p31; p39; p24; p17 POSITIVO	POSITIVO
11	3,707	0,254	2,389	0,161	gp160; gp120; gp41; p66; p55; p51; p31; p39; p24; p17 POSITIVO	POSITIVO
12	Overflow	0,265	2,220	0,190	gp160; gp120; gp41; p66; p55; p31 POSITIVO	POSITIVO
13	Overflow	0,280	3,249	0,178	gp160; gp120; gp41; p66; p55; p51; p31; p39; p24; p17 POSITIVO	POSITIVO
14	Overflow	0,272	1,916	0,178	gp160; gp120; gp41; p66; p55; p51; p31; p24; p17 POSITIVO	POSITIVO
15	0,930	0,311	0,924	0,164	gp160; gp120; gp41; p24; p17 POSITIVO	POSITIVO
16	0,364	0,319	0,225	0,208	gp160; gp41; p24 INDETERMINADO	INDETERMINADO
17	0,782	0,314	0,343	0,180	gp160; gp41 INDETERMINADO	INDETERMINADO
18	0,106	0,278	0,206	0,161	Nenhuma NEGATIVO	NEGATIVO

Overflow = Leituras de alta absorbância – fora da faixa de linearidade do equipamento / **D.O** = Densidade Óptica / **Cut-off** = valor de leitura que delimita resultados positivos/negativos (ponto de corte)

biossegurança para manuseio e transporte de material biológico, totalizando uma média de 370 amostras/dia.

A sorologia para triagem de anticorpos anti-HIV foi realizada após a separação do soro por centrifugação à 2.000 rpm por 10 minutos. As amostras foram submetidas a dois ensaios imunoenzimáticos (ELISA) distintos, em paralelo, de procedência, princípios metodológicos e/ou antígenos virais diferentes, registrados no Ministério da Saúde, de acordo com normas preconizadas pela Coordenação Nacional de DST-AIDS^{3,5,6,7,8}. Os conjuntos de diagnóstico (kits) utilizados foram: ABBOTT-MUREX (Murex HIV-1.2.0. – Central Road Temple Hill Dartford Kent – Inglaterra) e ORGANON-TÉCNICA (Virinostika HIV Uniform II plus O – Boxtel – Holanda), seguindo os procedimentos técnicos recomendados pelos fabricantes.

As amostras cujos resultados foram positivos ou indeterminados nas reações de ELISA, após serem retestadas, foram submetidas a testes confirmatórios, utilizando-se a reação de Imunofluorescência Indireta (IFI) e Western Blot e foi solicitada uma segunda coleta de material⁷. Para a realização da IFI – HIV 1, foi utilizado o kit Bio-Manguinhos / Fio Cruz - Rio de Janeiro – RJ e para a realização de Western Blot, o kit Genelabs-Diagnóstics (HIV Blot 2.2 Singapor – Singapura).

Os reagentes utilizados no projeto foram fornecidos pelo Centro de Referência e Treinamento – CRT / DST- AIDS e Ministério da Saúde.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A utilização de tubos de coleta contendo gel separador permitiu a execução das análises a partir do tubo primário, evitando hemólise e eventuais trocas de amostras, além de agilizar a realização das análises nas 1844 amostras, numa média de 750 testes de triagem / dia. A rapidez com que os resultados foram emitidos teve grande importância neste projeto, pois a maior parte da população estudada (caminhoneiros) recebeu os resultados e orientações quando da volta de sua viagem, momento em que poderiam fazer a 2ª coleta, nos casos necessários.

Na etapa de triagem do total de amostras analisadas referentes a caminhoneiros (1589), 15 (0,9%) apresentaram resultados positivos e 03 duvidosos / indeterminados (0,2%). Todas estas amostras (18) foram submetidas aos testes confirmatórios de IFI e Blot, cujos resultados estão apresentados na Tabela 1.

A interpretação dos resultados de Western Blot foi realizada comparando-se as bandas de cada tira de nitrocelulose

utilizadas na análise das amostras com as bandas das tiras dos controles negativo, positivo fraco e positivo forte, fornecidos pelo kit. Estas estão relacionadas com seqüências de nucleotídeos de proteínas estruturais – GAG (p19; p24; p15 e p39), proteases e transcriptase reversa – POL (p66; p51 e p31) e glicoproteínas do envelope externo e de membrana – ENV (gp21; gp41; gp46; gp120 e gp160-forma polimérica da gp41) do HIV^{15, 16, 21}.

A amostra nº 16 apresentou resultados indeterminados nos testes de triagem, IFI e Western Blot. A amostra de nº 17 apresentou resultados positivos fracos nas reações imunoenzimáticas (ELISA) e indeterminados na IFI e Western Blot. Estes resultados foram confirmados após análise em uma segunda amostra. Nestes casos é recomendado que se proceda um acompanhamento sorológico com o propósito de verificar uma possível soroconversão recente e / ou reações cruzadas. A amostra de nº 18 apresentou resultado negativo no teste ELISA-Murex, indeterminado no teste ELISA-Organon e resultados negativos na IFI e Western Blot, sendo assim o resultado desta amostra foi liberado negativo para HIV^{2, 3, 7, 10}.

De acordo com os resultados obtidos pudemos observar que os conjuntos diagnósticos (kits) de reações imunoenzimáticas (ELISA) utilizados mostraram-se eficientes, pois do total de 1844 amostras apenas 03 apresentaram resultados indeterminados e todos os resultados positivos por ELISA foram confirmados por IFI e Blot.

Os resultados obtidos neste estudo mostram a ocorrência de 15 / 1589 (0,9%) amostras positivas para o grupo de caminhoneiros, valor este que representa, aproximadamente, o dobro do índice nacional que é 0,5 %⁴ e cerca de três vezes este índice, se considerarmos os indivíduos pertencentes à faixa etária de 41 a 55 anos, nos quais foram detectadas 13 amostras positivas (1,76%), indicando que estes indivíduos constituem um grupo de risco para HIV.

Acreditamos que iniciativas como estas devam ser implantadas, incentivadas e desenvolvidas em outras regiões do país para que indivíduos tenham informações sobre a(s) doença(s), forma de transmissão e contágio, bem como diagnóstico e encaminhamento para tratamento, a fim de que possa diminuir a transmissão da AIDS e DSTs.

AGRADECIMENTOS

Aos funcionários do laboratório de sorologia pelo profissionalismo e rapidez na execução dos procedimentos analíticos e na emissão dos resultados.

Berra, J. A. P. et al. - HIV seroprevalence in truck drivers users of Anhanguera Highway – SP 330, Brazil.
Rev. Inst. Adolfo Lutz, 62(3): 171 - 176, 2003.

ABSTRACT. The objective of this study was evaluate the prevalence of HIV in a group of users of Anhanguera highway – SP 330, in a Truck driver Project, a partnership among Secretaria da Saúde, Instituto Adolfo Lutz, CRT-AIDS, Intervias concessionaire and Araras University. The samples were tested by ELISA reactions (Organon-Tecnica e Murex-Abbott) with confirmation of positive or indetermined results by IFI and Western-Blot techniques. Of 1844 tested individuals, 15 (0,9%) were HIV positive, all of them truck drivers.

KEY WORDS. HIV; seroprevalence; truck drivers; Anhanguera Highway-SP; Brazil

REFERÊNCIAS

- 01 Brasil. Lei nº 8.080, de 19 de setembro de 1990. Dispõe sobre as condições para promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, 19 set.1990.
- 02 Brasil. Ministério da Saúde – **Aconselhamento em DST/HIV/AIDS** - Coordenação Nacional de DST e AIDS, Brasília, Brasil, 1998.
- 03 Brasil. Ministério da Saúde – AIDS: etiologia, clínica, diagnóstico e tratamento. “**Unidade de Assistência, programa DST/AIDS**” - Brasília, 1999. 14p. [http://www.aids.gov.br/assistencia/etiologia-diagnostico.htm].
- 04 Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Coordenação Nacional de DST e AIDS. **A experiência do Programa Brasileiro de AIDS** / Secretaria de Políticas de Saúde, Coordenação Nacional de DST e AIDS. – Brasília: Ministério da Saúde, 2002. 30 p.: il. - (Série Programa Nacional; n. 2) – (Série C. Projetos, Programas e relatórios; n. 71).
- 05 Brasil. Ministério da Saúde – Secretaria de Políticas de Saúde – Coordenação Nacional de DST / AIDS – Carga viral. Ministério da Saúde, Brasília, 1998. 94p.
- 06 Brasil. Ministério da Saúde – **Manual de procedimentos para testes laboratoriais** – PNC – DST/AIDS – Departamento de Programas de Saúde, Brasília – DF, Brasil, 1993.
- 07 Brasil. Ministério da Saúde – Portaria nº 488, de 17 de junho de 1998. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, 18 jun. 1998.
- 08 Brasil. Ministério da Saúde – Programa Nacional de DST/AIDS – Recomendações para uso de testes sorológicos para HIV e HTLV – **Boletim Epidemiológico de AIDS**, ano VIII, n.4 – Semanas Epidemiológicas – 36 a 48 – setembro a novembro, 1995. p. 07-16. ISSN: 1517-1159.
- 09 Brasil. Ministério da Saúde. **Boletim Epidemiológico de AIDS**, ano XV, n. 1 – Semanas epidemiológicas – 27^a à 40^a - julho a setembro, 2001. p.8. ISSN: 1517-1159.
- 10 Brito, A. M. de; Castilho, E. E. de; Szwarcwald, C. L. AIDS e infecção pelo HIV no Brasil : uma epidemia multifacetada. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 34 (2): 207 – 217, 2000.
- 11 Bwayo, J. et al. Human immunodeficiency virus infection in long-distance truck drivers in east Africa. **Arch. Intern. Med.**, 154 (12): 1391-1396, 1994.
- 12 Carneiro-Proietti, A.B.F. et al. HIV –1/2 indeterminate Western Blot results : follow-up of asymptomatic blood donors in Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. **Rev. Inst. Med. trop. S.Paulo**, 41 (3) : 155-158, 1999.
- 13 Catalan-Soares, B. C.; Almeida, R.T.P.; Carneiro-Proietti, A.P.F. Prevalence of HIV –1/2, HTLV – I/II, hepatitis B vírus (HBV), hepatitis C virus(HCV), *Treponema pallidum* and *Trypanosoma cruzi* among prison inmates at Manhuaçu, Minas Gerais State, Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 33(1): 27-30,2000.
- 14 Dezzutti, C. S. ; Lal, R. B. Human T-cell Lymphotropic virus Types I and II. In: **Manual of Clinical Microbiology**, 7th ed., Washington, DC. American Society for Microbiology, 1999. cap.64, p. 871-877.
- 15 Gastadello, R. et al. Immunofluorescence assay reactivity patterns of serum samples presenting indeterminate Western Blot results for antibodies to HIV-1 and HTLV – I/ II in Cordoba, Argentina. **Revista Inst. Med. Trop. São Paulo**, 43 (4): 277-282, 2001.
- 16 Gastadello, R. et al. Efficiency of indirect immunofluorescence assay as a confirmatory test for the diagnosis of human retrovirus infection (HIV-1 and HTLV- I/II) in different at risk populations. **Revista Inst. Med. Trop. São Paulo**, 41(3): 159-164, 1999.
- 17 Hernandez-Giron, C. A. et al. Prevalence and risk factors associated with syphilis in woman. **Rev. Saúde Pública**, 32(6): 579-586, dec, 1998.

- 18 Intervias. Concessionária de Rodovias do Interior Paulista. **Programa Saúde na Boléia**. [<http://www.intervias.com.br>]
- 19 Lopes, F. et al. Prevalência de HIV, papilomavírus humano e sífilis na Penitenciária Feminina da Capital, São Paulo, 1997-1998. **Cad. Saúde Pública**, 17(6): 1473-1480, 2001.
- 20 Massad, E. et. al. Seroprevalence of HIV, HCV and syphilis in brazilian prisoners: Preponderance of parenteral transmission. **European Journal of Epidemiology**, 15: 439-445, 1999.
- 21 Schupbach, J. Human Immunodeficiency viruses. In: **Manual of Clinical Microbiology**, 7th ed., Washington, DC. American Society for Microbiology, 1999. cap.63, p. 847-870.
- 22 Villarinho, L. et al. Caminhoneiros de rota curta e sua vulnerabilidade ao HIV, Santos, SP. **Rev. Saúde Pública**, , supl. São Paulo, 36(4): 61-67.

Recebido em 19/12/2002 ; Aprovado em 08/10/2003

Ocorrência de Aflatoxinas em amendoim e produtos de amendoim comercializados na região de Marília – SP, Brasil no período de 1999-2001

Occurrence of Aflatoxins in peanut and peanut products commercialized in the region of Marília - SP, Brazil in the period of 1999-2001

Luzia SHUNDO^{1*}
Rosângela A. SILVA²
Myrna SABINO¹

RIALA6/955

Shundo, L. ; Silva, R. A. e Sabino, M. - Ocorrência de Aflatoxinas em amendoim e produtos de amendoim comercializados na região de Marília – SP, Brasil no período de 1999-2001 **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 62(3): 177 - 181, 2003.

RESUMO. Oitenta e sete amostras de amendoim e produtos derivados de amendoim comercializados na região de Marília/SP – Brasil no período de 1999 a 2001 foram analisadas para identificar e quantificar aflatoxinas B₁ e G₁, determinadas através de cromatografia em camada delgada, de acordo com o método descrito por Soares e Rodriguez-Amaya. As aflatoxinas foram encontradas em 56 (64,4%) amostras e 34 (39,1%) excederam os limites da legislação brasileira em vigor neste período, que para a somatória de AFB₁ e AFG₁, era de 30 µg/kg. As concentrações de aflatoxinas nas amostras variaram de 3 a 1659 µg/kg, com a média de 306 µg/kg. Em 31 amostras (35,6%) não foram detectadas aflatoxinas e o 90th percentil foi de 601 µg/kg. Dados de temperatura e pluviosidade neste mesmo período indicaram que a contaminação em altos níveis, coincidiram com temperaturas e pluviosidade elevadas e, possivelmente pode ter sido a causa dos altos teores de aflatoxinas encontrados. Este estudo indicou que a contaminação por aflatoxinas existe, possivelmente devido às condições de temperatura e umidade prevalentes na região de Marília que são favoráveis ao crescimento de fungos. A implantação de boas práticas agrícolas e uma avaliação contínua e sistemática é o melhor caminho para prevenir e controlar a infestação de produtos agrícolas por fungos toxigênicos.

PALAVRAS-CHAVE. aflatoxinas B₁ e G₁, amendoim, ocorrência, cromatografia em camada delgada.

¹Instituto Adolfo Lutz – São Paulo - Brazil

²Instituto Adolfo Lutz – Laboratório Regional de Marília

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

INTRODUÇÃO

As aflatoxinas são metabólitos secundários tóxicos, produzidos por fungos pertencentes ao gênero *Aspergillus*, principalmente *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* e eventualmente *Aspergillus nomius* durante seu crescimento em alimentos e rações. Existem quatro principais toxinas distribuídas nos grupos B e G, baseadas na fluorescência azul (blue) e verde (green) quando adsorvidas sobre substrato sólido e submetidas à luz ultravioleta, denominadas aflatoxina B₁ (AFB₁), B₂ (AFB₂), G₁ (AFG₁) e G₂ (AFG₂).

A AFB₁ e AFG₁ ocorrem mais freqüentemente na maioria dos produtos agrícolas¹⁵. O metabólito aflatoxina B₁ é o mais tóxico do grupo, sendo considerado o mais potente hepatocarcinogênico natural⁹.

Aspergillus flavus e *Aspergillus parasiticus* são saprófitas naturais do solo e ar, e em condições ideais são capazes de contaminar os alimentos. A ocorrência e magnitude da contaminação por essas micotoxinas variam de acordo com os fatores geográficos e sazonais, com as condições locais de crescimento do vegetal e ainda com as práticas de colheita e estocagem utilizadas. As culturas em áreas tropicais e subtropicais como o Brasil estão mais sujeitas à contaminação, pois as melhores condições para o desenvolvimento dos fungos e, conseqüentemente, para a produção das aflatoxinas são encontradas em áreas com altas temperaturas (25 a 30°C) e umidade elevadas (80 a 90 %). A contaminação dos produtos agrícolas ocorre através do contato com os esporos do fungo presentes no ambiente, sobretudo no solo, durante os procedimentos de colheita e secagem^{4,13}. O armazenamento em locais úmidos e sem ventilação, bem como o transporte inadequado, favorecem não apenas a contaminação com esporos, mas também o crescimento fúngico nos produtos já contaminados⁵.

A região oeste do estado de São Paulo é uma grande produtora de amendoim e Marília, onde esta pesquisa foi realizada, está localizada nesta área. O clima desta região é caracterizado pela ocorrência de duas estações bem definidas: uma marcada por altas temperaturas e pluviosidade, que inicia em outubro e termina em março e outra, com temperaturas elevadas, porém com pluviosidade consideravelmente menor, que inicia em abril e termina em setembro.

Existem duas colheitas anuais de amendoim. A primeira e a mais significativa é denominada safra das águas e ocorre durante o período de temperaturas e pluviosidade altas, e a segunda, de menor produção é denominada safra da seca e ocorre durante o período de menor pluviosidade (Tabela 2).

Além da produção agrícola, a região possui várias indústrias que processam amendoim, visando tanto o comércio local, quanto à exportação. A produção local é insuficiente para suprir a demanda das indústrias, havendo a necessidade de obter amendoim de outras localidades.

A contaminação de alimentos por aflatoxinas constitui um problema de saúde pública com grande impacto e

conseqüências na economia. Este trabalho apresenta a ocorrência de aflatoxinas em amendoim e produtos de amendoim comercializados na região de Marília - SP (Brasil) nos anos de 1999, 2000 e 2001.

MATERIAL E MÉTODOS

Oitenta e sete amostras de amendoim e produtos de amendoim colhidas no comércio pela Vigilância Sanitária Municipal de Marília - SP foram analisadas para identificação e quantificação de aflatoxinas B₁ e G₁ no Laboratório Regional de Marília – Instituto Adolfo Lutz, seguindo a Resolução nº 34/76 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos¹ nos anos de 1999, 2000 e 2001. A maioria das amostras foram empacotadas ou processadas por indústrias da região.

Amostras representativas foram trituradas e homogeneizadas e uma alíquota de 50 gramas foi utilizada para análise. As aflatoxina B₁ e G₁ foram separadas por cromatografia em camada delgada (CCD), de acordo com o método descrito por Soares e Rodriguez-Amaya²¹. O método consiste na extração com uma mistura de solução de cloreto de potássio 4% e metanol (m/v), seguido de um procedimento de clarificação com solução de sulfato de cobre 10% e celite e partição com clorofórmio. A quantificação foi através de comparação visual dos padrões quantitativos com as amostras. O limite de detecção deste método é de 2 µg/kg. A confirmação foi através de derivatização com ácido trifluoroacético em CCD¹⁹.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 mostra os níveis de aflatoxinas nas 87 amostras analisadas. As concentrações das amostras variaram de 3 a 1659 µg/kg e o 90th percentil foi de 601 µg/kg. Em 31 amostras (que corresponde a 35,6%) não foram detectadas aflatoxinas e a média de contaminação das amostras positivas foi de 306 µg/kg. Em 56 amostras (que corresponde a 64,4%) foram detectadas aflatoxinas sendo que 34 amostras (que corresponde a 39,1%) excederam o limite estabelecido pela Resolução nº 34/76 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos¹, que é de 30 µg/kg para a somatória de AFB₁ e AFG₁. Este limite máximo tolerado foi modificado em outubro de 2002, quando o Ministério da Saúde publicou novos limites para aflatoxinas em amendoim e milho, através da Resolução RDC nº 274 de 15/10/2002², que corresponde à somatória das 4 aflatoxinas (AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂), igual a 20 µg/kg.

Caso a legislação em vigor fosse utilizada para avaliar os resultados apresentados por este estudo, mesmo considerando apenas as AFB₁ e AFG₁, as amostras com teores de aflatoxinas acima do limite máximo tolerado, passaria de 34 (39,1%) para 42 amostras (que corresponde a 48,3%). Este novo limite máximo tolerado irá incentivar as empresas a adotarem um maior controle da qualidade da matéria prima e do produto acabado.

Tabela 1. Ocorrência de AFB₁ e AFG₁ em amendoim e produtos de amendoim da região de Marília/SP, Brasil nos anos de 1999, 2000 e 2001.

Ano	Total de amostras	Nº de amostras não detectadas	Nº de amostras positivas	Nº de amostras < 30 µg/kg	Nº de amostras < 30 µg/kg	Média das amostras positivas µg/kg	90 th percentil µg/kg	Intervalo min-max µg/kg
1999	57	16 (28,1%)	41 (71,9%)	14 (24,6%)	27 (47,4%)	317	896	3 –1659
2000	14	03 (21,4%)	11 (78,6%)	4 (28,6%)	7 (50%)	313	766	3 -1151
2001	16	12 (75%)	4 (25%)	4 (25%)	0 (%)	18	21	8 –21
Total	87	31 (35,6%)	56 (64,4%)	22 (25,3%)	34 (39,1%)	217	601	3 -1659

Limite de detecção: 2 µg/kg

Das 87 amostras analisadas, 23 (26,4%) correspondiam a amendoim cru e 64 (73,6%) eram de amendoim processado, sendo que 9 (43,5%) e 25 (39,1%) amostras, respectivamente, apresentaram valores acima do limite estabelecido pela Resolução nº 34/76. O maior nível de contaminação por aflatoxinas (1659µg/kg) foi encontrado no amendoim processado (amendoim japonês).

Em 1999, choveu intensamente durante a safra das águas. Em janeiro deste mesmo ano, o índice pluviométrico foi de 876,1 mm, valor considerado alto, se comparado com a média anual da região (Tabela 2). Provavelmente, esta foi a razão do alto nível de contaminação por aflatoxinas neste período. Prado et al¹⁶ observaram que 40-80% das colheitas podem ser contaminadas com aflatoxinas quando as chuvas são intensas na época de colheita.

Em janeiro de 2000, o índice pluviométrico foi de 187,7 mm e em 2001, foi de 106,5 mm, índice este considerado menor quando comparado com o ano de 1999. Este decréscimo de chuvas provavelmente pode ter contribuído para a redução dos

níveis de contaminação do amendoim por aflatoxinas no ano de 2001, já que não houve alterações significativas nas médias das temperaturas máximas tanto na safra das águas quanto na da seca durante o período em que a pesquisa foi realizada.

Os resultados em nosso estudo (Figura 1), quando comparados com os dados relatados por outros pesquisadores do Brasil, indicam que os teores de aflatoxinas encontrados são muito semelhantes^{3,8,10,17,18}, demonstrando que o problema de aflatoxinas em amendoim continua sendo ainda um risco para o consumidor.

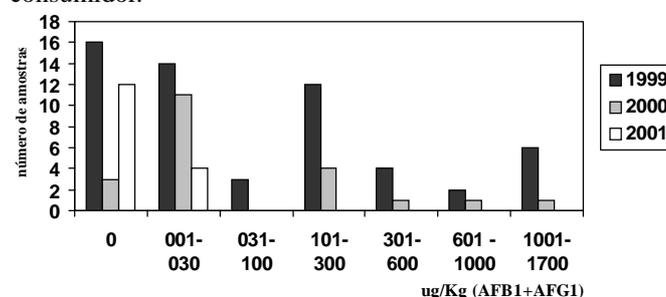


Figura 1. Distribuição de Aflatoxinas B₁ + G₁ em amendoim e produtos de amendoim nos anos de 1999, 2000 e 2001.

Tabela 2. Média da Temperatura Máxima e Pluviosidade

Ano	Média da Temperatura Máxima (°C)		Média da Pluviosidade (mm)	
	Safra das águas (outubro-março)	Safra da seca (abril-setembro)	Safra das águas (outubro-março)	Safra da seca (abril-setembro)
1999	30,7	28,6	317,2	53,9
2000	30,7	27,2	143,6	42,7
2001	31,5	28,3	195,6	60,6

Fonte: Secretaria de Agricultura e Abastecimento ⁽¹¹⁾

Apesar de inicialmente ser considerado um problema que ocorre após a colheita, a contaminação por aflatoxinas pode ocorrer também durante o crescimento da planta no campo¹¹.

Estudos da ecologia do *Aspergillus flavus* e *parasiticus* indicam que a espécie *parasiticus* é melhor adaptado em solos e é encontrado principalmente em amendoins, enquanto que a espécie *flavus* parece ser melhor adaptado para o desenvolvimento ativo das partes aéreas dos vegetais, como flores e folhas⁷.

A distinção bioquímica entre as duas espécies é que o *Aspergillus parasiticus* produz todos os 4 tipos de toxinas AFB₁, AFB₂, AFG₁ e AFG₂, enquanto que o *Aspergillus flavus* possivelmente produz apenas a AFB₁ e AFB₂. Segundo Moss¹¹, dados analíticos demonstraram que a maioria dos amendoins contaminados contém aflatoxinas B e G.

A contaminação com aflatoxinas no campo é muito difícil de ser controlada por ser basicamente influenciada por condições climáticas como a umidade relativa e temperatura. A umidade do solo, estresse provocado pela seca, danos dos grãos provocados por insetos e deficiência de minerais também são fatores importantes na contaminação¹².

O Codex Alimentarius⁶ está discutindo um código sobre práticas para redução da contaminação do amendoim com aflatoxinas, considerando as implicações na saúde pública, os efeitos na saúde dos animais e os efeitos na economia nacional e internacional.

A implantação de boas práticas agrícolas pelos produtores de amendoim é importante pois representam o início

da prevenção da contaminação do amendoim com aflatoxinas, seguido de boas práticas de fabricação durante o manuseio, processamento e distribuição.

Os efeitos tóxicos das aflatoxinas representam um risco à saúde dos consumidores que utilizam estes produtos, e sua presença em níveis elevados pode acarretar graves conseqüências econômicas por não atender a legislação.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho indicaram que 64,4% dos amendoim e produtos de amendoim estavam contaminados por aflatoxinas, com 39,1% amostras acima da legislação vigente no período. As condições de temperatura e umidade predominante na região de Marília que são favoráveis ao crescimento de fungos toxigênicos possivelmente influenciaram estes resultados. Nos anos em que o índice pluviométrico foi maior, os níveis de contaminação por aflatoxinas também foram maiores, considerando que a temperatura, ideal ao crescimento de fungos produtores de aflatoxinas, não apresentou alterações significativas.

Boas técnicas de colheita, bem como transporte, armazenamento e processamento adequado certamente poderão auxiliar a solucionar o problema, mas ainda não proporcionam uma solução completa¹⁴. Conseqüentemente, medidas eficientes de prevenção poderão sempre ser confirmadas por análises químicas. Desta forma, a avaliação contínua e sistemática é o melhor caminho para prevenir e controlar a infestação dos produtos agrícolas por fungos toxigênicos.

RIALA6/955

Shundo, L. ; Silva R. A. e Sabino M. - Occurrence of Aflatoxins in peanut and peanut products commercialized in the region of Marília - SP, Brazil in the period of 1999-2001. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 62(3): 177 - 181, 2003.

ABSTRACT. Eighty seven samples of peanuts and peanut products commercialized in the region of Marília/SP, Brazil in the period of 1999 to 2001 were analyzed in order to identify and quantify aflatoxin B₁ and G₁, determined by thin-layer chromatography (TLC), according to the method described by Soares and Rodriguez-Amaya. Aflatoxins were found in 56 (64,4%) of the samples and 34 (39,1%) exceeded the limits of the Brazilian legislation valid in that period which, for aflatoxin B₁+G₁, was 30 µg/kg. The aflatoxins concentration in the samples varied from 3 to 1659 µg/kg and the average of positive samples was 306µg/kg. In 31 (35,6%) samples were not detected aflatoxins and the 90th percentil was 601 µg/kg. Data of temperature and level of the rains in the same period showed that high levels of aflatoxins had agreed with high levels of temperature and rains and probably, it resulted on this contamination. Our studies showed that aflatoxin contamination exists, mainly due to conditions of temperature and humidity prevalent in the region of Marília that are favorable of fungal growth. A good crop management technique and the continuous and systematic monitoring is the best way to prevent and control the infestation of agricultural products with toxigenic moulds.

KEY WORDS. aflatoxins B₁ and G₁, peanut, occurrence, thin layer chromatography.

REFERÊNCIAS

1. Brasil. Leis, Decretos, etc. Resolução n° 34/76 da Comissão de Normas e Padrões para Alimentos. **Diário Oficial**, Brasília, DF, Sec. I, p 710, 19 de janeiro de 1977. Fixa padrões de tolerância para as aflatoxinas em alimentos.
2. Brasil. Leis, Decretos, etc. Resolução – RDC n° 274 de 15/10/2002 da ANVISA. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, Sec. I, 16 de outubro de 2002. Aprova o Regulamento Técnico sobre limites máximos de aflatoxinas no leite, amendoim e milho.
3. Brigido, B.M.; Badolato, M.I.C.; Freitas, V.P.S. Contaminação de amendoim e seus produtos comercializados na região de Campinas – SP por aflatoxinas durante o ano de 1994. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 55(2): 85-90, 1995.
4. Bullerman, L.B.; Schroeder, L.L.; Park, K.Y. Formation and Control of Mycotoxins in Food. **J. Food. Prot.**, 47(8): 637-646, 1984.
5. Chu, F.S. Mycotoxins: food contaminations, mechanism, carcinogenic potencial and preventive measures. **Mutat. Res.**, 259: 291-306, 1991
6. Codex Alimentarius – **Codex Committee on Food Additives and Contaminants** – Discussion Paper on the Development of a Code of Practice for the Reduction of Aflatoxin Contamination in Peanuts – CX/FAC 03/25 – nov/2002.
7. Diener, U.L.; Davis, N.D. Limiting temperature and relative humidity for growth and production of aflatoxin and free fatty acids by *Aspergillus flavus* in sterile peanuts. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, 44: 259-263, 1987.
8. Freitas, V.P.S.; Brigido, B.M. Occurrence of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in peanuts and their products marketed in the region of Campinas, Brazil in 1995 and 1996. **Food Addit. Contam.**, 15(7): 807-811, 1985.
9. IARC. Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins., **IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans**. Lyon, International Agency for Research on Cancer 1993, 56: 254-395.
10. Martins-Maciel, E.R. et al. Incidence of aflatoxins and *Aspergillus flavus* in peanuts consumed in Maringá city, Brazil. **Arq. Biol. Tecnol.**, 39(4): 807-813, 1996.
11. Moss, M.O. Mycotoxins of *Aspergillus* and other Filamentous Fungi. **J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl.**: 69S-81S, 1989.
12. Moss, M.O. Economic Importance of Mycotoxins – Recent Incidence. **Int. Biodeterior. Biodegradation**, 27:195-204, 1991.
13. OPAS. Organización Panamericana de la Salud. Micotoxinas. Criterios de Salud Ambiental 11, Washington, OPAS, 1983, 131 p.
14. Park, L.; Liang, B. Perspectives on Aflatoxin Control for Human Food and animal feed. **Trends Food Sci. Tech.**, 4: 334-342, 1993.
15. Pittet, A. Natural Occurrence of Mycotoxins in Foods and Feeds: A Decade Review. In: Koe, WJ, Samson RA, van Egmond HP, Gilbert J, Sabino M (Ed). **Mycotoxins and Phycotoxins in Perspective at the Turn of the Millennium**. Wageningen, The Netherlands: 2001, p.153-172.
16. Prado, G. Incidência de Aflatoxina B₁ em Alimentos. **Rev. Farm. Bioquím.**, 5:147-157, 1983.
17. Sabino, M. et al. A Survey of the Occurrence of Aflatoxins in groundnut (peanuts) and groundnut products in São Paulo State/Brazil in 1994. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 58(1): 53-57, 1999.
18. Sabino, M. et al. Occurrence of Aflatoxins in Peanuts and Peanuts Products Consumed in the State of São Paulo/Brazil from 1995 to 1997. **Rev. Microbiol.**, 30: 85-88, 1999.
19. Scott, PM. – Natural Toxins. In: **Association of Official Analytical Chemists** – Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 16th ed. Maryland: 1997, cap 49, p.26-27.
20. Secretaria de Agricultura e Abastecimento. **Coordenadoria de Assistência Técnica Integral (CATI)** – Regional de Marília. Escritório de Desenvolvimento Rural. Observações termo-pluviométricas, 1998, 1999, 2000 e 2001.
21. Soares, L.V.; Rodriguez-Amaya, D.B. Survey of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone and sterigmatocystin in some Brazilian foods by using a multitoxin thin-layer chromatographic method. **J. Assoc. Off. Anal. Chem.**, 72 (1): 22-26, 1989.

Recebido em 18/02/2003 ; Aprovado em 08/10/2003



Ocorrência de Aflatoxinas em amendoim e seus produtos comercializados no estado da Bahia durante o ano de 2002*

Occurrence of Aflatoxins in peanut and peanut products commercialized in the state of Bahia during the year 2002

Maria José M. BATATINHA^{1**}
Monica M. dos SANTOS²
Mariana B. BOTURA²
Gisele N. ALMEIDA³
Luciana F. DOMINGUES³
Claudia H. KOWALSKI⁴
Carlos A. MALLMANN⁴

RIALA6/956

Batatinha, M. J. M. et al. - Ocorrência de Aflatoxinas em amendoim e seus produtos comercializados no estado da Bahia durante o ano de 2002. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 62(3): 183 - 187, 2003.

RESUMO. Este estudo teve como objetivo avaliar a contaminação por aflatoxinas (B_1 , B_2 , G_1 e G_2) em amostras de amendoim comercializadas em alguns municípios do estado da Bahia. Foram analisadas 100 amostras, sendo 33 de amendoim e 67 de produtos a base de amendoim. A coleta das amostras foi realizada aleatoriamente em diferentes estabelecimentos comerciais da cidade de Salvador (75 amostras) e em municípios do estado da Bahia (25 amostras) durante o período de janeiro a outubro de 2002. A extração foi realizada com acetonitrila:água (84:16, v/v), e a quantificação das aflatoxinas procedida pelo método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), empregando detecção por fluorescência. Das 31 amostras de amendoim analisadas, 29 (93,55%) foram positivas, sendo que 17 (54,84%), apresentaram teor de contaminação por $B_1 + B_2 + G_1 + G_2$ superior a 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Para as 69 amostras de derivados de amendoim, apenas 6 (8,7%) apresentaram contaminação por aflatoxinas $B_1 + B_2 + G_1 + G_2$ superior ao limite. Os resultados ainda revelaram que 20 (80%) do total de amostras coletadas nos municípios do Estado (25) e 38 (50,7%) das 75 amostras procedentes de Salvador foram positivas. Os resultados ressaltam a necessidade de um controle eficaz dos níveis de aflatoxinas destes produtos na região.

PALAVRAS-CHAVE. aflatoxinas; amendoim; produtos de amendoim; ocorrência.

* Realizado no Laboratório de Toxicologia (LATOX/UFBA) e no Laboratório de Análises Micotoxicológicas (LARIC/UFMS-RS)

¹ Professora Adjunta (Laboratório de Toxicologia – Escola de Medicina Veterinária /UFBA).

² Mestranda da Escola de Medicina Veterinária/UFBA

³ Iniciação Científica e estagiária do LATOX/UFBA

⁴ Iniciação Científica e estagiária do LAMIC/UFMS

⁵ Professor Titular (Laboratório de Análises Micotoxicológicas – Universidade Federal de Santa Maria)

** Endereço para correspondência

Av. Ademar de Barros, 500, 40170-110, Ondina, Salvador-Bahia; e-mail: mjmb@ufba.br

INTRODUÇÃO

O consumo de alimentos contaminados por micotoxinas pode causar doenças conhecidas como micotoxicoses em humanos e animais⁸. As micotoxinas são metabólitos tóxicos produzidos por fungos em uma grande variedade de substratos, quando existem condições favoráveis ao crescimento destes fungos, podendo ocorrer durante a colheita, armazenamento, processamento e transporte¹⁶. Diversos fatores tais como umidade e temperatura ambiental, teor de umidade e atividade de água do substrato favorecem o crescimento de fungos e a conseqüente produção de micotoxinas em produtos alimentícios^{13,19}.

Dentre os metabólitos fúngicos mais estudados destacam-se as aflatoxinas, produzidas por *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius* e *A. pseudotamarii*, sendo os dois primeiros referidos como de maior importância econômica⁵. Quatro tipos de aflatoxinas são mais frequentemente isolados: B₁, B₂, G₁ e G₂, considerando-se a aflatoxina B₁ como a de maior toxicidade e potente agente carcinogênico^{9,20}, além de produzir efeitos mutagênicos⁷.

Bautista et al.² examinaram 25 amostras de milho no município de Irecê-BA e detectaram contaminação por aflatoxina B₁ em três amostras. Considerando-se que a cidade de Salvador e regiões adjacentes apresentam condições climáticas favoráveis ao crescimento de fungos, com temperaturas elevadas (superior a 20°C) e umidade relativa do ar superior a 70%¹, associado à escassez de registros locais oficiais referente ao monitoramento de aflatoxinas em produtos alimentícios, o presente trabalho objetivou verificar a ocorrência de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂ em amendoim e seus derivados comercializados na cidade de Salvador e alguns municípios do estado da Bahia durante o período de janeiro a outubro de 2002.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

Foram analisadas 31 amostras de amendoim cru e 69 de produtos de amendoim (paçoca (6), pé-de-moleque (12), e outros como amendoim salgado, cozido, torrado e salgado, frito e salgado, confeitado, doce pralinê e tipo japonês (51). As amostras foram coletadas aleatoriamente de estabelecimentos comerciais localizados na cidade de Salvador (n=75) e de 14 municípios do estado da Bahia (n=25). As amostras tiveram um peso representativo de no mínimo 150g.

Métodos

1. Determinação de aflatoxinas

Extração

A extração e limpeza das amostras foram realizadas no Laboratório de Toxicologia da Escola de Medicina Veterinária da UFBA. A extração das aflatoxinas foi realizada utilizando-se

100 mL de acetonitrila:água (84:16, v/v) para 50 gramas de amostra, sob homogeneização em blender por três minutos, procedendo-se em seguida filtração e secagem de 10 mL do extrato obtido¹⁰. Os extratos secos foram acondicionados em frascos âmbar limpos, envolvidos em papel alumínio e enviados para análise no Laboratório de Análises Micotoxicológicas (LAMIC) da Universidade Federal de Santa Maria.

Detecção e Quantificação

Os extratos enviados ao LAMIC foram ressuspensos em acetonitrila:água:ácido acético (840:160:5, v/v/v), e em seguida submetidos à purificação automatizada com sílicas, derivatização pré-coluna de 200µL do extrato purificado com 700µL de ácido trifluoracético e injeção de 50 µL em sistema de cromatografia líquida (CLAE). A fase móvel foi composta por água:acetonitrila:metanol (70:15:15, v/v/v) a uma vazão de 1mL/min., sendo empregada coluna RP18 (Merck, Darmstad, Alemanha), mantida a uma temperatura de 50°C. A detecção foi realizada por fluorescência a um comprimento de onda de excitação de 360nm e emissão a 445nm. O limite de quantificação para cada aflatoxina foi de 1µg/kg, e o coeficiente médio de recuperação variou de 93% a 97% para amendoim processado e amendoim cru, respectivamente. A confirmação da identidade das aflatoxinas foi procedida através de varredura espectral em 3D realizada pelo próprio equipamento de cromatografia¹⁰ (Agilent 1100, Agilent Technologies, Waldbronn, Alemanha).

2. Determinação da Atividade de Água (a_w)

A atividade de água (a_w) foi determinada instrumentalmente pelo aparelho AQUALAB (Decagon Devices Inc., Pullmann, USA)

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos para as amostras oriundas dos 14 municípios do estado da Bahia, indicaram um percentual de 80% (20/25) de amostras contaminadas por aflatoxinas (B₁+B₂+G₁+G₂), enquanto que aquelas procedentes da cidade de Salvador apresentaram um percentual menor, 50,7% (38/75) (Tabela 1). A diferença do número total de amostras provenientes de Salvador (75) e dos municípios (25) podem ter influenciado neste resultado.

Das 100 amostras analisadas, 58 continham aflatoxinas, sendo que 11 apresentaram contaminação pelas quatro aflatoxinas (AFB₁+AFB₂+AFG₁+AFG₂), 29 por apenas AFB₁, 16 por AFB₁+AFB₂ e duas por AFB₁+AFB₂+AFG₁. Observou-se ainda que em 23 amostras, os níveis de contaminação por aflatoxinas foram igual ou superior a 20 µg/kg, limite máximo permitido pelo Ministério da Saúde¹¹ (Figura 1), incluindo uma amostra de amendoim cru proveniente de um dos municípios do referido Estado, a qual apresentou contaminação de 6625 µg/kg de aflatoxinas, sendo 5450 µg/kg apenas de AFB₁.

A ocorrência de aflatoxinas nas amostras de amendoim e seus produtos foi maior para a aflatoxina B₁ em relação às demais toxinas (Figura 2), o que justifica preocupação quanto

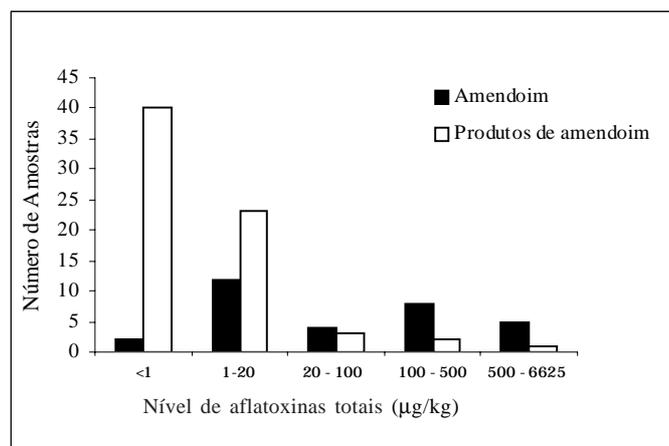


Figura 1. Variações dos níveis de aflatoxinas totais (µg/kg) em amostras de amendoim e de produtos de amendoim procedentes do estado da Bahia durante o ano de 2002.

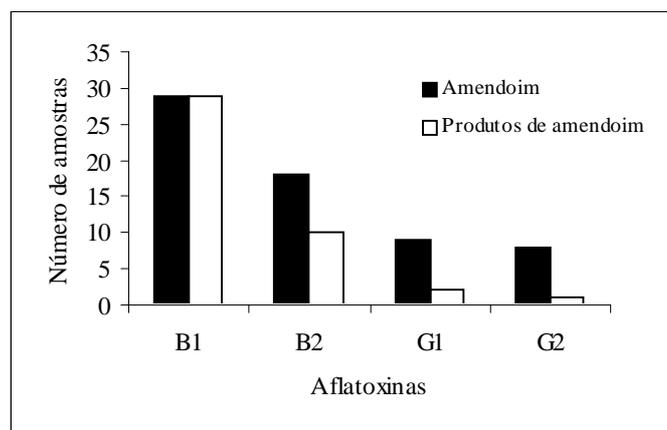


Figura 2. Distribuição qualitativa das aflatoxinas AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂ em amostras de amendoim e seus produtos procedentes do estado da Bahia durante o ano de 2002.

Tabela 1. Incidência de aflatoxinas (B₁+B₂+G₁+G₂) em amendoim e produtos de amendoim comercializados no estado da Bahia no período de janeiro a outubro de 2002.

Tipos de Amostras	Amostras coletadas em Salvador		Amostras colhidas em municípios do Estado da Bahia	
	Total	Positivas*	Total	Positivas*
Amendoim ¹	17	15	14	14
Produtos de Amendoim ²	58	23	11	06
Total	75	38 (50,7%)	25	20 (80%)

¹ Amendoim cru.

² Amendoim confeitado, tipo japonês, pé de moleque, paçoquinha, frito e salgado, torrado e salgado, salgado, cozido e doce pralinê.

* Limite de quantificação = 1µg/Kg para cada aflatoxina

ao risco da ingestão frequente destes produtos, uma vez que esta toxina é considerada como um potente agente carcinogênico e pode representar um risco potencial à saúde pública. Este fato também foi verificado por outros pesquisadores^{4,12,15,17}.

De acordo com os nossos resultados, em relação à presença de aflatoxinas, 29 (93,55%) amostras de amendoim cru, e 29 (42,03%) de produtos de amendoim apresentaram-se positivas.

O maior percentual de contaminação por aflatoxinas foi observado no amendoim cru em relação aos produtos de amendoim. A atividade de água nas amostras de amendoim cru variou de 0,487 a 0,732, enquanto que para os produtos derivados, esta variação esteve entre 0,281 e 0,727, com valores médios de 0,606 e 0,419, respectivamente para o amendoim e seus produtos. A importância deste fato é fundamentada na premissa de que a atividade de água do substrato também é um fator relevante para a produção de micotoxinas¹⁴.

Relatos sobre a ocorrência de aflatoxinas em produtos brasileiros de amendoim revelaram um percentual de contaminação inferior aos níveis encontrados no total de amostras analisadas neste estudo (58%)^{3,4,6,17,18}.

Enfatizamos a necessidade de um programa de controle eficaz, através da vigilância constante dos níveis de aflatoxinas em alimentos no estado da Bahia, que sirva de orientação para os órgãos públicos no sentido de adotar medidas de controle e prevenção de riscos à saúde pública.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos demonstram a importância e a necessidade de um monitoramento sistemático e contínuo dos níveis de aflatoxinas em amendoim e produtos derivados consumidos no estado da Bahia.

As aflatoxinas totais foram encontradas em 58% das amostras de amendoim e seus derivados, com 23% das amostras apresentando contaminação superior a 20 µg/kg, limite máximo permitido pelo Ministério da Saúde.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Dra. Myrna Sabino pela valiosa colaboração prestada na revisão deste artigo.

Batatinha, M. J. M. et al. - Occurrence of Aflatoxins in peanut and peanut products commercialized in the State of Bahia during the year 2002. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 62(3): 183 - 187, 2003.

ABSTRACT. The objective of this study was to evaluate the contamination of peanut and peanut products by aflatoxins (B_1 , B_2 , G_1 e G_2) commercialized in Salvador and some cities of the state of Bahia. It was analysed 100 samples, from which 33 were peanuts and 22 peanuts products. The samples were randomly collected in different groceries in Salvador (75) and from 14 different cities of the state of Bahia (25) from January to October 2002. The extraction of the samples was realized with acetonitrile:water (84:16, v/v), and quantification of the aflatoxins was made using the HPLC method with fluorescence detection. From the 33 samples of peanuts analysed, 31 (93,9%) were positive, and from these, 19 (57,58%) exhibited contamination by aflatoxins ($B_1+B_2+G_1+G_2$) higher or equal to $20\mu\text{g}/\text{kg}$. From the 67 samples of peanut products, only 4 (5,98%) presented contamination by aflatoxins ($B_1+B_2+G_1+G_2$) higher or equal to $20\mu\text{g}/\text{kg}$. According to the results, 20 (80%) of the whole samples (25) collected at the cities of the state of Bahia and 38 (50,7) of the 75 samples collected in Salvador were positive. The results indicate the great importance of a effective control of aflatoxin levels in these products.

KEY WORDS. aflatoxins, peanut, peanut products, occurrence.

REFERÊNCIAS

1. Anuário Estatístico da Bahia, SEI – Informação a Serviço da Sociedade. Salvador, Bahia, 13:1-570, 1999.
2. Bautista, A.R.P.L. et al. Aflatoxinas em grãos de milho armazenado no Estado da Bahia. **Rev. Soc. Bras. Toxicol.**, 2(1): 24-25, 1989.
3. Brigido, B.M.; Badolato, M.I.C.; Freitas, V.P.S. Contaminação de amendoim e seus produtos comercializados na região de Campinas/SP, por aflatoxinas durante o ano de 1994. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 55(2): 85-90, 1995.
4. Caldas, E.D.; Silva, S.C.; Oliveira, J.N. Aflatoxinas e ocratoxina A em alimentos e riscos para a saúde humana. **Rev. Saúde Pública**, v. 36, n.3, p. 319-323, 2002.
5. CAST (Council for Agricultural Science and Technology). Mycotoxins: Risks in plants, animal and human systems. Cap. 3, **Task Force Report**, January, n. 139, Ames:Iowa:USA, 2003. 199p.
6. Colaço, W.; Ferraz, U.; Albuquerque, R.L. Incidência de aflatoxina em amendoim e produtos derivados consumidos na cidade de Recife no período de 1989 a 1991. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 54(1): 1-4, 1994.
7. Harris, C.C. Deichmann Lecture – p53 tumor suppressor gene at the crossroad of molecular carcinogenesis, molecular epidemiology and cancer risk assessment. **Toxicology Letters**, v. 82, n. 83, p.1-7, 1995.
8. Hussein, H.S.; Brase, J.M. Toxicity, metabolism and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, n. 167, p.101-134, 2001.
9. IARC – **Monographs on the Evolution Carcinogenic Risk to Human**. Lyon, IARC – International Agency for Research on Cancer, Volume 56, 1993, p. 245-395.
10. Mallmann, C.A. et al., Automation of the analytical procedure for the simultaneous determination of aflatoxins AFB1, AFB2, AFG1 And AFG2. In **X International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins 2000**. Guarujá, São Paulo- Brasil. 21-25 may, p.35.
11. Ministério da Saúde: Resolução RDC nº 274, da ANVISA, de 15 de outubro de 2002, publicada no **Diário Oficial da União**, de 16/10/2002.
12. Oliveira, V. et al. Ocorrência de Aflatoxinas B1 e G1 em amendoim comercializado em Goiânia/GO, Brasil. **Rev. Microbiol.**, São Paulo, 22(4): 319-22, 1991.
13. OMS (Organizacion Mundial de la Salud). Critérios de salud ambiental 11: Micotoxinas, 1983. 131p.
14. Prado, G. et al. Efeito da umidade relativa na contaminação microbiana e produção de aflatoxinas em amendoim em grão. **Ciênc. Tecnol. Alim.**, 11:264-273, 1991.
15. Sabino, M. et al. Occurrence of aflatoxins in peanuts and peanut products consumed in the State of São Paulo/Brazil from 1995 to 1997. **Rev. Microbiol.**30: 85-88, 1999.
16. Sabino, M.; Rodriguez-Amaya, D.B. Mycotoxins research in Brazil. **Rev. Ciência e Cultura (Journal of Brazilian Association for Advancement of Science)**, 45 (6): 359-71, 1993.
17. Santos, C.C.M. dos; Lopes, M. do R.V. e Kosseki, S.Y. Ocorrência de aflatoxinas em amendoim e produtos de amendoim comercializados na região de São José do Rio Preto/SP. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 60(2): 153-157, 2001.
18. Silva, J.C.; Oliveira, J.N.; Caldas, E.D. Aflatoxinas em

- alimentos comercializados no Distrito Federal de 1985 a 1995. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 56(2): 49-52, 1996.
19. Smith, J.E. et al. Storage product ecology and mycotoxin formation. **Mycotoxins and Phycotoxins – Development in Chemistry, Toxicology and Food safety**, 1998, p.289-302. Editora Alaken, Inc.: Fort Collins, Colorado. 608p.
20. World Health Organization – **Mycotoxins – In: Environmental Health Criteria 11**, Geneve, WHO, 1979. p.127.

Recebido em 14/03/2003 ; Aprovado em 10/10/2003



A proposal of an alternative *in vitro* method for the evaluation of the safety of shampoos

Proposta de método alternativo *in vitro* para avaliação da segurança de shampoos

Janice C. de AZEVEDO¹
Áurea S. CRUZ²
Terezinha de J. A. PINTO^{1*}

RIALA6/957

Azevedo, J. C. de; Cruz, A. S. e Pinto, T. de J. A - A proposal of an alternative *in vitro* method for the evaluation of the safety of shampoos. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 62(3): 189 - 193, 2003.

ABSTRACT. Although tests using animals are still demanded in the evaluation of shampoos, there is a strong evidence of a tendency for replacing them by *in vitro* systems. This study aims at defining conditions for the application of a method using NCTC clone 929 cells, as an alternative. Procedures employed to test non diluted samples of shampoos for adults resulted in irritation (in the *in vivo* method); the same result was not observed when samples diluted to a 25% concentration were tested. In the *in vitro* tests, the same shampoos presented a perfect correlation of results when not diluted (cytotoxic) and when diluted to a 0.1% concentration (non cytotoxic). When the shampoos for children use were tested, the only case of irritation happened with one of the 4 non-diluted shampoos. The absence of cytotoxicity was observed in the *in vitro* test, after diluting all the samples to 1% and 0.1%. It is possible thus to use the *in vitro* test instead of the *vivo* one, if preceded by a careful validation with emphasis on the concentration of the product.

KEY WORDS. eye irritation, cell culture, cytotoxicity, Draize

¹ Universidade de São Paulo

² Instituto Adolfo Lutz

* Endereço para correspondência:

Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP - Departamento de Farmácia

Av. Prof. Lineu Prestes, 580 Bloco 15

São Paulo, SP, Brazil, 05508-900 - e-mail: tjapinto@usp.br

INTRODUCTION

The eye irritation test in rabbits is the method currently used to evaluate the hazard or safety of substances introduced into the eyes or used in their close proximity⁴. To reduce the need for animal testing, as well as to establish a more rapid and practical method, "in vitro" assays are being developed as an alternative to the rabbit test^{1,8}.

The development of an *in vitro* assay is a great challenge. The tendency is to use a single selected cell type instead of the eye, which is a complex biological system.

Several points have been related to the biological test performed in an animal organ, such as a rabbit eye. For instance, the rabbit eye has a nictitating membrane, non existing in the human eye; a rabbit eye produces, in an aggressive situation less tears than the human one does. When an irritating material is placed in the rabbit eye the tears, at first, are usually clear. Within 24 hours, however, a viscous milky secretion is seen which appears to come from under the nictitating membrane². On the other hand, in the Draize test the product under evaluation is applied without previous dilution. If we consider the practical use of a shampoo, we have to take into account that, except for an accident, only residual quantities of the product will remain on the eye surface. Considering the above facts, this study aims to define details of experimental conditions for a cell culture system which could be used instead of the current Draize score.

MATERIAL AND METHODS

The test material used in this study consisted of 8 different shampoos, 4 for adults (A, B, C and D) and 4 for children (E, F, G and H), each one of them represented by three batches.

They were assayed by the conventional Draize method, according to the Food and Drug Administration (FDA) protocol³, using six rabbits. The samples were tested directly and after water dilution (25%, 5%, 1% and 0.1%). The instillation of samples was in a 0.1 mL volume, in one of the animal eyes, being the other one the control. The observation of the reactions involving cornea, iris and conjunctiva (chemosis, redness) happened after one, two, three and seven days.

The same shampoos, with equal concentrations, were also tested by an *in vitro* using the selected NCTC clone 929 cell line grown in Petri dishes in a concentration of 3×10^5 cells per mL in Eagle's minimum essential medium supplemented with 10% fetal bovine serum (GibcoTM, USA). The Petri dishes were put in an atmosphere of 5% CO₂ in air for 48 hours at 37°C with the purpose of getting a cell monolayer. This culture medium was replaced by a 5 ml volume of a solution of 1.8% agarose, containing 0.01% of neutral red mixed in equal parts with Eagle's minimum essential medium without serum. After wetting filter-paper discs (FramexTM) in the samples, each one of them was deposited on the agar surface of six dishes and then put again in a atmosphere of 5% CO₂ in air for 24 hours at 37°C. As positive

Table 1. Draize test and tytotoxicity assay results applied to shampoos for adult use performed in several dilutions

Sample	Batch	100%		25%		5%		1%		0.1%	
		in vivo	in vitro								
A	1	I	C	NI	C	NI	C	NI	NC	NI	NC
	2	I	C	NI	C	NI	C	NI	NC	NI	NC
	3	I	C	NI	C	NI	C	NI	NC	NI	NC
B	1	I	C	NI	C	NI	C	NI	C	NI	NC
	2	I	C	I	C	NI	C	NI	C	NI	NC
	3	I	C	NI	C	NI	C	NI	C	NI	NC
C	1	I	C	NI	C	NI	C	NI	C	NI	NC
	2	I	C	NI	C	NI	C	NI	C	NI	NC
	3	I	C	NI	C	NI	C	NI	C	NI	NC
D	1	I	C	NI	C	NI	C	NI	C	NI	NC
	2	I	C	NI	C	NI	C	NI	C	NI	NC
	3	I	C	NI	C	NI	C	NI	C	NI	NC

I - Irritant / C - Cytotoxic / NI - Non Irritant / NC - Non Cytotoxic

Table 2. Draize test and cytotoxicity assay results applied to shampoos for children use performed in several dilutions

Sample	Batch	100%		25%		5%		1%		0.1%	
		in vivo	in vitro								
E	1	NI	C	NI	C	NI	NC	NI	NC	NI	NC
	2	NI	C	NI	C	NI	NC	NI	NC	NI	NC
	3	NI	C	NI	C	NI	NC	NI	NC	NI	NC
F	1	NI	C	NI	C	NI	C	NI	NC	NI	NC
	2	NI	C	NI	C	NI	C	NI	NC	NI	NC
	3	NI	C	NI	C	NI	C	NI	NC	NI	NC
G	1	I	C	NI	C	NI	C	NI	NC	NI	NC
	2	I	C	NI	C	NI	C	NI	NC	NI	NC
	3	I	C	NI	C	NI	C	NI	NC	NI	NC
H	1	NI	C	NI	C	NI	C	NI	NC	NI	NC
	2	NI	C	NI	C	NI	C	NI	NC	NI	NC
	3	NI	C	NI	C	NI	C	NI	NC	NI	NC

I - Irritant / C - Cytotoxic / NI - Non Irritant / NC - Non Cytotoxic

and negative controls, 1N sodium hydroxide and 0.9% NaCl solutions were respectively used. The presence of leachable toxic substances was manifested by the loss of dye from the cells as well as by the lysis of the cells within the zone, near the disc. The toxic response is given as negative or positive, taking into account a response index based on the size of the diffusion (decolorized) zone¹⁰.

RESULTS

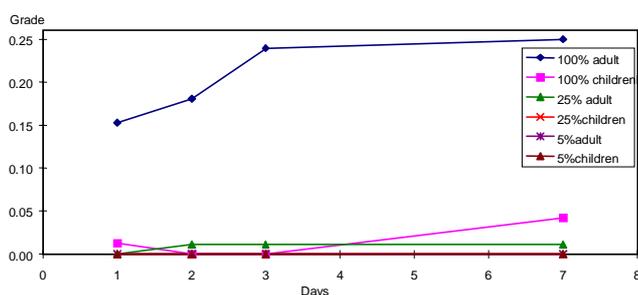


Figure 1. Cornea grades averages (shampoos for adult and children use), each day

It is possible to observe in Table 1 that all the shampoos for adults are, according to the Draize score, considered as irritant when tested without dilution. After dilutions to 25% only a batch has persisted irritant. However, below this concentration all of them changed to a non irritant score.

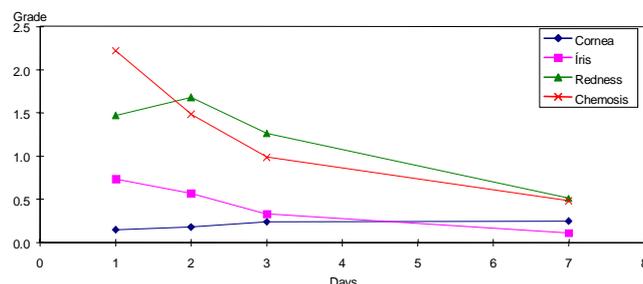


Figure 2. Reactions grade of each eye structure, referring to shampoos for adult use, without dilution

In vitro tests only diluted until 1% (Table 1) are considered, it is possible to observe a partial correlation with the rabbit tests. Nevertheless, in the case of dilution absence or a 0.1% concentration a total correlation of results was observed.

In the case of shampoos for children (Table 2) the absence of ocular irritation was detected in three of four products, after being tested without dilution. When samples were diluted to 25%, all of them were considered non irritant. As for the *in vitro* tests from a 5% concentration on, one product presented non cytotoxic effect, as verified in all samples tested with a concentration of 1% and 0.1%. Figure 1 shows the evolution of cornea reactions, according to increasing concentrations. A higher level of cornea injuries can also be observed. Figure 2 shows different levels of reactions in the eye structures produced by shampoos for adult use. The values presented in the Figure 1 and Figure 2 were calculated employing the average of grades for ocular lesions described in Code of Federal Regulation³.

DISCUSSION

The development of *in vitro* assays falls into 2 major categories: screens and replacements, whose demand of information is usually considerably more relevant. The informational demands are usually less for an assay used as a screen than for a replacement⁶.

This work defends both of them according to different steps of its development. After the introduction of a screening step, a validation program, demanding even a higher number of animals, must be started, in case the replacement of methods is desirable. We can also consider that even if some researches have compared the result of the average Draize score, it is very interesting to evaluate score irritation responses for each area of the eye separately, as an independent observation^{7,9}. Figure 2 demonstrates that it is really interesting to isolate each reaction and Figure 1 also helps to confirm the importance of testing the

non diluted shampoos, when in animal assay⁵. The cornea of the rabbits, which constitutes a protective barrier for the internal structures, suffered the most serious damage, mainly in situations of “pannus” and opacity. Comparing this reaction with the lysis of NCTC clone 929 lineage, one of the advantages of working with a *in vitro* system becomes clear.

The evaluation of the results obtained (Tables 1 and 2) enables us to verify the higher sensibility of the *in vitro* test, which induces us to valorize the parallel between the test of the non-diluted samples using animals and the diluted ones, using cells. Thus we may consider a correlation, represented by a dilution index of 1% or 0.1%. We can conclude that it is possible to apply the *in vitro* test instead of the *in vivo* one, after a careful validation, facing the different characteristics of the systems.

RIALA6/957

Azevedo, J. C. de; Cruz, A. S. e Pinto, T. de J. A. - Proposta de método alternativo *in vitro* para avaliação da segurança de shampoos. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 62(3): 189 - 193, 2003.

RESUMO. Embora os testes empregando animais sejam os preconizados para a avaliação da segurança de xampus, tem-se buscado sua substituição por métodos *in vitro*. Este trabalho descreve a avaliação da segurança de amostras de xampus de uso infantil e adulto, diluídos e não diluídos, por meio de método alternativo empregando a linhagem celular NCTC clone 929. Os xampus de uso adulto promoveram irritação quando testados sem diluição, sendo que somente um lote ainda se mostrou irritante quando testado diluído a 25%. Verificou-se perfeita correlação entre os resultados obtidos pelos métodos *in vivo* e *in vitro* para amostras não diluídas e quando diluídas a 0,1%. Dos diferentes tipos de xampus de uso infantil, apenas uma amostra apresentou irritação quando empregada metodologia *in vivo*. Ao avaliar estas mesmas amostras pelo método *in vitro*, observou-se ausência de citotoxicidade, para todas as amostras, a partir das diluições a 1% do produto. Portanto, para utilização da metodologia *in vitro* como alternativa à metodologia *in vivo*, faz-se necessário criteriosa validação considerando a necessidade de diluição do produto.

PALAVRAS –CHAVE. irritação ocular, cultura celular, citotoxicidade, Draize

REFERENCES

1. Bagley, D.M. et al. An evaluation of five alternatives *in vitro* to the rabbit eye irritation test *in vivo*. **Toxicol. in Vitro**, 6: 275-284, 1992.
2. Buehler, E.V.; Newmann, E. A., A comparison of eye irritation in monkeys and rabbits. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, 6: 701-710 1964.
3. Code of Federal Regulation Title 16, part 1500.42 US Government Printing Office, Washington D.C., 1986.
4. Draize, J. H.; Woodward, G.; Calvery, H. O. Methods for the study of irritation and toxicity substances applied topically to the skin and mucous membranes. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 82: 377-390, 1944.
5. Earl, L.K.; Dickens, A.D.; Rowson, M.J. A critical analysis of the rabbit eye irritation test variability and its impact on the validation of alternative methods. **Toxicol. in Vitro**, 11: 295-304, 1997.
6. Green, S. et al. Criteria for *in vitro* alternatives for the eye irritation test. **Fd. Chem. Toxicol.**, 31: 81-85, 1993.
7. Gupta, K.C. et al. An eye irritation test protocol and an evaluation and classification system. **Fd. Chem. Toxicol.**, 2: 117-121, 1993.
8. Kaweit, S. et al. A national validation project of alternative methods to the Draize rabbit eye test. **Toxicol. in Vitro**, 4: 702-706, 1990.
9. Lovell, D.P. Principal component analysis of Draize eye irritation tissue scores from 72 samples of 55 chemicals in the ECETOC data bank. **Toxicol. in Vitro**, 10: 609-618, 1996.
10. United States Pharmacopeia. 26. ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2003. p. 2026-2028.

Recebido em 20/03/2003; Aprovado em 08/10/2003



A melancia como fonte de licopeno

Watermelon as source of lycopene

Patrícia Y. NIIZU¹
Delia B. RODRIGUEZ-AMAYA^{1*}

RIALA6/958

Niizu, P. Y. e Rodriguez-Amaya, D. B. - A melancia como fonte de licopeno - **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 62(3): 195-199, 2003.

RESUMO. Este trabalho teve como objetivo a quantificação dos principais carotenóides da melancia, variedade Crimson Sweet, produzida nos estados de São Paulo e Goiás. As amostras foram colhidas durante o ano da Central de Abastecimento (CEASA) de Campinas, em um total de cinco frutas analisadas individualmente para cada região. As análises foram realizadas em duplicata, consistindo-se na extração com acetona, partição para éter de petróleo e quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com uma coluna C₁₈, Spherisorb ODS2, 3 µm, 4,6 mm x 150 mm, usando eluição isocrática em fase móvel de acetonitrila contendo 0,05% de trietilamina:metanol:acetato de etila (60:20:20), com uma vazão de 0,8 mL/min, utilizando padronização externa. Os cromatogramas demonstraram que a melancia contém quase exclusivamente licopeno, com uma pequena quantidade de β-caroteno. Os teores (µg/g) de licopeno e β-caroteno foram, respectivamente, de 36 ± 5 e 4,7 ± 2,4 para as frutas de São Paulo e de 35 ± 2 e 2,6 ± 1,7 para as de Goiás. As concentrações destes dois carotenóides são semelhantes às encontradas em tomate cultivar Carmen (35 ± 10 µg/g para licopeno e 3,2 ± 0,6 µg/g para β-caroteno), evidenciando a melancia como uma importante fonte de licopeno. As diferenças em termos do local de produção não foram significativas.

PALAVRAS-CHAVE. carotenóides; licopeno; melancia; análise; CLAE.

¹Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos
Universidade Estadual de Campinas, C.P. 6121
13083-970 Campinas, SP, Brasil

* Endereço para correspondência: FAX (55) -19-3788-2153
e-mail: delia@fea.unicamp.br

INTRODUÇÃO

O consumo de frutas e vegetais tem sido fortemente relacionado com a diminuição do risco de doenças degenerativas e vem sendo recomendado por programas governamentais e não governamentais.

Entre os possíveis fitoquímicos presentes associados a essa proteção estão os carotenóides. Estudos vêm demonstrando a relação dos carotenóides com o fortalecimento do sistema imunológico e com a diminuição do risco de doenças como certos tipos de câncer, doenças cardiovasculares, degeneração macular e catarata^{1,7,10,13}. Dentre os carotenóides, o licopeno vem ganhando destaque devido à sua alta eficiência como antioxidante natural⁴ e sua possível ação contra doenças degenerativas^{3,5,16,21,25}, as evidências sendo mais fortes para câncer de próstata, estômago e pulmão⁵. A fonte de licopeno mais investigada atualmente é o tomate^{5,11,16,23}, mas a busca de outras fontes ocorre em vários países. O licopeno é encontrado também em goiaba vermelha (*Psidium guajava*)^{15,18}, mamão vermelho (*Carica papaya*)⁹ e pitanga (*Eugenia uniflora*)². A melancia (*Citrullus lanatus*) também deve a sua cor ao licopeno e, apesar de consumida largamente no mundo todo, tem sido pouco estudada. Segundo o Programa de Desenvolvimento da Fruticultura¹⁹ (Profruta) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, em 2002, a produção mundial anual de melancia foi de 51.657.568 ton. e a brasileira de 833.666 ton.

O presente trabalho teve como objetivo quantificar os carotenóides majoritários (licopeno e β -caroteno) presentes na melancia, comparando-se frutas de dois estados de grande produção brasileira, São Paulo e Goiás, segundo a Companhia de Entrepósitos e Armazéns Gerais de São Paulo (CEAGESP). Como objeto de estudo foi escolhido o cultivar Crimson Sweet, por ser o mais produzido no Brasil²⁰.

MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de melancia (*Citrullus lanatus*) cultivar Crimson Sweet foram coletadas em diferentes épocas durante o ano de 2002, diretamente da Central de Abastecimento (CEASA) de Campinas. Foi analisado para cada procedência um total de cinco frutas maduras escolhidas aleatoriamente de grandes lotes e analisadas individualmente em duplicata. O cultivar Crimson Sweet caracteriza-se por ser uma melancia de coloração verde claro, com listras verde escuro no sentido longitudinal, com formato redondo ovalado de 30-40 cm de comprimento, de 25-35 cm de diâmetro e peso variando de 11 a 14 kg.

O fruto foi quarteado no sentido longitudinal e duas partes opostas foram homogeneizadas em multiprocessador durante 15 segundos, após a remoção da casca e sementes. Amostras de 2,0 a 2,6 g da polpa homogeneizada foram retiradas para análise imediata.

A composição de carotenóides foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando uma metodologia adaptada de Kimura e Rodriguez-Amaya⁸ que

envolve o isolamento por coluna aberta e quantificação dos padrões por espectrofotometria UV/Visível e análise quantitativa das amostras por CLAE, utilizando padronização externa.

A obtenção dos padrões⁸ consistiu em extração de polpa de melancia com acetona gelada, partição para éter de petróleo, e evaporação em evaporador rotativo. Os carotenóides licopeno e β -caroteno foram isolados em coluna aberta recheada com MgO:Hiflosupercel (1:2), desenvolvida com éter de petróleo contendo porcentagens crescentes de éter etílico (até 8%) e acetona (até aproximadamente 20%). A pureza foi verificada por CLAE e variou de 95 a 98% para o licopeno e de 94 a 96% para o β -caroteno. As concentrações da solução padrão foram corrigidas pelas porcentagens de pureza. A quantificação dos padrões foi realizada com espectrofotômetro UV/Vis.

A extração das amostras foi realizada com acetona gelada, partição para éter de petróleo, concentração em evaporador rotativo seguida por evaporação total utilizando nitrogênio. A etapa de saponificação não foi necessária, uma vez que os principais carotenóides não eram hidróxicarotenóides esterificados. Imediatamente antes da injeção no cromatógrafo, as amostras foram dissolvidas em acetona grau HPLC e filtradas.

A identificação dos carotenóides foi realizada de acordo com Rodriguez-Amaya²², utilizando em conjunto o tempo de retenção, co-cromatografia com carotenóide autêntico, espectro de absorção UV/Visível ($\lambda_{\text{máx}}$ e estrutura espectral fina) obtido com espectrofotômetro (Beckman DU 640) e com detector de arranjo de diodos. A estrutura espectral fina é dada pelo cálculo da razão III/II multiplicada por 100, onde III é a altura do pico correspondente ao maior comprimento de onda e II à do comprimento de onda intermediário, definindo-se o mínimo entre os dois picos como linha de base.

Para a quantificação dos carotenóides por padronização externa, a curva de calibração foi construída com cinco pontos em triplicata e a faixa de concentração utilizada foi de 14 a 65 $\mu\text{g/g}$ para o licopeno e de 3,7 a 8,1 $\mu\text{g/g}$ para o β -caroteno.

O sistema cromatográfico era composto por um módulo de separação Waters (modelo 2690), controlado por um software Millennium (versão 2010). A detecção foi realizada em comprimento de absorção máxima (max plot). A cromatografia de fase reversa ocorreu em uma coluna monomérica C₁₈ (Spherisorb ODS2, 3 μm , 4,6 x 150 mm). A eluição foi isocrática com a fase móvel composta por acetonitrila contendo 0,05% de trietilamina, metanol e acetato de etila na proporção de 60:20:20, com vazão de 0,8 mL/min.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 apresenta um cromatograma típico dos carotenóides da melancia cultivar Crimson Sweet, demonstrando a predominância do licopeno (ψ, ψ -caroteno). Este carotenóide foi identificado pelo seu espectro de absorção na região visível ($\lambda_{\text{máx}}$ a 442, 468, 500 nm em éter de petróleo e a 446, 473, 504 nm na fase móvel; estrutura espectral % III/II = 65), em acordo com um cromóforo de 11 duplas ligações conjugadas, todas na cadeia

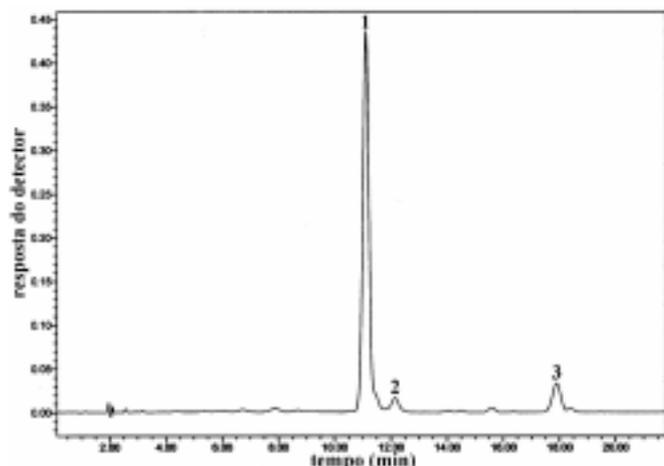


Figura 1. Cromatograma característico dos carotenóides de melancia (*Citrullus lanatus*) Cv. Crimson Sweet. Condições cromatográficas: coluna C₁₈, Spherisorb ODS2, 3 µm, 4,6 x 150 mm; fase móvel: acetonitrila contendo 0,05% de trietilamina, metanol e acetato de etila (60:20:20); vazão: 0,8 mL/min; detector de arranjo de diodos. Identificação dos picos: 1. *trans*-licopeno; 2. *cis*-licopeno; 3. β-caroteno.

poliênica. A ausência de grupos funcionais foi demonstrada pelo comportamento cromatográfico ($t_R = 10,9$ min.). O β-caroteno (β,β-caroteno) em éter de petróleo apresentou λ_{max} a 448 e 476 nm com um ombro a 424 nm, e na fase móvel a 454 e 480 nm, com ombro a 428 nm, tendo pouca estrutura espectral (% III/II = 25), refletindo um cromóforo de 11 duplas conjugadas também, entretanto, com duas duplas em anéis β. O tempo de retenção ($t_R = 17,9$ min.) indica a ausência de substituintes.

A Tabela 1 mostra os resultados obtidos na quantificação de licopeno e β-caroteno. A análise de variância (ANOVA) demonstrou que os resultados obtidos não diferem significativamente ao nível de significância de 5 % entre as duas regiões.

Perkins-Veazie et al.¹⁷, determinou espectrofotometricamente os teores de licopeno em 11 cultivares

Tabela 2. Outras fontes brasileiras de licopeno

Fonte	Cultivar	Origem da amostra	Licopeno (µg/g)	Referência
GOIABA (<i>Psidium guajava</i>)	IAC-4	São Paulo	53 ± 6	15
	Paluma	São Paulo	69 ± 5	18
	Ogawa	São Paulo	58 ± 9	18
MAMÃO (<i>Carica papaya</i>)	Solo	Bahia	21 ± 16	9
	Formosa	Bahia	26 ± 3	9
	Tailândia	Bahia	40 ± 6	9
PITANGA (<i>Eugenia uniflora</i>)		Pernambuco	73 ± 1	2
TOMATE (<i>Lycopersicon esculentum</i>)	Santa Cruz	São Paulo	31 ± 20	26
	Carmen	São Paulo	35 ± 10	12

Tabela 1. Concentrações dos carotenóides principais em melancias (*Citrullus lanatus*), Cv. Crimson Sweet, provenientes de duas regiões brasileiras

Procedência	Licopeno (µg/g)	β-caroteno (µg/g)
	de polpa)	de polpa)
São Paulo	36 ± 5 a	4,7 ± 2,4 a
Goiás	35 ± 2 a	2,6 ± 1,7 a

Letras iguais em uma mesma coluna indicam que não houve diferença estatística significativa entre as médias ao nível de significância de 5%.

de melancia, obtendo valores de 36 a 71 µg/g. O menor valor encontrado foi no cultivar Crimson sweet (36 ± 2 µg/g), nível muito similar ao encontrado no presente trabalho. Pelos relatos de maiores teores de licopeno em outras variedades de melancia, deve ser considerada no Brasil a produção de cultivares com maiores teores.

Outros trabalhos também relataram o teor de licopeno em melancia, entretanto, sem especificação dos cultivares: Holden et al.^{6,27} (49 µg/g); O'Neill et al.¹⁴ (38 µg/g) e Setiawan et al.²⁴ (114 µg/g). Este último valor, porém, pode ter sido uma superestimação uma vez que estes autores acharam este carotenóide em frutas, como abacaxi, onde jamais foi encontrado.

Uma vez que é consumida no mundo todo e praticamente durante o ano inteiro, a melancia torna-se uma fonte importante de licopeno. Para fins comparativos, outras fontes brasileiras de licopeno encontram-se na Tabela 2. O conteúdo de licopeno encontrado na melancia cultivar Crimson Sweet é menor do que na goiaba (*Psidium guajava*) e pitanga (*Eugenia uniflora*), maior do que no mamão (*Carica papaya*), e equivalente ao do tomate (*Lycopersicon esculentum*).

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao PRONEX/CNPq nº 662307/1996-8 pelo apoio financeiro.

Niizu, P. Y. e Rodriguez-Amaya, D. B. - Watermelon as source of lycopene - **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 62(3): 195 - 199, 2003.

ABSTRACT. This work had the objective of quantifying the principal carotenoids of the watermelon, cultivar Crimson Sweet, obtained from two producing states: São Paulo and Goiás. The samples were purchased during the year from the Central Distribution Center (CEASA) of Campinas, totalling five fruits analysed individually for each region. The analyses, carried out in duplicate, consisted of extraction with acetone, partition to petroleum ether and quantification by high performance liquid chromatography (HPLC) (C₁₈ column, Spherisorb ODS2, 3 µm, 4.6 mm x 150 mm; isocratic elution, mobile phase of acetonitrile containing 0.05% triethylamine:methanol:ethyl acetate (60:20:20); flow rate of 0.8 mL/min), using external standardization. The HPLC chromatogram revealed that the watermelon analyzed contained almost exclusively lycopene, with a small amount of β-carotene. The lycopene and β-carotene contents (µg/g) were, respectively, 36 ± 5 and 4.7 ± 2.4 for the fruits from São Paulo, and 35 ± 2 and 2.6 ± 1.7 for those from Goiás. The concentrations of these two carotenoids resembled those found in tomato, cultivar Carmen (35 ± 10 µg/g for lycopene and 3.2 ± 0.6 µg/g for β-carotene), showing watermelon to be an important source of lycopene. The difference in terms of place of production was not significant.

KEY WORDS. carotenoids; lycopene; watermelon; analysis; HPLC

REFERÊNCIAS

1. Astorg, P. Food carotenoids and cancer prevention: an overview of current research. **Trends Food Sci. Tech.**, 8: 406-413, 1997.
2. Cavalcante, M.L.; Rodriguez-Amaya, D.B. Carotenoid composition of the tropical fruits *Eugenia uniflora* and *Malpighia glabra*. In: Charalambous, G. editor. **Food Science and Human Nutrition**. Amsterdam: Elsevier Science Publishers; 1992. p. 643-650.
3. Clinton, S.K. Lycopene: chemistry, biology, and implications for human health and disease. **Nutr. Rev.**, 56: 35-51, 1998.
4. Di Mascio, P.; Kaiser, S.; Sies, H. Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. **Arch. Biochem. Biophys.**, 274(2): 532-538, 1989.
5. Giovannucci, E. Tomatoes, tomato-based products, lycopene, and cancer: review of the epidemiologic literature. **J. Natl. Cancer Inst.**, 91: 317-331, 1999.
6. Holden, J.M. et al. Carotenoid content of U.S. foods: an update of the database. **J. Food Comp. Anal.** 12: 169-196, 1999.
7. Hughes, D.A. Dietary carotenoids and human immune function. **Nutrition**, 17: 823-827, 2001.
8. Kimura, M.; Rodriguez-Amaya, D. B. A scheme for obtaining standards and HPLC quantification of leafy vegetable carotenoids. **Food Chem.**, 78 (3): 389-398, 2002.
9. 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: 415-418, 1991.
10. Krinsky, N.I. Carotenoids as antioxidants. **Nutrition**, 17: 815-817, 2001.
11. Le Maguer, M.; Shi, J. Lycopene in tomatoes: chemical and physical properties affected by food processing. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, 40(1): 1-42, 2000.
12. Niizu, P.Y.; Rodriguez-Amaya, D.B. (resultados ainda não publicados)
13. Olson, J.A. Carotenoids and human health. **Arch. Latinoam. Nutr.**, 49(1): 7S-11S, 1999.
14. O'Neill, M. E. et al. A European carotenoid database to assess carotenoid intakes and its use in a five-country comparative study. **Brit. J. Nutr.**, 85: 499-507, 2001.
15. Padula, M.; Rodriguez-Amaya, D. B. Characterisation of the carotenoids and assessment of the vitamin A value of Brazilian guava. **Food Chem.**, 20: 11-19, 1986.
16. Paetau, I. et al. Chronic ingestion of lycopene-rich tomato or lycopene supplements significantly increases plasma concentrations of lycopene and related tomato carotenoids in humans. **Am. J. Clin. Nutr.**, 68: 1187-1195, 1998.
17. Perkins-Veazie, P. et al. Lycopene content differs among red-fleshed watermelon cultivars. **J. Sci. Food. Agric.**, 81: 983-987, 2001.
18. Porcu, O.M.; Rodriguez-Amaya, D.B. Goiaba (*in natura*) e produtos processados como fonte de licopeno. Resumo apresentado no **5º Encontro de Química dos Alimentos**, Porto, Portugal, 2001.
19. Programa de Desenvolvimento da Fruticultura. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, [http://www.agricultura.gov.br/sarc/profruta/html/mercadocap4a.htm]. 21 junho 2003.

20. Queiróz, M.A. et al. Recursos genéticos e melhoramento de melancia no nordeste brasileiro. **Embrapa**, [http://www.cpatsa.embrapa.br/livrorg/melancia.doc]. 7 abril 2003.
21. Rao, A.V.; Agarwal, S. Role of lycopeno as antioxidant carotenoid in the prevention of chronic diseases: a review. **Nutr. Res.**, 19: 305-323, 1999.
22. Rodriguez-Amaya, D.B. **A guide to carotenoid analysis in foods**. Washington DC: ILSI Press. 1999. 64 p.
23. Sanjiv, A; Rao, A.V. Tomato lycopeno and its role in human health and chronic diseases. **Can. Med. Assoc. J.**, 163: 739-744, 2000.
24. Setiawan, B. et al. Carotenoid content of selected Indonesian fruits. **J. Food Comp. Anal.**, 14: 169–176, 2001.
25. Stahl, W.; Sies, H. Perspectives in biochemistry and biophysics. Lycopeno: a biologically important carotenoid for humans? **Arch. Biochem. Biophysics**, 336: 1-9, 1996.
26. Tavares, C.A.; Rodriguez-Amaya, D.B. Carotenoid composition of Brazilian tomatoes and tomato products. **Lebens Wissen Technol.**, 27: 219-224, 1994.
27. USDA-NCC. Carotenoid database for US foods 1998 [on line]. **USDA**, [www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/]. 21 abril 2003.

Recebido em 08/05/2003 ; Aprovado em 08/10/2003



Febre amarela silvestre no estado de São Paulo, Brasil: casos humanos autóctones

Jungle yellow fever in São Paulo state, Brazil: human autochthonous cases

Iray M. ROCCO^{1*}
Gizelda KATZ²
Rosa M. TUBAKI³.

RIALA6/959

Rocco, I. M.; Katz, G. e Tubaki, R. M - Febre amarela silvestre no estado de São Paulo, Brasil: casos humanos autóctones. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 62(3): 201 - 206, 2003.

RESUMO. Os autores relatam a ocorrência e os dados resultantes das investigações de casos humanos de Febre Amarela (FA) silvestre no estado de São Paulo. Em 2000, 7 casos suspeitos de FA silvestre foram confirmados, 5 importados de outros Estados e 2 provavelmente autóctones, de áreas localizadas às margens do Rio Grande, à noroeste do estado de São Paulo. Quatro deles evoluíram para óbito. Inquérito sorológico foi realizado em 630 habitantes de 13 municípios ribeirinhos e pesquisa entomológica foi feita nas áreas suspeitas de transmissão autóctone. A confirmação desses casos foi feita por testes sorológicos clássicos, isolamento de vírus e técnicas moleculares. As 7 amostras de soros resultaram positivas em pelo menos uma das técnicas empregadas. Todas as amostras foram reagentes no teste de MAC-ELISA. Obteve-se isolamento de vírus a partir de amostras de soros de 4 pacientes e nenhum isolamento de mosquitos. O inquérito sorológico com 630 soros, mostrou 5,23% de prevalência de anticorpos para o vírus FA. A detecção de 2 casos autóctones no estado de São Paulo confirma a tendência de deslocamento da transmissão da Febre Amarela para o Sul do Brasil. A presença de anticorpos para FA em população de áreas sem transmissão recente, revela risco de reurbanização da doença.

PALAVRAS-CHAVE. flavivirus, Febre Amarela silvestre; casos humanos; investigação eco-epidemiológica

¹ e demais autores: Akemi SUZUKI; Terezinha Lisieux M. COIMBRA; Ivani B. FERREIRA; Adélia H. N. KAWAMOTO; Esther L. B. CHAMELET; Cecília L. S. SANTOS; Luiz E. PEREIRA; Antonia . MARTI; Sandra R. MAYER; Dulce M. SOUZA; Danya M. FIALHO; Raimundo N. SANTOS; Renato P. SOUZA e Luiza T. M. de SOUZA, Serviço de Virologia, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo.

² e demais autores: Ciléia H. TENGAN e Márcia R. BUZZAR, Centro de Vigilância Epidemiológica Prof. Alexandre Vranjac, São Paulo e Márcia C. F. PRADO REINA, Vigilância Epidemiológica de São José do Rio Preto.

³ Superintendência de Controle de Endemias - SUCEN, São Paulo e Rubens CARDOSO JR, SUCEN de São José do Rio Preto.

*Endereço para correspondência: Iray Maria Rocco, Instituto Adolfo Lutz, Serviço de Virologia, Av. Dr. Arnaldo 355, São Paulo, CEP: 01246-902, Tel: (11) 3068-2902, e-mail: imrocco@uol.com.br

INTRODUÇÃO

A Febre Amarela (FA) é uma doença aguda causada pelo arbovírus de mesmo nome que é protótipo do Gênero *Flavivirus*, Família *Flaviviridae*. A doença é conhecida desde o século XVII e até hoje causa epidemias na África e Américas, com alta taxa de morbidade e de letalidade na população humana. Existem dois padrões epidemiológicos de transmissão da doença: urbano e silvestre. Sob o ponto de vista clínico, etiológico, imunológico e histopatológico ambas as formas são idênticas. Nas Américas, o ciclo de manutenção da FA silvestre envolve mosquitos dos gêneros *Haemagogus* e *Sabethes* como vetores-reservatórios, primatas não humanos dos gêneros *Alouatta*, *Cebus*, *Ateles* e *Callithrix*, como hospedeiros naturais e o homem é hospedeiro acidental¹³. A FA urbana tem como vetor o mosquito *Aedes aegypti* e o homem é o principal hospedeiro. A incidência da FA é maior nos meses de chuvas e de temperaturas mais elevadas, quando as condições ambientais favorecem maior proliferação e atividade dos vetores¹³.

Os países da América do Sul que relatam casos de FA periodicamente são: Brasil, Bolívia, Colômbia, Equador e Peru⁷. O Brasil tem uma extensa área ocidental onde a FA silvestre é enzoótica (Acre, Amazonas, Amapá, Roraima, Rondônia, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Tocantins, Goiás, Distrito Federal, Maranhão e Pará) e uma área costeira, indene, nos estados das regiões Nordeste, Sudeste e Sul⁷. No limite entre essas duas áreas, está localizada a área de transição ou epizootica que abrange parte dos estados de Piauí, Bahia, Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul⁷. A forma urbana da doença não é registrada no país desde 1942. A FA silvestre ocorre anualmente, como casos esporádicos ou surtos, em florestas ou em zonas rurais da Amazonia, região Centro-Oeste, Maranhão e Minas Gerais^{4,15,17,18,19}. Desde 1998 tem-se observado uma tendência de expansão nas áreas de transição da FA silvestre, com aumento gradual da notificação de casos e epizotias como verificado em Minas Gerais em 2001⁴ e no Rio Grande do Sul em 2000⁸, respectivamente.

Em 2000, foram notificados 7 casos no estado de São Paulo, sendo 5 importados de outras regiões do país e 2 provavelmente autóctones. Estes últimos ocorreram no extremo noroeste do estado, em municípios próximos, localizados às margens do Rio Grande (Santa Albertina e Ouroeste). Não havia, no estado, registro de transmissão recente de FA. Os últimos casos autóctones de FA silvestre datavam de 1953 sendo, desde então, detectados apenas alguns casos esporádicos, importados de regiões enzoóticas^{3,14}.

A partir da confirmação laboratorial dos prováveis casos autóctones, técnicos da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, realizaram uma investigação eco-epidemiológica naquela região. A população ribeirinha de áreas adjacentes aos locais prováveis de infecção recebeu a vacina anti-amarilica, como medida de prevenção.

Os autores relatam a ocorrência de casos humanos de FA silvestre, detectados no estado de São Paulo, importados e/

ou autóctones, e os dados resultantes das investigações.

MATERIAL E MÉTODOS

Investigação epidemiológica

Técnicos da Vigilância Epidemiológica investigaram o local provável de infecção dos dois casos suspeitos de autoctonia; verificou-se que, nos dois casos, havia relatos de pescaria às margens do Rio Grande. Com base no diagnóstico epidemiológico, foi elaborado um estudo em 13 municípios localizados às margens do Rio Grande (Cardoso, Icem, Indiaporã, Mesópolis, Mira Estrela, Orindiuva, Ouroeste, Paulo de Faria, Populina, Santa Albertina, Santa Clara D'Oeste, Santa Rita D'Oeste e Rubinéia), constituído de entrevistas e coleta de amostras de sangue, precedendo a vacinação anti-amarilica.

Investigação entomológica e primatológica

Após a confirmação do primeiro caso, foram realizadas 3 viagens de campo com o objetivo de coletar mosquitos para verificar a possível circulação do vírus amarílico na área. As capturas de mosquitos foram realizadas no município de Santa Albertina, às margens do Rio Grande, em ambiente de mata residual, durante as horas mais luminosas do dia, das 10 às 15 horas, por técnicos previamente imunizados contra Febre Amarela. Realizou-se captura com puçá e aspirador bucal em plataforma construída na copa de uma árvore, a aproximadamente 5 metros de altura. Coletou-se mosquitos em grande extensão do interior da mata; com capturas de 5 minutos, em intervalos de aproximadamente 5 metros entre um ponto e outro. Em alguns pontos determinados no interior e na margem da mata empregou-se armadilhas tipo CDC-miniatura, iscadas com gelo seco.

Os mosquitos capturados foram anestesiados com gás carbônico proveniente do gelo seco, congelados em nitrogênio líquido e levados para o laboratório, onde foram conservados em congeladores a - 70°C. A identificação dos mosquitos foi realizada em superfície congelada, até o nível de espécie ou de gênero. Foram constituídos lotes de exemplares de mesma espécie e processados para isolamento de vírus. Com relação a primatas, moradores da região relataram que havia macacos residentes na mata, os quais costumemente aproximavam-se da sede da fazenda à procura de alimentos. Entretanto, relataram também que, pela frequência desses animais nos arredores da sede, aparentemente a população havia sofrido uma redução, embora não tivessem observado exemplares mortos ou doentes na mata. Não foi possível realizar capturas de macacos para obtenção de amostras de sangue para análise laboratorial.

Investigação laboratorial:

Amostras de sangue e/ou soro de todos os pacientes com clínica compatível com FA, fragmentos de vísceras de dois pacientes que foram a óbito e mosquitos coletados no campo, foram armazenados e transportados em balão de nitrogênio até o laboratório. Para o inquérito soropidemiológico foram feitas entrevistas e obtidos o consentimento livre e esclarecido para

as análises de 630 amostras de sangue de ribeirinhos, supostamente não imunizados contra a FA, procedentes de 13 municípios previamente selecionados.

Isolamento de vírus em camundongos

Para o isolamento de vírus em camundongo foram utilizadas amostras de sangue e/ou soro, fragmentos de vísceras e mosquitos. As amostras de sangue e soro foram inoculadas puras e diluídas (1:2 em solução fosfatada tamponada, pH 7.2, com albumina bovina - SIGMA, St. Louis, MO, USA) 0,75% e antibióticos: 100 IU de penicilina 100 µg/ml de estreptomicina (GIBCO, Grand Island, NY, USA). Fragmentos de vísceras, de aproximadamente 1 cm, foram triturados com pó de vidro em 1,8 ml do mesmo diluente descrito anteriormente e centrifugados a 800 x g por 10 minutos, em centrífuga refrigerada. Lotes de mosquitos, separados por espécie, foram triturados em tampão fosfato com 1,8% de albumina bovina, estreptomicina-penicilina, nos seguintes volumes: de 1 a 10 mosquitos, usou-se 1 ml de diluente; de 11 a 20, 1,5 ml; de 21 a 30, 2 ml; de 31 a 40, 2,5 ml e acima de 41, 3,0 ml. A seguir as suspensões foram centrifugadas a 11.000 x g por 30 minutos, em centrífuga refrigerada. Os sobrenadantes foram inoculados, via intracerebral, em lotes de seis camundongos *Swiss* lactentes, em doses de 20µl. Os animais foram observados diariamente, por período de 21 dias. Realizou-se passagens seriadas de cérebros de camundongos que apresentaram sinais de doença até se obter o isolamento do vírus. As cepas isoladas foram identificadas por meio de testes de Fixação de Complemento (FC), segundo Fulton e Dumbell⁶ e Neutralização (N), segundo Shope e Sather¹⁶.

Isolamento de vírus em Cultura de Células

Alíquotas de 20µl de soros de fase aguda e de suspensões, preparadas a partir de vísceras e de lotes de mosquitos (as mesmas utilizadas para inoculação em camundongos), foram inoculados em cultura de células de mosquito *Aedes albopictus*, clone C6/36. Essa linhagem foi cultivada, 24 horas antes a 28°C, em tubos de ensaio com 1 ml de meio Leibovitz (L-15, GIBCO), suplementado com 1% de aminoácidos não essenciais, 10% de triptose fosfato e 10% de soro bovino fetal e antibióticos. No dia da inoculação foi acrescentado em cada tubo 1 ml do meio Leibovitz sem soro bovino fetal. Os tubos foram imediatamente incubados a 28°C. Após 10 dias foram centrifugados e os sobrenadantes separados e guardados em tubos de hemólise a -70°C. As células nos tubos foram ressuscitadas em 0,5 ml de PBS, pH 7.5, depositadas em lâminas próprias, contendo 16 orifícios paralelos e após secagem a temperatura ambiente foram fixadas às lâminas em acetona P.A. a -20°C por 10 minutos. As lâminas foram então submetidas a testes de Imunofluorescência Indireta, utilizando-se fluido ascítico de camundongo imune para flavivírus, incubadas em câmara úmida a 37°C por 30 minutos e lavadas em PBS por 10 minutos. Em seguida foi adicionada anti-gamaglobulina total de camundongo, desenvolvida em cabra, marcada com isotiocianato de fluoresceína (SIGMA), as lâminas

foram novamente incubadas a 37°C por 30 minutos e lavadas com PBS. As lâminas foram fixadas às lâminas com uma gota de glicerina tamponada e a leitura foi realizada em microscópio fluorescente. Os positivos foram tipados em outro teste de imunofluorescência, seguindo o mesmo procedimento descrito anteriormente, utilizando anticorpo monoclonal para o vírus FA, fornecido pelo CDC de Atlanta, GA, USA.

Diagnóstico Molecular

Sobrenadantes de cultura de células C6/36 foram utilizados para análise molecular do genoma viral pela técnica de RT-PCR. O RNA foi extraído pela técnica de Chomczynski e Sacchi¹, processando-se a amplificação após transcrição reversa, utilizando-se iniciadores específicos para a região que codifica a proteína do envelope viral nas posições 625-1312 nucleotídeos¹¹. Os produtos amplificados foram detectados por análise eletroforética em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio.

Imunodiagnóstico

As sete amostras de soros dos pacientes, juntamente com aquelas coletadas de familiares e de comunicantes, foram submetidas ao teste imunoenzimático ELISA para captura de anticorpos da classe IgM (MAC-ELISA)¹², utilizando-se antígeno do vírus FA (BeH111). As 630 amostras coletadas para o inquérito soroepidemiológico foram submetidas ao teste de Inibição da Hemaglutinação (IH), segundo Clarke e Casals², para pesquisa de anticorpos totais, com antígenos de vírus dos seguintes gêneros: *Flavivirus*: Dengue 1 (Hawaii); Dengue 2 (Tr1751); Encefalite St. Louis (SPAn11916); Iguape (SPAn71686); Ilheus (BeH7445); Rocío (SPH34675); YF (BeH111); *Alphavirus*: Encefalite Equina do Leste (SPAn14723); Mucambo (SPAn15600) e *Bunyavirus*: Caraparu (SPAn26550).

RESULTADOS

As amostras biológicas dos 7 casos humanos resultaram positivas para FA, em pelo menos uma das técnicas empregadas (Tabela 1). Obteve-se isolamento de vírus em quatro casos, sem que nenhum efeito citopático fosse observado nas culturas de células. As amostras de soros dos 7 casos foram reagentes no teste de MAC-ELISA, sendo consideradas positivas aquelas que apresentaram densidade óptica superior ao valor de limite de reatividade (>0.200). As amostras coletadas de familiares e comunicantes foram negativas.

As cepas isoladas também apresentaram resultados positivos por PCR, com amplificação de fragmentos de 687 pares de bases. Dentre os 7 casos confirmados, 4 (57,1%) evoluíram para óbito, 100% pertenciam ao sexo masculino, na faixa etária de 20 a 49 anos, 71,4 % dos casos adquiriram a doença em atividade de lazer e 28,6 % em atividade ocupacional. Em relação aos sintomas clínicos, 71,4% apresentaram icterícia, 42,9% insuficiência renal e 28,6% manifestações hemorrágicas.

Tabela 1. Investigação epidemiológica e laboratorial dos 7 casos de Febre Amarela notificados no estado de São Paulo, Brasil.

Paciente	Idade	Sexo	Ocupação	Evolução	Amostra	Isolamento de vírus células camundongo	MAC-ELISA	PCR	FC	N
SPH 188002	36	M	Médico	Cura	Soro/sangue	+	+	+	+	+
SPH 188057	22	M	Comerciante	Cura	Soro/sangue	+	+	+	+	+
SPH 188483	25	M	Estudante	Cura	Soro	Nr	Nr	+	Nr	Nr
SPH 189057	44	M	Comerciante	Óbito	Sangue do coração Vísceras	-	-	+	-	Nr
SPH 189265	38	M	Lavrador	Óbito	Soro	-	-	+	Nr	Nr
SPH 189642	39	M	Lavrador	Óbito	Soro Vísceras	+	+	+	+	Nr
SPH 190388	37	M	Caminhoneiro	Óbito	Soro	+	+	+	+	Nr

SPH - amostra de origem humana (H), isolada no Estado de São Paulo (SP)
Nr - não realizado, + positivo, - negativo

Dentre as 630 amostras processadas pela técnica de IH, foram consideradas positivas aquelas que apresentam títulos de anticorpos inibidores da hemaglutinação maiores que 1/20. Destas 33 (5,23%) foram reagentes, sendo que 27 amostras tiveram resposta heterotípica para flavivírus, enquanto 6 apresentaram anticorpos monotípicos para FA; 3 de Ouroeste e as outras 3, de Mesópolis, Indiaporã, e Rubinéia.

Foram coletados e submetidos à prova de isolamento de vírus 1.110 mosquitos, divididos em 334 lotes. Os mosquitos pertenciam a 10 gêneros distintos: *Haemagogus*, *Sabethes*, *Limatus*, *Aedes*, *Psorophora*, *Runchomyia*, *Culex*, *Anopheles*, *Mansonia* e *Coquillettidia*. As espécies mais abundantes nas coletas foram *Aedes scapularis*, *Haemagogus capricornii* e *Sabethes chloropterus* (Tabela 2).

Embora muitos espécimes do gênero *Haemagogus* (supostos vetores) tenham sido testados, nenhum isolamento de vírus foi obtido a partir dos mosquitos coletados em Santa Albertina, nos meses de março, abril e maio, 2000, período que sucedeu a detecção dos casos da região.

DISCUSSÃO

No período estudado, além dos 7 casos, foram notificados 55 indivíduos com suspeita de infecção por FA no Estado de São Paulo, sem que nenhum deles fosse confirmado. Com relação aos resultados dos testes de IH realizados com os 630 soros, não foi possível, com base nas informações obtidas na investigação epidemiológica, esclarecer a natureza da resposta imune verificada em cada caso. Vários inqueridos não souberam informar com clareza, sobre vacinação anti-amarílica passada e outros relataram deslocamentos para outros Municípios do Estado e de outras Unidades da Federação. Os poucos indivíduos que afirmaram não terem recebido vacina tinham histórico de deslocamento para outras regiões.

Tabela 2. Mosquitos coletados no município de Santa Albertina-SP, nos meses de março, abril e maio de 2000.

Gênero	Espécie	Número	%
<i>Aedes</i>	<i>Ae albopictus</i>	8	0,72
	<i>Ae argyrothorax</i>	2	0,18
	<i>Ae scapularis</i>	763	68,74
	<i>Ae serratus</i>	2	0,18
	<i>Ae sp</i>	4	0,36
<i>Anopheles</i>	<i>An (Nys) galvaoi</i>	1	0,09
	<i>An (Nys) sp</i>	14	1,26
	<i>An (Nys) strodei</i>	2	0,18
	<i>An (Nys) triannulatus</i>	5	0,45
<i>Coquillettidia</i>	<i>Cq venezuelensis</i>	1	0,09
<i>Culex</i>	<i>Cx (Cux) sp</i>	36	3,24
	<i>Cx (Mel) sp</i>	7	0,63
	<i>Cx scimitator affinis</i>	2	0,18
<i>Haemagogus</i>	<i>Hg capricornii</i>	164	14,77
	<i>Hg leucocelaenus</i>	1	0,09
<i>Limatus</i>	<i>Li durhami</i>	6	0,54
<i>Mansonia</i>	<i>Ma (Man) sp</i>	3	0,27
<i>Psorophora</i>	<i>Ps (Jant) sp</i>	4	0,36
	<i>Ps albigena</i>	14	1,26
	<i>Ps ferox</i>	10	0,9
<i>Runchomyia</i>	<i>Runchomyia sp</i>	1	0,09
<i>Sabethes</i>	<i>Sa (Sab) sp</i>	1	0,09
	<i>Sa belisarioi</i>	4	0,36
	<i>Sa chloropterus</i>	55	4,95
Total		1110	99,98

Apesar dos esforços de captura de mosquitos, para detectar a circulação do vírus na área estudada, não se obteve sucesso nas tentativas de isolamento de vírus, embora espécimes pertencentes aos gêneros *Haemagogus* e *Sabethes*, que incluem espécies (*Hg. janthinomys*, *Hg. albomaculatus*, *Hg. leucocelaenus* e *Sa. chloropterus*) conhecidamente vetoras em outras regiões do país tenham sido capturados em números expressivos, atingindo 20,26% do total de mosquitos pesquisados^{5,7,9}.

A circulação do vírus amarílico em áreas endêmicas e o deslocamento rápido e contínuo de pessoas que freqüentam aquelas áreas, com finalidade de trabalho ou de lazer, determinam o aparecimento de casos importados em regiões indenes.

A área com suspeita de transmissão autóctone é classificada, segundo a FUNASA, como área epizootica ou de transição para transmissão de FA. A detecção de dois prováveis casos autóctones na região, a presença de anticorpos para flavivírus em população humana em áreas sem registro de transmissão recente da doença, a distribuição de mosquitos vetores e a ocorrência de primatas não humanos, hospedeiros naturais e amplificadores do vírus amarílico, sugerem a possibilidade de deslocamento do vírus FA com ampliação da área de transição.

O aparecimento de casos humanos sugere a ocorrência de contato de uma população não protegida, com uma circulação viral silenciosa, restrita a ambiente silvestre. São necessários mais estudos que possibilitem a compreensão de fatores que determinam o aparecimento de casos e a expansão da transmissão do vírus para outras áreas, não consideradas enzoóticas. A impossibilidade de se pesquisar primatas não humanos e a não detecção de mosquitos naturalmente infectados inviabilizou a determinação do local de transmissão silvestre.

Há que se considerar ainda o risco de reurbanização da doença, uma vez que, os vetores comprovado e potencial, *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus* respectivamente, encontram-se amplamente disseminados pelo país⁷. As epidemias de Dengue na maioria dos estados refletem a presença maciça do *Aedes aegypti*⁷.

Apesar da disponibilidade de uma vacina com eficácia de 99% e imunidade duradoura (mínimo de 10 anos)⁷, pessoas não imunizadas são atingidas pela virose quando adentram áreas enzoóticas para atividades de trabalho (desmatamentos para abertura de estradas, cultivos, moradia e mineração) ou de lazer (turismo ecológico, caçada ou pescaria). Indivíduos infectados nesses ambientes, podem trazer o vírus para áreas urbanas onde, na presença de altos índices de infestação de vetores, podem desencadear a transmissão da forma urbana da doença. Embora os casos de FA sejam esporádicos, não se deve ignorar o risco de se estabelecer sua reurbanização, com graves conseqüências para a saúde pública. No estado de São Paulo, campanhas de vacinação foram intensificadas no período de 1986 a 2000, em decorrência do registro de casos importados de FA¹⁰. As campanhas foram expandidas para as regiões Norte e Leste do Estado, especialmente em áreas ribeirinhas dos Rios Grande e Paraná. Dada a existência da forma silvestre da doença, que impossibilita a eliminação de vetores, de hospedeiros e, conseqüentemente, do vírus, não se pode admitir um relaxamento nas atividades de vigilância epidemiológica e sanitária; é necessário que as medidas de proteção à população humana sejam uma constante nos programas de saúde pública.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos funcionários das Seções: Vírus Transmitidos por Artrópodos, Culturas Celulares e Biotério, que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Rocco, I. M.; Katz, G. e Tubaki, R. M - Jungle yellow fever in São Paulo state, Brazil: human autochthonous cases. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 62(3): 201 - 206, 2003.

ABSTRACT. The authors relate the occurrence and the results of the investigations of human cases of jungle yellow fever (YF) in São Paulo State. In 2000, 7 suspect cases of YF were confirmed; 5 of them were imported from other States and 2 probably autochthonous, from areas located at the banks of the Grande river, at Northwest of the São Paulo State. Four of them evolved into death. Serological survey was done among 630 inhabitants of 13 riverside Counties and entomological research was performed in the areas in which there was suspicion of autochthonous transmission. The confirmation of these cases was done by serological tests, virus isolation and molecular techniques. The 7 samples resulted positive for YF in at least one of the tests. All the 7 samples were reacted to YF in MAC-ELISA test. The virus was isolated in serum samples of 4 patients and no virus isolation was obtained from mosquitoes. The serological survey showed 5,23% of prevalence of YF antibodies. The detection of two cases of jungle YF in São Paulo State confirm the tendency that the transmission has migrated to the South of Brazil. The presence of antibodies for YF among population in areas where earlier transmission was not reported until now, reveals the risk of the reurbanization of the disease.

KEY WORDS. flavivirus, jungle Yellow Fever; human cases; eco-epidemiological survey

REFERÊNCIAS

1. Chomczynski, P.; Sacchi, N. Single step method of RNA isolation by acid guanidiniumthiocyanate-phenol- chloroform extraction. **Anal. Biochem.**, 162: 156-159, 1987.
2. Clarke, D.H.; Casals, J. Technique for hemagglutination and hemagglutination-inhibition with arthropod-borne viruses. **Am. J. trop. Med. Hyg.**, 7: 561-573, 1958.
3. Coimbra, T.L.M. et al. Investigação epidemiológica de casos de febre amarela na região nordeste do Estado de São Paulo, Brasil. **Rev. Saúde Pública**, 21: 193-199, 1987.
4. Duarte, H.H.P. et al. Yellow fever outbreak in Minas Gerais State, Brazil, 2001. 12th National Meeting of Virology and 4th Mercosul Meeting of Virology. **Virus Reviews and Research**, v. 6, n. 2, suppl. 1, pg 87, 2001.
5. Forattini, OP. **Culicidologia Médica, vol.2: Identificação, Biologia, Epidemiologia** – São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2002.
6. Fulton, F.; Dumbell, K.R. The serological comparison of strains of Influenza virus. **J. gen. Microbiol.**, 3: 97-111, 1949.
7. FUNASA, **Manual de Vigilância Epidemiológica de Febre Amarela**, Ministério da Saúde, Brasília, DF, Fundação Nacional de Saúde, 1999.
8. FUNASA, [<http://www.funasa.gov.br>].
9. Hervé, J-P. et al. A febre amarela silvestre no Brasil e os riscos de propagação urbana. **Hiléia Médica**, 7(1):31-40, 1985.
10. Informe técnico sobre febre amarela – São Paulo, Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo: Centro de Vigilância Epidemiológica Prof. Alexandre Vranjac, 2002.
11. Jennings, A.D. et al. Analysis of a yellow fever virus isolated from a fatal case of vaccine associated human encephalitis. **The Journal of Infectious Diseases**, 169: 512-518, 1994.
12. Kuno, G. et al. Detecting artificial anti-dengue IgM immune complexes using an enzyme-linked immunosorbent assay. **Am. J. trop. Med. Hyg.**, 36: 153-159, 1987.
13. Monath, T.P. Yellow Fever. In: TP. Monath Ed, **The Arboviruses: epidemiology and ecology**, vol. V, Florida: CRC Press, 1989.
14. Nassar, E.S. et al. Jungle Yellow fever: clinical and laboratorial studies emphasizing viremia on an human case. **Rev. Inst. Med. Trop.**, 37(4): 3337-341, 1995.
15. Nobre, A. et al. Febre Amarela e Dengue no Brasil: Epidemiologia e controle. **Rev. Soc. Brasil. Medicina Tropical**, 27: 59-66, 1994.
16. Shope, R.E.; Sather, G.E. Arboviruses. In: **Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infectious**. Lennette, EH & Schimidt NJ., eds. 5ed. Washington, DC, American Public Health Association, 1979, p. 767-814.
17. Vasconcelos, P.C. et al. Yellow fever in Pará State, Amazon Region of Brazil, 1998-1999: Entomologic and Epidemiological findings, **Emerging Infectious Disease** 7 (3): 5465-569, 2001.
18. Vasconcelos, P.F.C. et al. An epidemic of sylvatic yellow fever in the Southeast Region of Maranhão State, Brazil, 1993-1994: Epidemiologic and entomologic findings. **Am. J. trop Med. Hyg.**, 57(2):132-137, 1997.
19. Vasconcelos, P.F.C. et al. Clinical and ecoepidemiological situation of human arboviruses in Brazilian Amazonia. **Ciência e Cultura**, 44(2/3): 117-124, 1992

Recebido em 27/05/2003; Aprovado em 12/11/2003

Estudo comparativo de soluções-tampão para determinação de fluoreto em águas para diálise

Comparative study of buffer solution for determination of fluoride in water used in dialysis

Valéria P. Silva FREITAS^{1*}
Berenice M. BRÍGIDO¹
Maria Irene C. BADOLATO¹
Elaine M. A. MAZON¹
Janete ALABURDA²

RIALA6/960

Freitas, V. P. S. et al. - Estudo comparativo de soluções-tampão para determinação de fluoreto em águas para diálise **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 62(3): 207 - 212, 2003.

RESUMO. As águas utilizadas para diluição de soluções de diálise devem ser praticamente isentas de contaminantes para garantir a segurança do paciente com insuficiência renal. O tratamento da água de abastecimento usada para esta finalidade deve, principalmente, eliminar a maior parte dos íons fluoretos. Estes íons podem causar aos pacientes doenças ósseas do tipo osteomalácia e osteoporose, hipercalemia, entre outras. O método do eletrodo íon seletivo é considerado o mais adequado para a determinação do íon fluoreto em águas de abastecimento, devido a sua alta seletividade, melhor linearidade e menor susceptibilidade a interferentes, quando comparado com o método espectrofotométrico. O presente trabalho teve como objetivo investigar a aplicação deste método para a determinação das concentrações de íons fluoretos em águas para diluição de soluções de diálise. Avaliou-se o uso de seis soluções tampão com composições diferentes para análise de soluções aquosas com concentrações de íons fluoretos de 0 a 2,5 mg/L. Verificou-se que as melhores condições experimentais para o método potenciométrico foram o emprego de solução tampão (TISAB 0), preparada com cloreto de sódio e ácido acético glacial com pH final 5,4 - 5,5 ajustado com hidróxido de sódio, utilizando adição de padrão.

PALAVRAS-CHAVE. fluoreto, determinação, águas diálise, método potenciométrico

¹Instituto Adolfo Lutz – Lab. I de Campinas

²Instituto Adolfo Lutz – Lab. Central – São Paulo

*Endereço para correspondência: Instituto Adolfo Lutz – Lab. I de Campinas – Rua São Carlos, 720

CEP: 13035-420 Campinas –SP Tel: (0XX19) 32727977 Fax: (0XX19) 32731698

E.mail: vpsfreitas@ial.sp.gov.br

INTRODUÇÃO

A água utilizada para diálise, quando inadequadamente tratada, coloca em risco a vida e a segurança do paciente com insuficiência renal. A magnitude dos problemas e riscos envolvidos com este tipo de água, pode ser estimada quando comparada com o padrão estabelecido para a ingestão média de água potável de 2 litros diários ou 14 litros por semana. Pacientes que fazem três sessões de diálise com 4 horas cada, estão expostos a aproximadamente 300 litros de água por semana, correspondendo a uma exposição vinte e cinco vezes maior do que a ingestão diária de água⁴.

Os contaminantes presentes na água de abastecimento podem ter acesso à corrente sanguínea se forem absorvidos pelo trato gastrointestinal. Quando presentes nas águas utilizadas para diluição de diálise, o sangue do paciente está diretamente exposto a estes contaminantes tóxicos, e os pacientes em diálise, por terem função renal diminuída, apresentam uma redução significativa na sua capacidade de excretar substâncias tóxicas através da urina⁴.

O íon fluoreto em concentrações elevadas pode causar ao paciente doenças ósseas do tipo osteomalácia e osteoporose¹⁵, como também hipercalemia¹³. Intoxicação crônica por flúor aumenta a ossificação, hipermineralização, calcificação dos ligamentos, além de induzir osteodistrofia renal. O flúor, através do sangue do paciente, também pode se acumular na cabeça, causando disfunções no sistema nervoso¹⁴.

O método utilizando o eletrodo de íon seletivo é considerado o mais adequado para a determinação do íon fluoreto em águas de abastecimento, devido a sua alta seletividade e melhor linearidade quando comparado com os métodos espectrofotométricos^{5,7,9,10,11}. Para manter a força iônica da solução, descomplexar os íons fluoreto e ajustar o pH da solução, várias formulações de TISAB (total ionic strength adjustment buffer/tampão de ajuste de força iônica total) têm sido propostas, sendo que a escolha depende da concentração de fluoreto e dos íons interferentes^{2,5,8,10,11,12}.

Os centros de diálise utilizam águas provenientes de sistemas de abastecimento público, as quais passam por um processo obrigatório de fluoretação, onde o íon fluoreto deve estar presente em concentrações de 0,6 a 0,8 mg/L¹⁸. Para o uso no tratamento dialítico, estas águas devem ser tratadas por sistemas adequados, restando os íons indesejáveis. A concentração máxima permitida de fluoreto em águas de diálise é de 0,2 mg/L³.

Atualmente, não se tem um método oficial nem um método recomendado para a determinação de íons fluoreto em águas destinadas à diluição de soluções de diálise.

O presente trabalho tem como objetivo realizar um estudo comparativo de soluções-tampão, de composição mais simples e de menor custo, porém com formulações características das soluções-tampão sugeridas para a análise potenciométrica de íons fluoreto em águas destinadas para o consumo humano^{1,7,11}. A partir dos resultados obtidos, pretende-se definir as melhores condições experimentais para o controle de fluoretos em águas

para soluções de diálise a ser implantado pela rede de Laboratórios de Saúde Pública do estado de São Paulo.

MATERIAIS E MÉTODOS

Equipamento

Potenciômetro para determinação de pH/íon seletivo, modelo 710A, marca Orion e eletrodo combinado de íon seletivo para fluoretos, modelo 96-09, marca Orion.

Soluções-padrão

Foram utilizadas amostras soluções-padrão de íon fluoreto em concentrações de 0 a 2,5 mg/L, preparadas a partir de diluições de uma solução estoque de fluoreto de sódio de concentração igual a 1000 mg/L^{1,12}. Todas as soluções foram preparadas com água destilada e desionizada.

Soluções-tampão

As soluções-tampão foram preparadas de acordo com as formulações abaixo, na proporção de 1:1 entre a solução-tampão e solução-problema, exceto para TISAB III-CDTA e EDTA, que foi de 1:10:

- TISAB 0¹¹ (q.s.p. 1 litro): 58g de cloreto de sódio, 57mL de ácido acético glacial, 500mL de água desionizada, 120mL de solução de hidróxido de sódio 5M.

Procedimento: Adicione cloreto de sódio e ácido acético glacial à água desionizada. Lentamente, adicione com agitação, solução de hidróxido de sódio 5M; agite até dissolução dos sais. Após esfriar, meça o pH da solução final, que deverá ser 5,4 - 5,5. Se necessário ajuste o pH com solução de hidróxido de sódio 5M. Complete o volume com água desionizada para 1000 mL.

- TISAB II – CDTA¹¹ (q.s.p. 1 litro): 58g de cloreto de sódio, 57 mL de ácido acético glacial, 500mL de água desionizada, 160mL de solução de hidróxido de sódio 5M, 4g de CDTA (1-1-ciclohexileno-dinitrilo-tetracético).

Procedimento: idem ao anterior, sendo que o CDTA é colocado junto com os sais iniciais, antes da solução de hidróxido de sódio 5M. O pH resultante deverá estar na faixa de 5,0 – 5,5.

- TISAB II – EDTA (q.s.p. 1 litro): 58g de cloreto de sódio, 57mL de ácido acético glacial, 500mL de água desionizada, 160mL de solução de hidróxido de sódio 5M, 4g de EDTA (ácido etileno-dinitro tetracético).

Procedimento: idem ao anterior, substituindo o CDTA pelo EDTA.

- TISAB III – CDTA⁷ (q.s.p. 1 litro): solução de hidróxido de sódio a 40% (m/v), 300g de citrato de sódio dihidratado, 58g de cloreto de sódio, 0,015g de vermelho de cresol, 500mL água desionizada e 18g de CDTA.

Procedimento: Adicione, gota a gota, até dissolução completa dos sais, solução de hidróxido de sódio a 40% (m/v) à água desionizada e CDTA. Acrescentar, sob agitação, citrato de sódio dihidratado, cloreto de sódio e vermelho de cresol. Após dissolução dos sais, completar o volume para 1000 mL com água desionizada. O pH resultante deverá estar na faixa de 6,5 – 7,0.

- TISAB III – EDTA (q.s.p. 1 litro): solução de hidróxido de sódio a 40% (m/v), 300g de citrato de sódio dihidratado, 58g de cloreto de sódio, 0,015g de vermelho de cresol, 300mL de água desionizada e 18g de EDTA.

Procedimento: idem ao interior, substituindo o CDTA pelo EDTA.

- Citrato 0,1M (q.s.p. 1 litro): 22g de ácido cítrico, 400mL de água desionizada, solução de hidróxido de sódio a 50% (m/v). Procedimento: Dissolver o sal com a água desionizada, sob agitação. Ajustar para pH 6,0, adicionando lentamente solução de hidróxido de sódio 50% (m/v). Completar o volume para 1000 mL com água desionizada. Esta solução é estável por apenas 1 semana, conservado em geladeira.

PROCEDIMENTO ANALÍTICO:

1. Curvas de calibração diárias para checagem do eletrodo

1.1. Método 1 – Leitura Direta (calibração interna)

Para obtenção da curva interna do equipamento foram preparadas duas séries de soluções – padrão: 0,03; 0,30; 3,00 mg [F⁻]/L (para o estudo de amostras com baixa concentração de íon fluoreto) e 0,1; 1,0; 10,0 mg[F⁻]/L (para concentrações acima de 0,5mg[F⁻]/L), utilizando-se os tampões estudados. Os procedimentos foram realizados em sala climatizada com ajuste manual da temperatura no equipamento a $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

1.2. Método 2 – Determinação Indireta.

Após checagem da operação do eletrodo¹⁶, coeficiente angular no intervalo de -54 a -60 mV/década de concentração, foram preparadas curvas de calibração com dois intervalos distintos de concentração: 0,02 a 0,1 mg[F⁻]/L e 0,1 a 2,5 mg[F⁻]/L, para cada tampão estudado. As medidas foram obtidas em mV a partir da curva previamente construída (mV versus [F⁻]mg/L). Os procedimentos foram realizados em sala climatizada com ajuste manual da temperatura no equipamento a $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

2. Testes de recuperação

O estudo de recuperação foi realizado em duplicata, com soluções-padrão de 0,035; 0,045; 0,075; 0,35; 0,65; 0,85 e 1,25 mg[F⁻]/L, utilizando-se separadamente todos os tampões. Foram procedidos 05 ensaios independentes a temperatura de 25°C .

3. Análise estatística

A planilha tutorial foi empregada para definição da faixa linear nas curvas de calibração^{6,17}.

Para o estudo do coeficiente angular foi delimitada a faixa de tolerância com intervalo de confiança de 95%. Para o estudo do coeficiente linear foi aplicado a análise dos resíduos¹⁷. Os dados foram analisados usando equação de regressão linear e foram realizados com auxílio do programa Excel.

As soluções de concentrações 0,5; 1,0 e 1,5 mg[F⁻]/L, preparadas a partir de padrão certificado de fluoreto 1000 mg/L, foram utilizadas para avaliar o desempenho das soluções-tampão TISAB 0, TISAB II-EDTA e TISAB II- CDTA para os dois métodos, quanto à precisão (“t” Student).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A medida de fluoreto sofre vários tipos de interferências. Os cátions polivalentes, em especial o alumínio e o ferro, formam complexos com este íon dependendo do pH e da razão entre as concentrações do cátion e do íon fluoreto; hexametáfosfato e ortofosfato também são interferentes. Para a eliminação desse problema, geralmente é indicado o uso de solução tampão contendo CDTA, um componente que complexa esses e outros cátions que possam estar presentes nas amostras⁹.

Para avaliar qual solução tampão seria a mais indicada para a determinação de íons fluoretos em soluções aquosas diluídas de concentrações em torno de 0,2 mg[F⁻]/L, fez-se medidas de soluções-padrão de íons fluoretos nas concentrações entre 0,035 a 1,25 mg[F⁻]/L utilizando-se, separadamente, cada uma das soluções-tampão em avaliação.

As medidas de concentração de íons fluoretos nas soluções-padrão foram realizadas de duas maneiras distintas. Inicialmente, calibrou-se o equipamento, obtendo-se um coeficiente angular em torno de -58 mV/década de concentração a 25°C . A seguir, determinou-se a concentração do íon fluoreto nas soluções-padrão previamente tamponadas (método 1 – determinação direta). O outro modo de medida, determinação indireta em mVolts, consistiu em fazer curvas-padrão (concentração em mg[F⁻]/L versus medidas em mV) utilizando-se diferentes padrões de íons fluoretos, cujo equipamento estava previamente calibrado¹⁶, coeficiente angular no intervalo de -54 a -60 mV/década de concentração. Destas curvas foram determinadas as concentrações de íons fluoretos nas soluções previamente tamponadas (método 2 – determinação indireta).

Estes dois modos diferentes de determinar o íon fluoreto nas soluções-padrão foram avaliados, pois ambos estão sendo usados nos laboratórios que realizam análises de íon fluoreto em águas para diluição de solução de diálise.

Os resultados da regressão linear e do coeficiente de correlação para cada uma das soluções-tampão obtidas através do método 2, estão apresentadas na Tabela 1.

Analisando-se os resultados de coeficiente de correlação, verifica-se que os melhores resultados foram obtidos para as soluções-tampão: TISAB 0, TISAB II- EDTA, TISAB III-CDTA e Citrato 0,1M.

Visto que o potencial do eletrodo e do eletrodo de referência são afetados por variações de temperatura, influenciando diretamente o equilíbrio da solubilidade e conseqüentemente o coeficiente angular, os procedimentos foram realizados sob as mesmas condições.

Os resultados de recuperação obtidos para cada um dos métodos citados (métodos 1 e 2) estão apresentados nas Figuras 1 e 2. Analisando-se ambas as figuras, verifica-se que as medidas realizadas por ambos os métodos apresentaram desvios ao redor de 100% de recuperação. Ainda, pode-se observar que ambos os métodos apresentaram variações de recuperação em torno da concentração 0,20 mg[F⁻]/L, valor máximo permissível de íons fluoreto em águas utilizadas em diálise³, sendo que esta

Tabela 1. Resultados da regressão linear e o coeficiente de correlação para cada uma das soluções-tampão em estudo, obtidos através do método 2 (determinação indireta).

Solução tampão	Regressão linear	Coefficiente de correlação (R ²)
TISAB 0	$E \text{ (mV)} = -24,845 \cdot \ln \text{ (mg F/L)} + 111,81$	0,9996
TISAB II EDTA	$E \text{ (mV)} = -24,355 \cdot \ln \text{ (mg F/L)} + 113,63$	0,9995
TISABII CDTA	$E \text{ (mV)} = -23,577 \cdot \ln \text{ (mg F/L)} + 112,07$	0,9988
TISAB III EDTA	$E \text{ (mV)} = -24,741 \cdot \ln \text{ (mg F/L)} + 91,615$	0,9989
TISABIII CDTA	$E \text{ (mV)} = -24,205 \cdot \ln \text{ (mg F/L)} + 86,549$	0,9995
CITRATO 0,1M	$E \text{ (mV)} = -23,966 \cdot \ln \text{ (mg F/L)} + 109,12$	0,9995

variação foi mais significativa para as medidas obtidas pelo método 1. Para a faixa de concentração de 0,035 a 2,5 mg[F⁻]/L, as curvas de calibração foram lineares a partir de 0,20 mg[F⁻]/L para o método 2 e para concentrações acima de 0,40 mg[F⁻]/L para o método 1. Deste modo, para a realização das determinações do respectivo íon nestas águas é indicado aplicar a técnica da adição de padrão, para obtenção de concentração final a partir de 0,5 mg[F⁻]/L (Tabela 2).

A partir dos gráficos representados nas Figuras 1 e 2, verifica-se que os melhores resultados de recuperação foram obtidos para os tampões TISAB II-CDTA, TISAB 0 e TISAB II-EDTA, sendo que para o método 1 o melhor de todos foi TISAB 0 e para o método 2, TISAB II EDTA e TISAB 0.

Na comparação entre as médias para os dois métodos de leitura (Tabela 2), pelo teste “t” Student, o valor de t calculado (0,031) é menor que o t tabelado (2,306), mostrando que não há variação estatisticamente significativa.

A utilização de soluções-tampão com formulações modificadas, como a substituição do CDTA pelo EDTA como

agente complexante, ou ausência deles (TISAB 0) mostrou ser mais apropriada para a determinação do fluoreto pelo método potenciométrico para água de diálise. Foi ainda observado que os procedimentos realizados na ausência de agentes complexantes demandaram menor tempo para estabilização e resposta do eletrodo.

Quanto à comparação entre os tampões estudados em ambos os métodos (Tabela 2), os valores de t calculados em todos os casos foram menores que os valores de t tabelados (“t” Student), mostrando que a diferença verificada entre as médias não foi significativa do ponto de vista estatístico (p >5%).

Fazendo-se uma avaliação conjunta dos resultados obtidos a partir das Figuras e Tabelas 1 e 2, pode-se sugerir que as soluções-tampão mais indicadas para análise de íons fluoreto em águas para a diálise seriam TISAB 0 e TISAB II EDTA, usando-se a técnica da adição de padrão. Convém salientar, que além do coeficiente de correlação para o TISAB II CDTA ser inferior a 0,999, esta solução-tampão utiliza reagentes mais caros que as demais soluções-tampão citadas.

Tabela 2. Concentrações médias de fluoretos e respectivos desvios padrões para soluções padrões deste íon.

[F ⁻] mg/L esperada	Concentração de íon fluoreto medida (mg/L)					
	Método 1 (leitura direta)			Método 2 (leitura indireta)		
	TISAB 0	TISAB II EDTA	TISAB II CDTA	TISAB 0	TISAB II EDTA	TISAB II CDTA
0,5	0,498 ± 0,005	0,502 ± 0,009	0,50 ± 0,01	0,496 ± 0,008	0,501 ± 0,005	0,498 ± 0,008
1,0	0,991 ± 0,006	0,986 ± 0,007	0,99 ± 0,02	0,998 ± 0,005	0,997 ± 0,007	1,00 ± 0,01
1,5	1,484 ± 0,005	1,48 ± 0,01	1,48 ± 0,02	1,498 ± 0,007	1,50 ± 0,01	1,50 ± 0,01

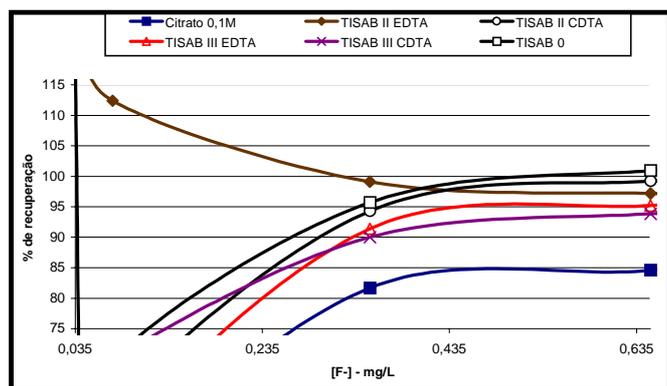


Figura 1. Distribuição da Porcentagem de recuperação em Padrões de concentração entre 0,035 e 0,65 mg(F⁻)/L em função de diferentes soluções tampão, medida pelo método 1.

CONCLUSÕES

Das soluções-tampão estudadas, as mais adequadas para a determinação de fluoreto em águas de diálise pelo método potenciométrico com eletrodo íon seletivo, foram respectivamente TISAB 0, TISAB II-EDTA e TISAB II-CDTA, as quais não apresentam diferenças estatísticas significativas.

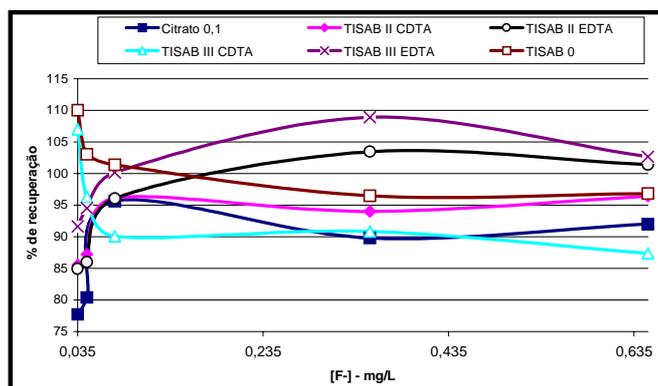


Figura 2. Distribuição da Porcentagem de Recuperação em Padrões de concentração entre 0,035 e 0,65mg(F⁻)/L em função de diferentes soluções-tampão, medidas pelo método 2

Tendo em vista avaliações de custo e rapidez de análise, a solução tampão TISAB 0 é a mais indicada, dada à baixa concentração de interferentes nesta matriz.

Com relação aos dois métodos de leitura, não existe diferença significativa entre o direto e o indireto; porém a praticidade do método de leitura direta, sugere a sua aplicação.

RIALA6/960

Freitas, V. P. S. et al. - Comparative study of buffer solution for determination of fluoride in water used in dialysis. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 62(3): 207 - 212, 2003.

ABSTRACT. Water for dilution of the dialysis solution must be practically free of contaminants to guarantee the health security of dialysed patients. The treatment of the potable water for this use must be able to eliminate the majority of the fluoride ions. The use of water with high concentrations of these ions is related to the development of osteopathias such as osteoporosis and osteomalacia, The ion-selective electrode method is considered the best one for measuring the fluoride ion in potable waters, because it has high selectivity, good linearity and poor sensitivity to interferences, when compared to the spectrophotometric method. hiperkalemia, among others. The ion-selective electrode method is considered the best one for measuring the fluoride ion in potable waters, because it has high selectivity, good linearity and poor sensitivity to interferences, when compared to the spectrophotometric method. The main objective of this research was to test the application of this method to measure low concentrations of fluoride ions in waters used to dilute dialysis solutions. Six different compositions of buffer solutions were investigated, with and without the addition of standard solution, ranging from 0 to 2.5 mg/L of fluoride ion concentration. The best results were obtained using buffer solution prepared with sodium chloride and acetic acid with the final pH equal to 5.4-5.5, adjusted with sodium hydroxide, using standard addition solution.

KEY WORDS. fluoride ions; ion-selective electrode method; dialysis.

REFERÊNCIAS

1. American Public Health Association – **Standards methods for the examination of water and wastewater**. 19th ed, Washington, A.P.H.A, p. 4-61 – 62, 1995.
2. Baumann, E.W. Trace fluoride determination with specific ion electrode. **Analytical Chimica Acta**, p. 127-32, 1962.
3. Brasil. Leis, decretos, etc. Portaria n° 82 de 03 de janeiro de 2000. **Diário Oficial**, Brasília, 08 de fevereiro de 2000, seção I, pt I, p. 13-6. Estabelece o Regulamento Técnico para o funcionamento dos serviços de diálise e as normas par cadastramento destes junto ao Sistema Único de Saúde.
4. Centro de Vigilância Sanitária – Tratamento da Água para Hemodiálise. In. **Vigilância Sanitária de Serviço de Terapia Renal Substitutiva: Implantação do Roteiro de Inspeção em Unidade de Diálise**, São Paulo, 1997, p.55-67.
5. Crosby, N. T. et al. An evaluation of some methods for the determination of fluoride in potable waters and others aqueous solutions. **Analyst**, 93: 643-52, 1968.
6. Custódio, R; de Andrade, J.C.; Augusto, F. O ajuste de curvas de calibração aos dados experimentais. **Química Nova**, 20(2): 219-25, 1997.
7. Freitas, V.P.S. et al. Fluoreto em água: estudo de metodologia analítica e níveis encontrados na região de Campinas. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, 56(2): 29-36, 1996.
8. Kauranen, Pentti. The use of buffers in the determination of fluoride by an ion-selective electrode at low concentrations and in the presence of aluminum. **Analytical Letters**, 110(6): 451-65, 1977.
9. Kissa, E. Determination of fluoride at low concentrations with the ion-selective electrode. **Anal. Chem.**, 55: 1445-48, 1983.
10. Lichtig, J. et al. Determinação de íons fluoreto, através de medidas potenciométricas, com o uso de eletrodo seletivo e de íons citrato 0,1 M como eletrólito tamponante complexante. In : **17º Congresso da ABES em Natal-RN**, 1993.
11. Midgley, D.; Torrance, K. **Potentiometric Water Analysis**. 2º Edition, p. 416-34, 1991.
12. Nicholson, K.; Duff, E.J. Fluoride determination in water: an optimum buffer system for use with the fluoride-selective electrode. **Analytical Letters**, 14(A7): 493-517, 1981.
13. Nicolay, A. et al. Hyperkalemia risks in hemodialysed patients consuming fluoride-rich water. **Clinica Chimica Acta**, 281: 29-36, 1999.
14. Nicolay, A. et al. Investigation of fluoride elimination during a dialysis session. **Clinica Chimica Acta**, 275: 19-26, 1998.
15. Nicolay, A. et al. Long term follow up of ionic plasma fluoride level in patients receiving hemodialysis treatment. **Clinica Chimica Acta**, 263: 97-104, 1997.
16. Orion. Manual do eletrodo íon seletivo para fluoreto, mod 96-09, p. 5-6.
17. Pimentel, M.F.; Neto, B.B. Calibração: uma revisão para químicos analíticos. **Química Nova**, 19(3): 268-77, 1996.
18. São Paulo. Leis, decretos, etc. Resolução SS250 de 15 de agosto de 1995. **Diário Oficial do Estado de São Paulo**, seção 1, p.11. Define teores de concentração de íon fluoreto nas águas para consumo humano, fornecidos por sistemas públicos de abastecimento.

Recebido em 30/06/2003 ; Aprovado em 12/11/2003

Influência da relação superfície/volume em frituras de batata palito

Ratio surface/volume influence on french fries potato frying

Patrícia V. DEL RÉ¹
Ana Lúcia COLTRO¹
João C. P. P. MANENTE¹
Gemma E. MARTI²
Neuza JORGE^{3*}

RIALA6/961

Del Ré, P. V. et al. - Influência da relação superfície/volume em frituras de batata palito **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 62(3): 213 - 219, 2003

RESUMO. Este estudo teve por objetivo conhecer o comportamento do óleo de soja refinado em frituras descontínuas, utilizando sucessivas frituras de batatas palito, submetido à temperatura de 180°C e relações superfície/volume (S/V) iguais a 0,2; 0,4 e 0,6 cm⁻¹. As frituras foram conduzidas em fritadeira doméstica, onde o óleo foi aquecido por 12,5 horas, em dois dias consecutivos, com temperatura controlada e reposição de óleo fresco. Nas amostras de batatas procederam-se as análises do teor lipídico e da umidade, e nos óleos obtidos durante o processo de fritura, foram analisados: ácidos graxos livres, índice de peróxidos, dienos conjugados e compostos polares totais. Observou-se que o aumento da relação S/V e o prolongamento do tempo de fritura influenciaram diretamente na alteração do óleo. As alterações físico-químicas no óleo foram maiores na relação S/V 0,6 cm⁻¹. Dentre os tempos de fritura estudados, os produtos fritos até 9,5 horas foram os mais recomendados, pois acima deste tempo de fritura, observou-se aumento do nível de alteração, principalmente na análise de compostos polares totais, atingindo valores de 25,23 e 26,57%, nas relações S/V 0,4 e 0,6 cm⁻¹, respectivamente, valores estes superiores aos recomendados pelas regulamentações de alguns países.

PALAVRAS-CHAVE. relação superfície/volume, óleo de soja, fritura descontínua, batata palito.

¹ Estudante de Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos – IBILCE – UNESP

² Estudante da Universidad Autónoma de Barcelona – Programa de Cooperación Interuniversitária – Brasil/Espanha

³ Prof^a. Dr^a. do Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos (DETA) – UNESP

* Endereço para correspondência: Rua Cristóvão Colombo, 2265 – Jardim Nazareth – São José do Rio Preto – SP njorge@eta.ibilce.unesp.br

INTRODUÇÃO

O consumo de óleos no mundo vem aumentando nas últimas décadas. Isso se deve, em grande parte, ao incremento dos *fast foods*, que se utilizam na grande maioria de frituras. O alimento frito tem se tornado muito popular, apesar de guias alimentares recomendarem a redução do nível de lipídios na dieta⁶.

No processo de fritura ocorre incorporação do óleo no alimento modificando suas propriedades nutricionais e sensoriais, além da transferência de calor reutilizável³. Esta forma de aquecimento é mais eficiente que o cozimento por ar quente em fornos e mais rápido que o cozimento em água, já que as temperaturas alcançadas pelo óleo no processo de fritura são superiores às alcançadas pela água em ebulição, levando a uma rápida elaboração dos alimentos¹⁹.

Fritar é uma maneira rápida e conveniente para elaboração de alimentos com propriedades sensoriais únicas como cor, sabor, *flavour*, textura e palatabilidade. No entanto, durante a fritura por imersão, ocorrem alterações indesejáveis como reações térmicas, oxidativas e hidrolíticas, além de mudanças físico-químicas devido à formação de novos componentes.

Considerando-se, ainda, que uma parte do óleo utilizado no processo de fritura é absorvida pelo alimento e torna-se parte da dieta, verifica-se a necessidade da utilização de um meio de fritura de boa qualidade e a manutenção desta qualidade por períodos mais longos¹⁹.

Os possíveis riscos à saúde envolvidos no consumo de óleos aquecidos ou oxidados como pré-disposição à arteriosclerose, ação mutagênica ou carcinogênica foram comentados e revisados⁹.

Alguns fatores que influenciam a absorção e a qualidade do óleo são dependentes do próprio processo como o tipo de equipamento utilizado, a temperatura, o tempo e o método de fritura. Outros, extrínsecos ao mesmo, se relacionam com o tipo de óleo utilizado, sua composição, a presença de aditivos, o tipo de preparação do alimento, assim como a relação superfície/volume¹⁵.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o comportamento do óleo de soja refinado em frituras descontínuas, utilizando sucessivas frituras de batatas palito, submetido à temperatura de 180°C e relações superfície/volume iguais a 0,2; 0,4 e 0,6 cm⁻¹.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Amostras

Foi utilizado nos ensaios de fritura o óleo de soja refinado da marca Cargill, que apresenta em sua composição antioxidantes - Terc Butil Hidroquinona (TBHQ) e ácido cítrico, proveniente do comércio local.

As batatas do tipo Monalisa, também adquiridas no comércio local, foram descascadas, cortadas mecanicamente na forma palito (1 cm x 1 cm x 6 cm), lavadas e submersas em água até o momento da fritura. Em seguida, foram escorridas, secas e pesadas em balança semi-analítica.

2. Processo de fritura

Foi utilizada nos ensaios uma fritadeira doméstica marca NKS home, modelo DF-150/AL, com volumes de óleo de soja de 1600, 800 e 550 mL para manter as relações superfície/volume (S/V) em 0,2; 0,4 e 0,6 cm⁻¹, respectivamente. Os lotes de batatas continham aproximadamente 320 g para S/V 0,2 cm⁻¹; 160 g para S/V 0,4 cm⁻¹ e 110 g para S/V 0,6 cm⁻¹. A temperatura empregada foi de 180°C e monitorada durante todo o processo pelo termostato da fritadeira, juntamente com o auxílio de um termopar tipo T.

Antes de dar início aos ensaios de fritura, o óleo foi submetido ao aquecimento por período de 10 minutos para o estabelecimento do controle de temperatura na fritadeira.

Cada lote de batatas foi frito por 5 minutos, empregando um intervalo de 25 minutos entre cada fritura, sendo que 5 minutos foram utilizados para o reaquecimento do óleo antes de iniciar a fritura seguinte. Os óleos foram aquecidos por um período total de 12,5 horas em dois dias consecutivos, sendo 6,25 horas em cada dia. Nos intervalos das frituras foram feitas reposições com óleo fresco para manutenção das relações S/V estudadas.

As amostras de óleo e batata foram coletadas nos tempos 0,5; 3,5; 6,5; 9,5 e 12,5 horas de fritura. Foram também retiradas amostras de óleo original e batata *in natura* para análises posteriores.

Amostras com 25 mL de óleo foram colocadas em frascos de vidro âmbar e, em seguida, armazenadas em congelador à temperatura de -20°C para evitar posteriores alterações oxidativas. Amostras de 100 g de batatas fritas foram pesadas, embaladas em folha de alumínio e sacos de polietileno, e estocadas em congelador. Todas as amostras foram descongeladas apenas no momento das análises, as quais foram realizadas em duplicata.

3. Determinações analíticas

- **Teor lipídico** - método AOCS Bc 3-49 (1993)², expresso em porcentagem, determinado no equipamento de extração de gordura, modelo MA 490 da marca Marconi.
- **Teor de umidade** - método AOCS Bc 2-49 (1990)¹, expresso em porcentagem, obtido através da relação entre o peso de água eliminada do produto pelo peso da amostra total.
- **Ácidos graxos livres** - método AOCS Cd 3d-63 (1993)², onde denomina-se "grau de acidez" a porcentagem de ácidos graxos livres que contém um óleo, expressos como ácido oléico.
- **Índice de peróxidos** - método AOCS Cd 8-53 (1993)², onde denomina-se índice de peróxidos os milequivalentes de oxigênio ativo contidos em um quilograma de óleo, calculados a partir do iodo liberado do iodeto de potássio.
- **Compostos polares totais** - método cromatográfico proposto por Dobarganes et al.⁷, expressos em porcentagem.
- **Dienos conjugados** - método AOCS Ti 1a-64 (1993)², que determina dienos conjugados de ligações insaturadas, expressos como porcentagem de ácidos dienóicos conjugados. O espectrofotômetro usado foi da marca SHIMADZU, modelo UV Mini 1240.

Tabela 1. Análise de variância para teor lipídico e umidade.

Causas de Variação	G.L.	Quadrados Médios	
		Teor Lipídico	Teor de Umidade
S/V	2	44,9210**	1314,5028**
Tempo de Fritura	4	5,4884**	4,8041**
S/V x Tempo de Fritura	8	10,8886**	11,4953**
Resíduo	15	0,8880	0,9113
Desvio Padrão		0,9423	0,9546
Coef. de Variação (%)		3,31	1,91

** - teste significativo ($P < 0,01$).

4. Análise estatística

O experimento foi realizado em esquema fatorial 3x5 com três relações S/V (0,2; 0,4 e 0,6 cm⁻¹) e cinco tempos de fritura (0,5; 3,5; 6,5; 9,5 e 12,5 horas), no delineamento inteiramente casualizado. Os resultados obtidos das determinações analíticas, em duplicata, foram submetidos à análise de variância e as diferenças entre as médias foram testadas a 1 e 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey, através do programa ESTAT. Os coeficientes de correlação linear entre os tempos de fritura e as determinações físico-químicas também foram obtidos pelo programa ESTAT.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Análise da batata

As batatas *in natura* utilizadas neste trabalho continham 86,83% de umidade e 0,41 % de teor lipídico. Rani e Chauhan¹⁶ encontraram valores próximos, 80,1% e 0,8%, respectivamente, para diferentes variedades de batatas.

Para avaliar os efeitos dos fatores relação S/V e Tempo de Fritura sobre o teor de lipídico e umidade foram realizados os cálculos da análise de variância (Tabela 1). Como observado, os efeitos principais e a interação foram significativos ($P < 0,01$). Então, foi necessário proceder o desdobramento da interação relação S/V x Tempo de Fritura, cujos resultados encontram-se na Tabela 2.

De acordo com a Tabela 2, o produto final apresentou, após as frituras, características diferentes em relação ao produto

inicial, pois modificou rapidamente suas características, destacando o aumento de seu conteúdo lipídico, variando de 22,41 a 33,71% (valor médio = 28,48%), e a diminuição do teor de umidade, oscilando de 35,35 a 61,80% (valor médio = 48,58%), independentemente da relação S/V e tempo de fritura.

Os resultados do teor lipídico apresentados na Tabela 2 mostram que, no tempo de fritura 0,5 hora as diferentes relações S/V não diferiram estatisticamente entre si. Já, nos tempos 3,5 e 9,5 horas houve maior absorção de lipídio na relação S/V 0,2 cm⁻¹.

A absorção de óleo pelo alimento é influenciada por uma série de fatores que atuam sobre as velocidades de transferência de calor e massa, entre óleo e alimento e, são dependentes do próprio alimento, do óleo e das condições de fritura¹⁸.

Quanto ao teor de umidade, observa-se na Tabela 2 que as batatas apresentaram um comportamento instável, oscilando entre aumento e diminuição, independente da relação S/V. Essas variações podem ser devidas às variáveis incontrolláveis dentro do processo de fritura como as oscilações de temperatura do termostato da fritadeira, cuja variação faz com que durante a fritura haja maior perda de água e maior absorção de óleo ou vice-versa.

Observa-se também, que há aumento gradativo do teor de umidade conforme aumenta a relação S/V, em todos os tempos de fritura. Na relação S/V 0,2 cm⁻¹, o produto apresentou menor teor de umidade e, portanto, teve maior perda de água, o que pode explicar, em parte, o elevado teor lipídico em relação às demais S/V estudadas.

A diminuição de peso das batatas é devida à eliminação

Tabela 2. Desdobramento da interação relação S/V x Tempo de Fritura para os dados de teor lipídico e umidade.

S/V (cm ⁻¹)	Tempo de Fritura (horas)				
	0,5	3,5	6,5	9,5	12,5
Teor Lipídico					
0,2	27,02 ^{bA}	29,98 ^{aA}	29,72 ^{abB}	31,89 ^{aA}	29,90 ^{abA}
0,4	28,91 ^{aA}	26,53 ^{abB}	25,65 ^{bc}	26,67 ^{abB}	22,41 ^{cB}
0,6	28,75 ^{bA}	28,55 ^{bAB}	33,71 ^{aA}	28,47 ^{bB}	29,08 ^{bA}
Teor de Umidade					
0,2	38,07 ^{abcC}	35,35 ^{cC}	36,01 ^{bcC}	38,65 ^{abC}	39,06 ^{aC}
0,4	50,06 ^{bB}	55,70 ^{aB}	54,40 ^{aB}	53,16 ^{aB}	48,34 ^{bB}
0,6	59,45 ^{abA}	60,99 ^{abA}	61,80 ^{aA}	58,77 ^{bA}	58,86 ^{abA}

a,b,c (linha) - em cada S/V, médias de tempo de fritura seguidas de mesma letra minúscula, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$);

A,B,C (coluna) - em cada tempo de fritura, médias das relações S/V seguidas de mesma letra maiúscula, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

Tabela 3. Análise de variância para ácidos graxos livres, índice de peróxidos, dienos conjugados e compostos polares totais.

Causas de Variação	G.L.	Quadrados Médios			
		Ácidos Graxos Livres	Índice de Peróxidos	Dienos Conjugados	Compostos Polares Totais
S/V	2	0,0459**	100,7727**	1,0279**	119,1054**
Tempo	4	0,0251**	15,2056**	1,0807**	286,5503**
S/V x Tempo	8	0,0031**	10,6140**	0,0497**	9,4577*
Resíduo	15	0,0005	0,5315	0,0003	3,4575
Desvio Padrão		0,0235	0,7290	0,0163	1,8594
Coef. de Variação (%)		9,57	6,77	1,33	13,55

* - teste significativo ($P < 0,05$);** - teste significativo ($P < 0,01$).

de água, perdida durante a fritura. A água eliminada por evaporação é substituída parcialmente pelo óleo absorvido pela batata durante o processo de fritura. Segundo Makinson et al.¹¹, alimentos com alto conteúdo de água e baixo teor de gordura estimulam a absorção de óleo, enquanto estudos com alimentos de elevado conteúdo inicial de gordura têm demonstrado que estes não absorvem muito óleo durante a fritura. Por outro lado, a gordura do alimento é transferida para o óleo do banho.

2. Análise do óleo de fritura

O óleo de soja original utilizado neste trabalho apresentou os seguintes dados: 0,11% de ácidos graxos livres; 0,28 meq/kg de índice de peróxidos; 0,26% de dienos conjugados e 2,04% de compostos polares totais. Os valores encontrados estão de acordo com a legislação adotada por alguns países, para a utilização como óleo de fritura⁸.

A Tabela 3 apresenta a análise de variância para as

determinações de ácidos graxos livres, índice de peróxidos, dienos conjugados e compostos polares totais do óleo utilizado nas frituras. Observa-se que ocorreu interação significativa entre os fatores relação S/V x Tempo de Fritura e, desta forma, procedeu-se o desdobramento dessa interação, cujos resultados encontram-se na Tabela 4.

Observa-se na Tabela 4, os ácidos graxos livres aumentaram durante o processo de fritura indicando o desenvolvimento de reações hidrolíticas. De acordo com Mogharbel e Freitas¹³, os ácidos graxos livres se elevam conforme o aumento do tempo de fritura, e após longo período de fritura (40 horas) diminuem, devido principalmente a sua volatilização e decomposição em outros compostos que alteram o pH do meio. Verifica-se que na relação S/V 0,2 cm⁻¹ os tempos de fritura 0,5; 3,5; 9,5 e 12,5 horas não diferiram da relação S/V 0,4 cm⁻¹. A relação S/V 0,6 cm⁻¹ apresentou valores maiores em relação às demais, indicando tendência a desenvolver mais alterações

Tabela 4. Desdobramento da interação da relação S/V x Tempo de Fritura para ácidos graxos livres, índice de peróxidos, dienos conjugados e compostos polares totais.

S/V (cm ⁻¹)	Tempo de Fritura (horas)				
	0,5	3,5	6,5	9,5	12,5
Ácidos Graxos Livres					
0,2	0,16 ^{cA}	0,19 ^{bcB}	0,24 ^{abB}	0,26 ^{abB}	0,28 ^{aB}
0,4	0,15 ^{bA}	0,18 ^{bB}	0,15 ^{bC}	0,22 ^{abB}	0,26 ^{aB}
0,6	0,18 ^{dA}	0,27 ^{cA}	0,34 ^{bcA}	0,36 ^{bA}	0,46 ^{aA}
Índice de Peróxidos					
0,2	7,17 ^{abB}	7,98 ^{abC}	6,08 ^{bC}	7,09 ^{abC}	8,87 ^{aB}
0,4	7,35 ^{dB}	14,88 ^{aA}	12,72 ^{abB}	10,57 ^{bcB}	9,94 ^{cB}
0,6	9,25 ^{cA}	12,14 ^{bB}	15,52 ^{aA}	16,34 ^{aA}	15,54 ^{aA}
Dienos Conjugados					
0,2	0,53 ^{eB}	0,67 ^{dC}	0,92 ^{cC}	1,08 ^{bC}	1,22 ^{aC}
0,4	0,68 ^{dA}	1,07 ^{cB}	1,39 ^{bB}	1,63 ^{aB}	1,65 ^{aB}
0,6	0,67 ^{eA}	1,21 ^{dA}	1,64 ^{cA}	1,98 ^{bA}	2,08 ^{aA}
Compostos Polares Totais					
0,2	4,52 ^{cA}	7,33 ^{bcA}	9,25 ^{bcB}	12,33 ^{abB}	16,96 ^{aB}
0,4	5,35 ^{bA}	9,34 ^{cdA}	12,83 ^{bcB}	18,10 ^{bA}	25,23 ^{aA}
0,6	6,26 ^{cA}	10,98 ^{cA}	18,00 ^{bA}	22,88 ^{abA}	26,57 ^{aA}

a,b,c (linha) - em cada S/V, médias de tempo de fritura seguidas de mesma letra minúscula, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$);

A,B,C (coluna) - em cada tempo de fritura, médias das relações S/V seguidas de mesma letra maiúscula, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

hidrolíticas. Nenhuma amostra apresentou valores de ácidos graxos livres superiores a 1%, valor este adotado por alguns países como máximo para a utilização de óleos de fritura¹².

Para os índices de peróxidos apresentados na Tabela 4, em relação aos tempos de fritura, verificou-se um comportamento instável, oscilando entre aumento e diminuição. A relação S/V 0,6 cm⁻¹, a partir de 6,5 horas, apresentou valores superiores aos recomendados pelas regulamentações, que estipulam valores de descarte acima de 15 meq/kg¹⁴. Verificou-se que quanto maior a relação S/V, isto é, maior exposição ao ar, maior a formação de hidroperóxidos, visto que os peróxidos são originados pelas reações oxidativas devido à presença do oxigênio do ar e catalisadas pelo aumento de temperatura.

De acordo com alguns autores o índice de peróxidos é um método químico utilizado para avaliar a formação de hidroperóxidos, porém não distingue entre os vários ácidos insaturados que sofreram oxidação, nem fornece informação sobre os produtos de oxidação secundária^{4,10}. Segundo estes autores, há uma limitação na metodologia para determinação de peróxidos; essas substâncias que são formadas durante o processo de fritura aumentam seu peso molecular até que a estrutura se fraciona em moléculas menores, que mesmo presentes no óleo, nem sempre são detectadas pela análise. Este fator ocorre principalmente em tempos de fritura mais elevados.

Mudanças na posição e geometria das duplas ligações provocadas pelas altas temperaturas do processo podem, em muitos casos, ser acompanhadas por medidas de absorção na região ultravioleta. A formação de dienos conjugados de ácidos graxos polinsaturados prevê formação de compostos primários de oxidação, os hidroperóxidos, o que pode predizer uma boa relação entre este índice e a quantidade de compostos de oxidação das amostras¹².

Observando a Tabela 4, a análise de dienos conjugados (absorção a 233 nm) mostrou aumento destes compostos com o decorrer do tempo de fritura. Na relação S/V 0,6 cm⁻¹ observa-se valores maiores do que nas demais relações S/V. Cella et al.³, em estudo do comportamento do óleo de soja refinado em fritura por imersão com diferentes alimentos de origem vegetal (mandioca, couve-flor, abobrinha e batata), constataram que o acréscimo do tempo de aquecimento promoveu um aumento nos

valores de dienos conjugados. Os autores reforçaram, ainda, que nos tempos de fritura onde houve reposição com óleo novo, os níveis de dienos conjugados foram reduzidos.

Quanto às análises de compostos polares totais (Tabela 4), observou-se aumento significativo dos compostos com o aumento do tempo de fritura. Considerando que o limite de descarte para óleos de fritura exigido pela legislação de alguns países é de 25-27% para compostos polares totais, o tempo de fritura 12,5 horas nas relações S/V 0,4 e 0,6 cm⁻¹, apresentou valores próximos ao limite estabelecido. Masson et al.¹², estudando o comportamento dos óleos polinsaturados obtidos de estabelecimentos comerciais, obtiveram baixos resultados para os compostos polares totais. Segundo estes autores, é possível que a quantidade de óleo que incorpora na batata durante a fritura seja superior a de outros produtos fritos e isso provoque maior velocidade de reposição de óleo novo que, por sua vez, contribui para diminuir a degradação de óleo.

Warner et al.²⁰, analisando o efeito da composição dos ácidos graxos dos óleos de algodão e girassol com alto oléico na fritura de batatas *chips* e palito, observaram maior deterioração dos óleos usados na fritura de batatas palito, o que pode estar relacionado com a menor quantidade de reposição de óleo em relação à batata *chips*. Segundo Sanibal e Mancini-Filho¹⁷, a adição de óleo fresco dilui os compostos produzidos durante a fritura e repõe os antioxidantes que ajudam a manter a composição dos óleos de fritura.

A Tabela 5 apresenta os coeficientes de correlação linear entre o tempo de fritura e as determinações físico-químicas realizadas no óleo de soja, nas diferentes S/V estudadas. Para os ácidos graxos livres com os tempos de fritura, observa-se que ocorreram altas correlações na relação S/V 0,2 e 0,6 cm⁻¹, ou seja, 0,98. Já, para a relação S/V 0,4 cm⁻¹ as correlações não foram significativas. Quanto ao índice de peróxidos, observa-se que as correlações só foram significativas para a relação S/V 0,6 cm⁻¹ apresentando a menor correlação (0,89) dentre as determinações físico-químicas. Em relação aos dienos conjugados, as correlações também foram elevadas para todas as relações S/V, o mesmo ocorrendo para os compostos polares os quais apresentaram os maiores valores, ou seja, 0,99, em todas as relações S/V estudadas.

Tabela 5. Coeficientes de correlação linear (r) entre o tempo de fritura (x) e as determinações físico-químicas (y) para as relações S/V e as correspondentes equações lineares.

Determinações Físico-químicas	S/V (cm ⁻¹)					
	0,2		0,4		0,6	
	r	Equação	r	Equação	r	Equação
AGL	0,98**	y=0,16+0,01x	0,86 ^{ns}		0,98**	y=0,18+0,02x
IP	0,38 ^{ns}		0,05 ^{ns}		0,89*	y=10,12+0,56x
DC	0,99**	y=0,50+0,06x	0,96**	y=0,74+0,08x	0,97**	y=0,74+0,12x
CPT	0,99**	y=3,60+1,00x	0,99**	y=3,66+1,62x	0,99**	y=5,56+1,75x

AGL: Ácidos Graxos Livres; IP: Índice de Peróxidos; DC: Dienos Conjugados; CPT: Compostos Polares Totais;

^{ns} - não significativo (P > 0,05);

* - teste significativo (P < 0,05);

** - teste significativo (P < 0,01).

Damy⁵, analisando as alterações do óleo de soja e gordura vegetal hidrogenada utilizados em frituras descontínuas de batatas *chips* à temperatura de 170°C, encontrou elevadas correlações entre os ácidos graxos livres e o tempo de fritura (0,97); o mesmo ocorrendo para o índice de peróxidos nas frituras com gordura vegetal hidrogenada (0,99).

CONCLUSÕES

O aumento da relação S/V teve efeito marcante sobre a velocidade de alteração do óleo de soja, uma vez que o aumento

significa maior superfície específica do óleo em contato com o ar. As alterações físico-químicas no óleo foram mais evidentes quando a relação S/V foi 0,6 cm⁻¹.

Diante das condições do processo, pode-se recomendar o consumo de batatas fritas até 9,5 horas de aquecimento, pois acima deste tempo de fritura, observou-se aumento do nível de alteração de alguns compostos, em destaque os compostos polares, que apresentaram valores acima dos recomendados pelas regulamentações de alguns países.

RIALA6/961

Del Ré, P. V. et al. - Ratio surface/volume influence on french fries potato frying. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 62(3): 213 - 219, 2003.

ABSTRACT. The aim of this study was to evaluate the refined soybean oil behavior on the discontinued frying process using successive french fries potato frying, submitted to a temperature of 180 °C, and surface/volume (S/V) ratios equal to 0.2; 0.4 and 0.6 cm⁻¹. Frying were carried out on household frying pan, where the oil was heated up for 12.5 hours on two days in a row, at controlled temperature, and fresh oil replacement. The potatoes samples underwent lipid and humidity analyses, and the oils obtained during the frying process were assessed for free fatty acids, peroxide value, conjugated dienes, and total polar compounds. It was observed that the increasing on the surface/volume ratio and on the frying time had a direct influence on the oil alteration. The oil physicochemical alterations were higher on S/V 0.6 cm⁻¹ ratio. Among the frying times studied, the fried products up to 9.5 hours were the most recommended, because over this frying time, an increasing on the alteration level was observed, mainly, on the total polar compounds analysis, reaching values of 25.23 and 26.57%, on the relations S/V 0.4 and 0.6 cm⁻¹, respectively; such values higher than the ones recommended by some countries' ruling.

KEY WORDS. surface/volume ratio, soybean oil, discontinued frying, french fried potato.

REFERÊNCIAS

1. American Oil Chemists'Society. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists'Society**. 1990.
2. American Oil Chemists'Society. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists'Society**. 1993.
3. Cella, R. C. F.; Regitano-D'arce, M. A. B.; Spoto, M. H. F. Comportamento do óleo de soja refinado utilizado em fritura por imersão com alimentos de origem vegetal. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 22: 111-116, 2002.
4. Cuesta, C. et al. Modificaciones de um aceite de oliva durante las frituras sucesivas de patatas. Correlaciones entre distintos índices analíticos y de evaluación global de la degradación. **Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment.**, 31: 523-531, 1991.
5. 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].
6. Dobarganes, M. C.; Márquez-Ruiz, G.; Velasco, J. Interactions between fat and food during deep-frying. **Eur. J. Lipid Sci. Technol.**, 102: 521-528, 2000.
7. 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: 1563-1575, 2000.
8. Firestone, D.; Stier, R. F.; Blumenthal, M. M. Regulation of frying fats and oils. **Food Technology**, 45: 90-94, 1991.
 9. Kubow, S. Toxicity of dietary lipid peroxidation products. **Trends in Food Sci. and Technol**, September: 67-71, 1990.
 10. Lima, J. R. **Avaliação da qualidade de óleo de soja utilizado para fritura**. Campinas, 1994. [Dissertação de Mestrado em Tecnologia de Alimentos - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas].
 11. Makinson, J. H. et al. Fat uptake during deep-fat frying of coated and incoated foods. **J. Food Comp.**, 1: 93-101, 1997.
 12. 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: 273-281, 1997.
 13. Mogharbel, A. D.; Freitas, R. J. S. Influência do aquecimento nos meios de fritura sobre o grau de acidez e índice de iodo. **Brasil Alimentos**, 20: 35-37, 2003.
 14. Monferrer, A.; Villalta, J. La fritura desde un punto de vista práctico (II). **Aliment. Equipos Tecnol.**, 21: 85-90, 1993.
 15. Pozo-Díez, R. M. **Estudio del proceso de fritura de alimentos frescos y congelados pre-fritos. Comportamiento del aceite de semilla de girasol de alto contenido en ácido oleico**. Alcalá de Henares, 1995. [Tesis Doctoral en Farmacia - Facultad de Farmacia, Universidad de Alcalá de Henares].
 16. Rani, M.; Chauhan, G. S. Effect of intermittent frying and frying medium on the quality of potato chips. **Food Chemistry**, 54: 365-368, 1995.
 17. Sanibal, E. A. A.; Mancini-Filho, J. Alterações físicas, químicas e nutricionais de óleos submetidos ao processo de fritura. **Food Ingred. South Am.**, 18: 64-71, 2002.
 18. Smith, L. M. et al. Lipid content and fatty acid profiles of various deep-fat fried foods. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, 62: 996-999, 1985.
 19. Stevenson, S. G.; Vaisey-Genser, M.; Eskin, N. A. M. Quality control in the use of deep frying oils. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, 61: 1102-1108, 1984.
 20. Warner, K.; Orr, P.; Glynn, M. Effect of fatty acid composition of oils on flavor and stability of fried foods. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, 74: 347-356, 1997.

Recebido em 13/06/2003 ; Aprovado em 12/11/2003



Cultura primária de condrócitos articular humana em monocamada

Culture of human articular chondrocyte in monolayer

Fabio T. KITADAI^{1*}
Cristina A. FIGUEIREDO²
Suely P. CURTI²
Luis Eugênio G. LEME¹
Clara D. R. CARELLI¹
Marco M. AMATUZZI¹

RIALA6/962

Kitadai, F. T. et al. Cultura primária de condrócitos articular humana em monocamada. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 62(3): 221 - 226, 2003.

RESUMO. O objetivo deste trabalho foi padronizar a metodologia para obtenção de cultura primária de condrócitos de cartilagem hialina articular humana para sua utilização em transplante autólogo. Foram selecionados cinco pacientes do Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (IOT-HC-FMUSP) sem doença degenerativa articular, com indicação de cirurgia artroscópica para correção de afecção do ligamento cruzado anterior do joelho. Os fragmentos de cartilagem articular pesando aproximadamente 300-500 mg foram colocados em placas de Petri contendo meio de Eagle modificado por Dulbecco's (DMEM) com 40µg/ml de gentamicina. Cada fragmento foi cortado e colocado em 2mg/ml de colagenase diluída em meio DMEM com 10% de soro fetal bovino (SFB). As células foram isoladas e cultivadas em frasco de cultura T25 em meio DMEM suplementado com 10% de SFB. As células aderiram ao frasco de cultura após 24 h e após o 3º dia de cultivo as células apresentavam morfologia elipsóide e estrelada. As culturas foram fixadas e coradas intensamente com azul de toluidina sugerindo que as células iniciaram a síntese de uma nova matriz extracelular. A curva de crescimento mostrou que a razão de crescimento foi em torno do segundo e terceiro dia de cultivo, com a duplicação do número de células semeadas. As culturas apresentaram alta viabilidade celular após o congelamento celular em nitrogênio líquido.

PALAVRAS-CHAVE. cartilagem, condrócito, cultura celular

¹- Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (IOT-HC-FMUSP)

²- Pesquisadora Científica – Divisão de Biologia Médica, Serviço de Virologia, Seção de Vírus Produtores de Exantemas do Instituto Adolfo Lutz

*Endereço para correspondência: Instituto da Ortopedia e Traumatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Rua Dr. Ovídio Pires de Campos, 335 - Cep: 05403-010

e-mail: kitadaifabio@uol.com.br

INTRODUÇÃO

O tecido cartilaginoso é conjuntivo, avascular, formado células (condrócitos), substância intersticial (matriz extracelular) constituída de fibras e por uma substância intermediária (condromucóide). Há três tipos de cartilagem: hialina, elástica e fibrocartilagem, cada uma com características peculiares.

A cartilagem hialina, destaque do presente estudo, apresenta a substância intersticial com delgadas fibras de colágeno obscurecidas pela substância fundamental (condromucóide). Além desta característica, nos adultos, as células apresentam-se em grupos isógenos. Na matriz extracelular, encontram-se fibrilas heterotípicas de colágeno formadas pela associação de fibrilas de colágeno do tipo II com as moléculas de colágeno do tipo IX e do tipo XI^{11,15,16}. Encontra-se, ainda, uma grande quantidade de proteoglicano específico, o agregano, que além de conter os glicosaminoglicanos (condroitim sulfato e queratam sulfato), tem a capacidade de interagir com o ácido hialurônico formando assim grandes agregados com massa molecular total ao redor de 10⁷ KDa¹¹. Outros proteoglicanos de menor massa molecular são encontrados nas cartilagens hialinas associados à superfície das fibrilas de colágeno. Os colágenos formam uma rede de macromoléculas resistentes à tensão, enquanto os agregados de proteoglicanos formam um gel hidratado e viscoso, responsável pela absorção das diferentes pressões impostas à cartilagem.

Os condrócitos mantêm o equilíbrio da matriz extracelular através de mecanismos de síntese e degradação. Quando o equilíbrio é alterado, a função da cartilagem é prejudicada. O metabolismo do condrócito sofre influência de estímulos mecânicos exercidos sobre a cartilagem, como peso e pressões, que exercidos sobre a cartilagem estimulam a produção de proteoglicanos. Porém, quando a cartilagem articular sofre alguma agressão que provoca ruptura, o processo de reparação é limitado.

Atualmente as culturas de células animais são utilizadas em várias áreas de pesquisa. Entre as principais aplicações, destacam-se o cultivo primário de condrócitos e sua utilização como transplante autólogo^{4,10,12,13,14,15,16}.

O isolamento e cultivo de condrócitos a partir de tecido cartilaginoso humano foi feito pela primeira vez por Manning et al¹⁴. No entanto, a metodologia que emprega condrócitos obtidos “in vitro” para o tratamento de lesões de cartilagem em seres humanos só foi conseguida por Brittberg et al⁴ na década de 90. Neste trabalho, os autores utilizaram condrócitos, cultivados a partir de amostras de cartilagem do próprio paciente, que após o crescimento “in vitro” foram transplantados nas áreas lesadas da cartilagem dos joelhos.

Os condrócitos têm sido cultivados utilizando-se duas metodologias: a descrita por Green⁹, que utiliza a digestão enzimática em série: hialuronidase, tripsina e collagenase; e a descrita por Benya et al³ na qual a digestão enzimática é realizada usando uma solução de collagenase em baixa concentração de CO₂, que resulta na obtenção de 90% de condrócitos do tecido articular. Os autores realizaram modificações nos métodos de extração já descritos na literatura, com o intuito de obter um maior número de células viáveis para cultivo celular.

O objetivo desse trabalho foi a padronização de uma metodologia básica para o cultivo de condrócitos de cartilagem hialina articular humana para sua utilização como transplante autólogo.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram selecionados cinco pacientes do Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (IOT-HC-FMUSP) que se submeteram a tratamento cirúrgico do joelho com problemas do ligamento cruzado anterior e que não apresentavam doenças degenerativas prévias (Tabela 1).

Os pacientes foram informados do procedimento proposto e concordaram em participar do presente estudo.

Tabela 1. Pacientes Triados

Paciente	Idade	Sexo	Diagnóstico*	Peso do fragmento da cartilagem (mg)
1	22	M	L.C.A	500
2	25	M	L.C.A	475
3	24	M	L.C.A	465
4	30	M	L.C.A	440
5	34	M	L.C.A	300

*- L.C.A- Cirúrgia Artroscópica para Tratamento de Lesão do Ligamento Cruzado Anterior

Tabela 2. Critérios de inclusão e exclusão para obtenção de amostras de cartilagem

	INCLUSÃO	EXCLUSÃO
IDADE	Até 49,5 anos	Acima de 49,5 anos
PESO*	Peso Normal	Sobrepeso/Obesidade
ANTECEDENTES DE DOENÇAS OSTEOARTICULARES**	Ausente	Presente
EXAME DE CARTILAGEM	Aspecto Normal	Aspecto Degenerado

Destes pacientes foram retirados fragmentos da cartilagem articular do joelho, sem sinais aparentes de degeneração, obtidos de zona não submetida à carga, utilizando-se bisturi fino. Todas as amostras de cartilagem articular obedeceram aos critérios de inclusão e exclusão (Tabela 2).

Cultura de Condrócitos

Os fragmentos da cartilagem articular dos cinco pacientes pesavam aproximadamente de 300 a 500mg (Tabela 1), totalmente livres de outros tecidos. Foram colhidos assepticamente e colocados em meio DMEM em solução salina balanceada de Earle, contendo gentamicina (40mg/ml). Os fragmentos da cartilagem foram cortados em pedaços de 3x3 mm e lavados duas vezes no próprio meio de cultura contendo 40 mg/ml de gentamicina.

As amostras foram incubadas a 37° C em 10 ml de meio de cultura com 10% SFB contendo 2mg/ml de collagenase tipo I, pH 7,2 durante 30 minutos. Após este período, o meio contendo os condócitos liberados da matriz foram colhidos e ao tecido não digerido foi adicionado nova solução de collagenase e, a amostra incubada novamente a 37°C.

Os condócitos obtidos de cada extração foram, então, filtrados em tela de nylon para remover os fragmentos não dissolvidos e mantidos em banho de gelo até a completa extração da amostra.

As células foram lavadas duas vezes em meio de cultura, centrifugando-se a 1.000 RPM por 10 minutos. Após as lavagens, as células foram delicadamente ressuspendidas em DMEM com 10% de SFB sem antibiótico e semeadas em garrafas de cultura de células de 25 cm² (Costar, Falcon) numa concentração de 1x10⁵ céls./ml.

A viabilidade celular foi quantificada com o corante vital azul de tripan (0,5% em solução fisiológica) em câmara hemocitométrica. As culturas celulares das amostras foram mantidas em estufa a 37° C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. O crescimento celular foi acompanhado por observação diária em microscópio invertido.

Curva de Crescimento

Para a realização da curva de crescimento celular, tubos de ensaios foram semeados com as células obtidas da amostra da cartilagem articular dos pacientes número 1 e 2. As células foram cultivadas em tubos de cultura numa concentração de

1x10⁵ células/ml em meio DMEM contendo 10% de SFB. Após 24 horas de cultivo, o meio foi descartado e as células foram tratadas com uma solução de ATV (tripsina 0,2% versene 0,02%). Após o descolamento das células do tubo de cultura foi feita a contagem de células provenientes de 3 tubos de ensaio, utilizando-se a câmara hemocitométrica. As contagens celulares foram realizadas durante o período de 10 dias consecutivos, com intervalos de 24 horas.

A partir do número de células contadas em cada tubo, calculou-se a média diária que foi utilizada para a elaboração da curva do crescimento celular.

Congelamento Celular

Visando futuros estudos, as culturas foram preservadas em nitrogênio líquido a -196°C. O meio de preservação foi constituído de DMEM com 10% de SFB, contendo 10% de dimetil-sulfóxido (DMSO).

Estudos Morfológicos

Microscopia de Fase

As culturas de condócitos em semi-confluência e confluência foram examinadas e fotografadas diariamente no microscópio Zeiss, de microscopia de fase, utilizando-se um filtro verde como contraste.

Microscopia de Luz

As monocamadas das culturas de condócitos em semi-confluência e confluência foram coradas pelo corante azul de toluidina. Antes da fixação, o meio de cultura foi cuidadosamente retirado e as células foram fixadas em 1.0% de glutaraldeído em tampão (fostato de sódio e potássio 0.15 M, pH 7,2). A fixação ocorreu por 10 minutos em temperatura ambiente.

A seguir, o material foi lavado em uma solução contendo tampão durante 15 minutos e corado durante 10 minutos numa solução aquosa de azul de toluidina 0,5% em pH 3,5. Após esse tempo, o corante foi removido e as culturas foram lavadas em tampão e rapidamente observadas e fotografadas em microscópio óptico comum da marca Olympus.

RESULTADOS

O cultivo primário de condócitos foi estabelecido a partir de quatro fragmentos dos cinco pacientes testados. As células

isoladas do fragmento de cartilagem do paciente número 5 não foram quantitativamente suficientes para a formação da monocamada celular.

Os condrócitos foram isolados do tecido utilizando colagenase diluída em DMEM contendo 10% de SFB. Após as lavagens celulares, foi feito o teste de viabilidade celular, realizado com base na incorporação do corante vital azul de tripan. O método de extração celular foi excelente com 95% das células viáveis.

O cultivo primário foi iniciado com incubação de 10^5 células/ml em meio DMEM suplementado com 10% de SFB e mantidas a 37°C . Após 24 horas foram observadas colônias de células elipsóides e estreladas que aderiram ao frasco de cultura. As células que não aderiram ao frasco de cultura foram contadas em câmara hemocitométrica e a contagem celular mostrou que 5% das células não foram capazes de aderir e morreram no transcorrer das primeiras 72 horas. Na Figura 1A, observa-se o estágio de desenvolvimento atingido após 72 horas. Os agregados celulares que constituem colônias e também condrócitos isolados exibem aspecto elíptico e estrelado com grande quantidade de prolongamentos celulares irregulares. Por volta do 7º dia de cultivo, os condrócitos cresceram sobre toda a superfície do frasco de cultura, o que resultou no aparecimento de uma monocamada celular (Figura 1B) com aspecto fusiforme. A cultura primária de condrócitos foi mantida até o 25º dia de cultura. Na Figura 1C, podemos verificar a cultura corada com azul de toluidina mostrando o acúmulo da matriz metacromática sintetizada pelos condrócitos em cultivo.

A morfologia e o crescimento dos condrócitos obtidos da extração enzimática das quatro amostras das cartilagens articulares utilizadas foram semelhantes.

A curva de crescimento indicou que o maior índice de multiplicação celular foi em torno do segundo e terceiro dia de cultivo, com a duplicação do número de células semeadas (Fig. 2). A densidade máxima foi atingida no sétimo dia de cultivo com uma diminuição da velocidade de multiplicação no décimo dia. Não houve diferença no crescimento celular das culturas dos pacientes nº 1 e 2, quando realizadas as curvas de crescimento. Não realizamos a curva de crescimento dos pacientes 3 e 4, visto que as 4 amostras apresentavam padrões semelhantes.

As culturas primárias continuaram apresentando alta viabilidade celular após o congelamento em meio de preservação constituído pelo meio DMEM suplementado com 10% de SFB e 10% de DMSO, à temperatura do nitrogênio líquido (-196°C). Frascos contendo 1×10^6 células/ml foram descongelados e cultivados em frasco de cultura. As células aderiram após 24 horas, iniciaram sua multiplicação celular até a formação de uma monocamada celular.

DISCUSSÃO

Este estudo foi realizado com o objetivo de estabelecer a cultura primária de condrócitos de cartilagem hialina articular para sua utilização em transplante autólogo.

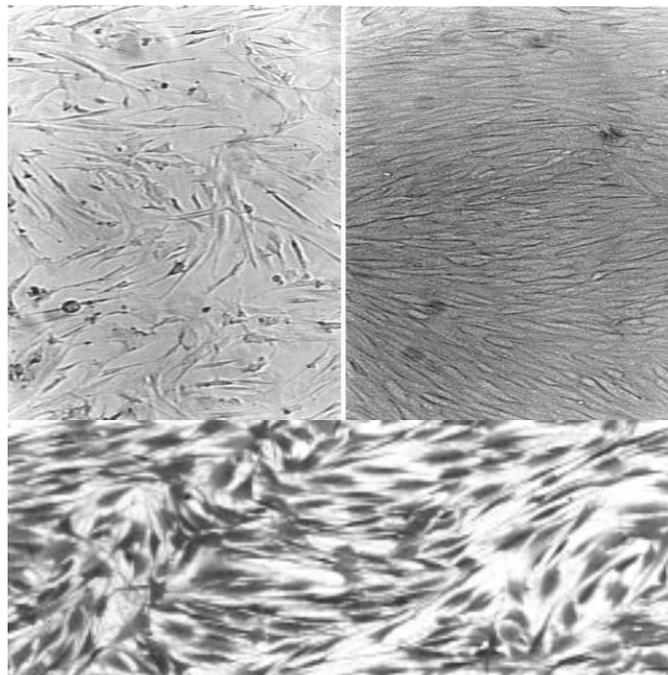


Figura 1. Fotomicrografias da cultura de condrócitos no microscópio de contraste de fase corada com azul de toluidina. Em A, observa-se o estágio da cultura de condrócitos após 72 horas. Observam-se agregados celulares que constituem colônias e condrócitos isolados, com aspecto elíptico, com grande quantidade de prolongamentos celulares. Em B, nota-se no 15º dia, as células formando uma monocamada celular e o aspecto fusiforme dos condrócitos. Em C, a cultura de condrócitos no 8º dia de cultivo, coradas com azul de toluidina, onde se observa a metacromasia. Aumento 100x.

Os resultados obtidos neste estudo, mostrou que o método de extração utilizado resultou em uma completa separação celular com a obtenção de 95% de células viáveis para o cultivo. As células foram semeadas na concentração de 1×10^5 céls./ml, pois vários estudos têm demonstrado que as células cultivadas na concentração acima descrita sintetizem colágeno II e agrecano^{2, 3, 6,9,18}.

Os condrócitos obtidos a partir dos fragmentos da cartilagem e cultivados em alta densidade celular (1×10^5 células/ml) aderiram ao frasco de cultura após 24 horas e após este período, colônias de células com aspectos elíptico e estrelado, com prolongamentos celulares foram visualizadas por microscopia óptica.

Com a amostra do paciente número 5 não foi possível obter a cultura de condrócitos, pois o fragmento articular era pequeno, pesava aproximadamente 300 mg, o que demonstrou que o tamanho do fragmento e a quantidade de células são fatores extremamente importantes para a obtenção e cultivo de condrócitos “in vitro”.

Em relação ao estudo da curva de crescimento, todas as amostras de cartilagem apresentavam padrões semelhantes, como: tamanho da amostra, idade do paciente, padrão histológico e de crescimento celular em cultura. Assim foram realizadas apenas as curvas de crescimento das culturas dos

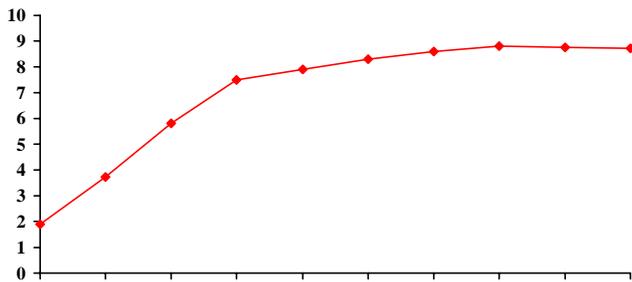


Figura 2. Curva de Crescimento da Cultura de Condrcitos dos pacientes 1 e 2 . Cada ponto plotado na curva representa a média das densidades celulares de três tubos de cultura após contagem em câmara de Neubauer.

pacientes n° 1 e 2, pois estas amostras foram consideradas representativas do grupo. Em nenhuma cultura foi utilizado qualquer fator de estimulação ou de inibição que pudesse alterar a curva de crescimento⁷. Os nossos resultados foram semelhantes aos vários estudos realizados por outros autores.

A cultura de condrócitos atingiu a confluência celular apresentando morfologia fusiforme descrita por Aulhouse et al⁽¹⁾. Durante todo o seu cultivo, no que diz respeito à transformação celular “in vitro”^{6,17} as características

morfológicas e as do crescimento celular da cultura não sofreram qualquer alteração. Após a confluência celular, as células perderam sua motilidade e passaram a apresentar alterações na membrana plasmática com perda da área de superfície em contato com o substrato e portanto, alterando sua adesão ao mesmo. Essas alterações, descritas por Folkman e Moscona⁵ e Freshney et al⁶, demonstram que as células controlam a sua densidade populacional de maneira análoga ao sistema de retroalimentação negativo, sugerindo que os fatores de crescimento e as proteínas da matriz extracelular mantêm o seu microambiente celular, regulando a sua proliferação e a diferenciação celular^{1,2,3,6,17,18}.

Em nosso estudo constatamos que a vitalidade metabólica dos condrócitos “in vitro” depende de três fatores essenciais: a) do tamanho do fragmento de cartilagem usado para a obtenção das células; b) da densidade celular ; c) e da manutenção da adesividade das células ao frasco de cultura.

Os resultados deste trabalho foram promissores abrindo perspectivas para que seja realizado no Brasil o transplante autólogo de cartilagem hialina.

RIALA6/962

Kitadai, F. T. et al. - Culture of human articular chondrocyte in monolayer. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 62(3): 221 - 226, 2003.

ABSTRACT. The purpose of this study was the padronization of the obtained human articular cartilage cell culture methodology. Five patients were selected from Instituto de Ortopedia e Traumatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (IOT-HC-FMUSP). All patients suffered from anterior ligament lesion with cartilage degeneration. The diagnosis and the surgery were performed by knee arthroscopy. The articular cartilage fragments (weight, 300 to 500 mg) were placed in Petri dishes containing Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) with 40µg/ml. The fragment was finely diced and treated with 2mg/ml collagenase in medium DMEM containing 10% fetal serum bovine. The cells isolated were seeded at high density in T25 flasks in medium DMEM with 10% of fetal calf serum (FCS). The cells attached to the flask after 24 hours the cells began to adhere to the flask. By day 3 the cell culture presented elipsoid and star morphology. Cultures fixed and stained with toluidine blue showed extracellular staining, suggesting these cells had begun to synthesize a new matrix. The growth rate of chondrocytes was high in the 2nd and 3rd days of the cultive. The chondrocytes were frozen into liquid nitrogen and showed high viability.

KEY WORDS. cartilage, chondrocyte, cell culture

REFERÊNCIAS

1. Aulthouse, A. et al. Expression of the human chondrocyte phenotype in vitro. **Vitro Cell. Dev. Biol.**, 25:659-68,1989.
2. Archer, W.C. et al. Phenotypic modulation in sub-populations of human articular chondrocytes in vitro. **J. Cell. Sci.**, 97: 361-71, 1990.
3. Benya, P.D. et al. The progeny of rabbit articular chondrocytes synthesize collagen types I and III type I trimer, but not type II. Verifications by cyanogens bromide peptide analysis. **Biochemistry**, 16: 865-72, 1977.
4. Brittberg, M. et al. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. **N. Engl. J. Med.**, 331: 889-95, 1994.
5. Folkman, J.; Moscona, A. Role of cell shape in growth control. **Nature**, 273: 345-9, 1978.
6. Freshney, R.I. **Culture of animal cells: a manual of basic techniques**. New York, Alan, R. Liss Inc., 1987.
7. Glowacki, J. et al. Cell shape and phenotypic expression in chondrocytes. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, 172: 93-8, 1983.
8. Gorti, G.K. et al. Cartilage tissue engineering using cryogenic chondrocytes. **Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.**, 129(8): 889-93, 2003
9. Green, W.T. Behavior of articular chondrocytes in cell culture. **Clin. Orthop.**, 75: 248-60, 1971.
10. Green, W.T. Articular Cartilage Repair: Behavior of rabbit chondrocytes during tissue culture and subsequent allografting. **Clin. Orthop.**, 124: 237-50, 1977.
11. Hascall, V. C.; Hascall G. K. Proteoglycans in Hay, E.D (ed). **Cell Biology of extracellular matrix**. New York , p. 39-52, 1981.
12. Kuriwaka, M. et al. Optimum combination of monolayer and three-dimensional cultures for cartilage-like tissue engineering. **Tissue Eng.**, 9(1): 41-9, 2003.
13. Mandl, E.W. et al. Serum free medium supplemented with high-concentration FGF2 for cell expansion culture of human ear chondrocytes promotes redifferentiation capacity. **Tissue Eng.**, 8(4): 573-80, 2002
14. Manning, W. K. et al. Isolation and culture of chondrocytes from human articular cartilage. **Arthritis Rheum.**, 10: 235-93, 1967.
15. Mayne, R.; Burgeson R.E. Collagen types in cartilage. In: **Articular Cartilage Biochemistry** (Kuettner, Schleyerbach and Hascall)ed. New York, Raven Press, 1987.
16. Van Der Rest, M.; Mayne R. Type IX collagen proteoglycan form cartilage is covalently cross-linked to type II collagen. **J. Biol. Chem.**, 26: 1615-8, 1988.
17. Von Der Mark, K. et al. Relationship between cell shape and type of collagen synthesized as chondrocytes lose their cartilage phenotype in culture. **Nature**, 267: 531-2, 1977.
18. Watt, F. M. Effect of seeding density on stability of the differentiated phenotype of pig articular chondrocytes in culture. **J. Cell. Sci.**, 89: 373-8, 1988.

Recebido em 18/08/2003; Aprovado em 12/11/2003

Composição química e estudo anatômico dos frutos de buriti do Município de Buritizal, Estado de São Paulo

Chemical composition and anatomic study of buriti fruits from Buritizal City, São Paulo State, Brazil

Mário TAVARES^{1*}
Sabria AUED-PIMENTEL¹
Leda C. A. LAMARDO¹
Norberto C. CAMPOS¹
Luzia I. F. JORGE²
Eduardo GONZALEZ²

RIALA6/963

Tavares, M. et al. - Composição química e estudo anatômico dos frutos de buriti do Município de Buritizal, Estado de São Paulo. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 62(3): 227 - 232, 2003.

RESUMO. A palmeira buriti é uma das mais importantes espécies nativas com potencial econômico na América Latina, porém pouco pesquisada no Brasil. Assim sendo, foi realizado um estudo histológico de frutos de buriti nativo do município de Buritizal, estado de São Paulo, e a determinação da composição química de sua polpa. O estudo morfo-anatômico foi suficiente para identificar a variedade estudada como *Mauritia vinifera* Mart., distinguindo-a de outras espécies do mesmo gênero devido ao formato estrobiliforme de seus frutos, muito peculiar. Do ponto-de-vista nutricional, destacaram-se os carboidratos (10,6 a 13,2 g/100 g). A fração oleosa, apesar do baixo teor lipídico (2,7 a 4,7 g/100g), revelou um significativo conteúdo de ácido oléico (72,6 a 74,6% do total de ácidos graxos), semelhante ao azeite de oliva. Os valores obtidos para a vitamina C e cálcio foram compatíveis com os dados da literatura, enquanto que os de pH os superaram. Sugere-se, então, uma exploração racional dessa palmeira na região de origem, devido ao potencial de seus frutos, em especial da polpa.

PALAVRAS-CHAVE: palmae, buriti, *Mauritia flexuosa* L., composição química, histologia, ácidos graxos.

*Endereço para correspondência:

¹Instituto Adolfo Lutz, Laboratório Central, Divisão de Bromatologia e Química, Av. Dr. Arnaldo, 355, CEP 01246-902, São Paulo, SP.

²Instituto Adolfo Lutz, Laboratório I, Seção de Bromatologia e Química, Rua Silva Jardim, 90, CEP 11015-020, Santos, SP.

INTRODUÇÃO

As palmeiras pertencem à família Palmae ou Palmaceae, são características da flora tropical e representadas por mais de 240 espécies e 3500 gêneros, cuja maioria tem significativa importância econômica pela grande variedade de produtos que oferecem, em especial seus frutos, como por exemplo a jerivá, do gênero *Syagrus*^{24,33}.

Dentre as inúmeras palmeiras nativas com potencial econômico destaca-se, na América Latina, o buriti, não só por ser a mais alta mas pela estética e grande utilidade¹⁵. Seu nome é derivado do tupi-guarani e significa “o que contém água”⁹, daí um de seus nomes populares ser palmeira-dos-brejos^{1,14,21,23}. Está incluída no pequeno grupo de palmeiras chamadas de “árvores da vida”, das quais tudo se aproveita^{6,18,26,28}.

Das 11 espécies disseminadas no Brasil, a mais importante é constituída pelas variedades *Mauritia flexuosa* L. e *Mauritia vinifera* Mart.^{10,32}, que os taxonomistas atualmente agrupam como uma mesma espécie, isto é *Mauritia flexuosa* L.²⁴. A literatura disponível sobre as espécies não leva em consideração as diferenças morfológicas e químicas entre aquelas variedades, bem como os diversos graus de maturação e de umidade dos frutos, revelando resultados analíticos discrepantes⁶. *Mauritia flexuosa* L. e *Mauritia vinifera* Mart crescem espontaneamente, isoladas ou agrupadas, da Amazônia a São Paulo e ao Sul de Mato Grosso¹⁸. Apresentam diferentes habitats e morfologias floral e frutífera. *M. vinifera* Mart. ocorre em altitudes superiores a 500 metros nas baixadas de solo ácido e a *M. flexuosa* L. cresce em igapós ou em lugares úmidos¹⁰.

Há uma natural preocupação dos moradores locais em proteger a palmeira, ciente do alto valor nutritivo de seus frutos oleaginosos, os quais também servem como ração para animais, principalmente aves e suínos. A polpa fibrosa e oleosa (mesocarpo) pode ser consumida *in natura* e se constitui na maior reserva natural de pró-vitamina A (carotenóides), muito superior ao observado nos óleos de dendê e de pequi^{6,17,25}. Os referidos frutos apresentam ainda expressivos níveis de vitamina C e cálcio^{16,26,30}. Seus cachos e a própria árvore servem também como ornamento²⁴. Pesquisadores da Universidade Federal do Pará descobriram que o óleo bruto de buriti pode ser empregado como protetor solar, absorvendo as irradiações eletromagnéticas de comprimento de onda entre 519 nm (cor verde) e 350 nm (ultravioleta), as mais prejudiciais à pele humana⁴.

Considerando a escassez de dados disponíveis sobre o fruto do buriti nativo do estado de São Paulo, o presente trabalho objetiva fornecer parâmetros botânicos, químicos e bioquímicos para a identificação do mesmo, subsidiando a indústria e o comércio no trato com esses frutos, bem como estimulando estudos posteriores que visem o incremento e a melhoria de sua cultura e aproveitamento econômico.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

Frutos maduros de buriti (Figura 1) foram coletados em três diferentes pontos da zona rural do Município de Buritizal, localizado na região norte do estado de São Paulo, a uma altitude de 855 metros e as seguintes coordenadas geográficas: latitude S:20°11'25" e longitude O:47°42'25"^{5,11}.

Cada uma das três amostras foi constituída de 50 unidades do fruto.

Frutos inteiros foram reservados para o exame histológico e a polpa dos demais separada manualmente do restante do fruto, com auxílio de faca de cozinha e, a seguir, triturada em multiprocessador doméstico para análise da composição química.

Neste estudo serão mantidos os nomes científicos antigamente atribuídos às espécies, ou seja, *Mauritia flexuosa* L. e *Mauritia vinifera* Mart., para comparação dos resultados a serem obtidos.

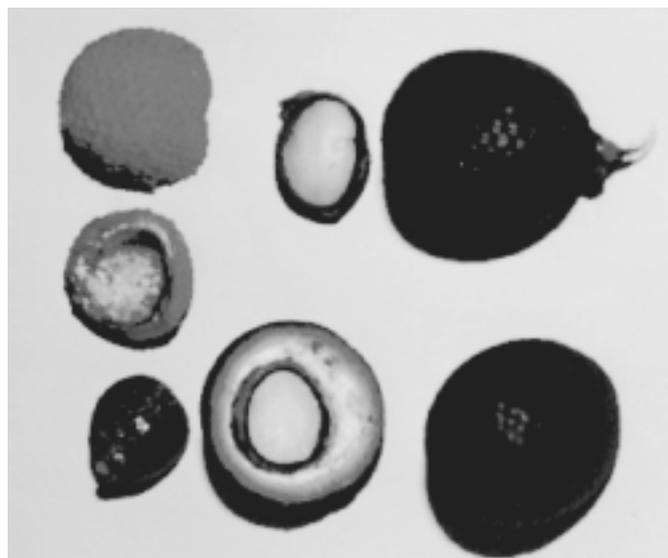


Figura 1. Frutos maduros de buriti, nativos do Município de Buritizal-SP.

Métodos

O exame microscópico da polpa triturada dos frutos foi procedido sob aumentos de 100, 200, 250 e 400 vezes, empregando microscópio ótico Zeiss.

A composição centesimal (substâncias voláteis a 105°C ou umidade, resíduo mineral fixo ou cinzas, lipídios, protídios e carboidratos) e a determinação do pH eletrométrico (na solução da polpa dos frutos) foram realizadas de acordo com a metodologia descrita nas “Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz”²⁰. As fibras brutas foram calculadas por diferença e o valor calórico total pelos fatores de Atwater, que são os seguintes: 9, para lipídios; 4, para protídios e 4, para carboidratos⁷.

Tabela 1. Composição centesimal (g/100g) e valor calórico total (kcal/100g) da polpa do fruto de buriti.*

Amostra n°	Composição centesimal						VCT***
	Umidade	Cinzas	Lipídios	Protídios	Carboidratos	Fibras**	
1	69,9	1,3	2,7	1,2	10,6	14,3	71,6
2	64,2	1,7	4,7	1,9	12,4	15,2	99,5
3	67,6	1,2	3,9	1,4	13,2	12,6	94,0
Média	67,2	1,4	3,8	1,5	12,1	14,0	88,4
DP	2,9	0,3	1,0	0,4	1,3	1,3	14,8
CV %	4,3	18,9	26,7	24,0	11,0	9,4	16,7

*Análises em triplicata. (Valores Medios) Amostras constituídas de 50 unidades. / **Por diferença. / ***VCT = Valor calórico total
DP - Desvio-padrão / CV % - Coeficiente de variação em porcentagem

A vitamina C foi determinada pelo método de Contreras-Guzman, baseado na redução de íons cúpricos¹³.

O elemento cálcio foi quantificado por volumetria, empregando calcon como indicador, conforme metodologia das normas acima referidas.

Para a análise dos ésteres metílicos dos ácidos graxos, o óleo foi extraído dos frutos, a frio, pelo método modificado de Stansby e Lemon³¹. A conversão dos citados ácidos graxos em ésteres metílicos foi feita de acordo com técnica também descrita naquelas normas.

Os ésteres metílicos foram analisados em cromatógrafo a gás, marca Shimadzu, modelo GC-17A, com detetor de ionização de chama. Os compostos foram separados em coluna capilar, de sílica fundida CP Sil-88, de 50 metros, com diâmetro interno de 0,25 cm e espessura do filme de 0,20 mm. Foram obedecidas as seguintes condições de operação: temperatura programada da coluna, 80 a 220°C (5°C/min); temperatura do injetor, 230°C; temperatura do detetor, 240°C; gás de arraste, hidrogênio; velocidade linear de 40 cm/s; razão de divisão da amostra 1:50.

Os ácidos graxos foram identificados através da comparação dos tempos de retenção dos padrões puros de ésteres metílicos de ácidos graxos e das amostras. A quantificação foi efetuada por normalização de área.

O índice de iodo da fração oleosa foi calculado a partir da composição em ácidos graxos pelo método da A.O.C.S. Cd 1c-85³.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O formato estrobiliforme permitiu a pronta identificação da variedade estudada como *Mauritia vinifera* Mart. Na ausência de frutos íntegros, contudo, são os elementos histológicos que proporcionarão esse reconhecimento. *Mauritia vinifera* Mart. apresenta detalhes estruturais relativamente abundantes, se comparada com *Mauritia flexuosa* L., isto é, presença de canais secretores, paredes celulares com pontuações e vasos xilemáticos de calibre médio. Pode-se observar a presença ocasional de amido solúvel no mesocarpo.

Por seu turno, a proximidade do município de Buritizal, onde foram coletadas as amostras, com a divisa dos estados de São Paulo e Minas Gerais, veio a corroborar tal identificação,

visto que a ocorrência de *M. vinifera* é referida para os dois estados³⁰.

Quanto à composição centesimal (Tabela 1), merecem destaque, do ponto-de-vista nutricional, os carboidratos, cuja faixa de valores encontrados (10,6 a 13,2 g/100g) se assemelha aos mencionados para tal espécie, coletada em Campo Grande-MS, porém inferiores aos referidos para *Mauritia flexuosa* L., cujo habitat é a Amazônia^{2,19,24}. O mesmo ocorreu com respeito ao teor de fibras brutas (12,6 a 15,2 g/100g) apenas no primeiro caso, já que esteve acima do reportado para a espécie amazonense^{2,19}.

A faixa de valores obtidos para vitamina C (19,3 a 20,7 mg/100g) e a de cálcio (94,79 a 144,80 mg/100g), apresentada na Tabela 2, foi compatível com a média referida na literatura que, todavia, nem sempre identifica a espécie de buriti analisada^{16,26,30}. Já os valores obtidos para o pH (4,35 a 4,88) estiveram acima dos encontrados para frutos de buriti, em diferentes estágios de maturação, coletados no estado do Ceará³⁰.

O teor lipídico da polpa (2,7 a 4,7 g/100g), a exemplo da espécie matogrossense, foi relativamente baixo, cerca de três vezes menor que o da amazonense^{2,19}.

No caso da composição em ácidos graxos (Tabela 3), apesar da polpa do fruto apresentar baixo teor lipídico, observou-se elevado conteúdo de ácido oléico na fração oleosa, conferindo-lhe um alto grau de insaturação, de interesse para uso alimentício. Os teores de ácido oléico (C18:1 n9) situaram-se entre 72,6 a 74,6%, do total de ácidos graxos, semelhante ao do azeite de oliva^{8,12} e similares ao encontrado para o óleo de

Tabela 2. Teores de vitamina C e de cálcio (mg/100g) e valores de pH da polpa do fruto de buriti.*

Amostra n°	Vitamina C	Cálcio	pH
1	19,3	144,8	4,88
2	20,7	94,8	4,77
3	19,4	120,66	4,35
Média	19,8	120,1	4,7
DP	0,8	25,0	0,3
CV %	3,9	20,8	6,0

*Análises em triplicata. (Valores Medios)

Amostras constituídas de 50 unidades.

DP - Desvio-padrão

CV % - Coeficiente de variação em porcentagem

Tabela 3. Composição dos principais ácidos graxos (% sobre o total de ácidos graxos) e índice de iodo calculado do óleo da polpa do fruto de buriti.*

Amostra n°	Ácidos graxos								Índice de iodo calculado
	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	AGS	AGI	
1	18,3	0,8	1,9	72,6	3,8	2,6	20,1	79,9	76,7
2	15,6	0,3	1,7	74,6	2,5	2,6	17,4	80,1	76,0
3	20,0	0,5	2,6	73,2	1,7	1,2	22,6	76,6	69,5
Média	18,0	0,5	2,1	73,5	2,7	2,1	20,0	78,9	74,1
DP	2,2	0,3	0,5	1,0	1,1	0,8	2,6	2,0	4,0
CV %	12,3	47,2	22,9	1,4	39,7	37,9	13,0	2,5	5,4

*Análises em triplicata. (Valores Médios) Amostras constituídas de 50 unidades.

AGS = Ácidos Graxos Saturados; AGI = Ácidos Graxos Insaturados.

DP - Desvio-padrão

CV % - Coeficiente de variação em porcentagem

polpa de buriti de Belém, extraído por prensagem (73,7%)³⁰. Com relação ao ácido linoléico (C18:2 n 9,12) os valores encontrados foram superiores ao referido para a espécie *M. flexuosa* L.^{22,29}, no caso das amostras 1 e 2. A somatória dos ácidos graxos insaturados, ainda com referência às amostras 1 e 2, foi similar também à do azeite de oliva e praticamente igual ao óleo de buriti paraense acima citado³⁰. Em consequência, o mesmo se deu com respeito ao índice de iodo calculado³. Neste particular, o valor obtido para a amostra 3 (69,5) assemelhou-se ao relatado para o óleo de buriti da Amazônia²⁷. De modo geral, os valores obtidos para os ácidos graxos são condizentes com os referidos na literatura para as variedades do buriti de outras regiões, com exceção do teor de ácido linoléico, que foi superior ao reportado à espécie *Mauritia flexuosa* L., que habita a Amazônia. Considerando a ampla faixa de variação dos macro e micronutrientes avaliados, expressa pelos coeficientes de variação % (Tabelas 1, 2 e 3) os valores obtidos para estes componentes não são conclusivos na diferenciação das variedades.

Comparações com outros trabalhos ficaram um tanto prejudicadas pela falta de identificação, nos mesmos, da espécie de buriti estudada. Vários autores assumem ora ser *M. vinifera* Mart. ora ser *M. flexuosa* L., sem ter procedido a um estudo histológico prévio dos frutos.

CONCLUSÕES

Somente através do exame microscópico foi possível identificar os frutos estudados como sendo *Mauritia vinifera* Mart., distinguindo-os da outra variedade da mesma espécie *Mauritia flexuosa* L., sendo que atualmente ambas são reconhecidas por este último nome.

A comparação dos parâmetros químicos avaliados neste trabalho, com os dados referidos na literatura para o fruto do buriti de outras regiões do Brasil, ficou prejudicada pela falta de discriminação das variedades.

Os resultados ora obtidos sugerem um exploração intensiva dos frutos dessa palmeira, na região de coleta, para fins comestíveis, assim como uma maior divulgação de seu potencial nutritivo.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Técnico Agrícola e Vereador Osmar Ignácio e ao então Prefeito do Município de Buritizal, Antonio Delefrate, pela colaboração ao presente trabalho.

Tavares, M. et al. - Chemical composition and anatomic study of buriti fruits from Buritizal City, São Paulo State, Brazil **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 62(3): 227 - 232, 2003.

ABSTRACT. The buriti palm tree is an important native Latin American species with economic potential, but little research has been done in Brazil concerning its fruits. This paper reports on the study of the histological characteristics of the buriti fruit and the chemical composition of its pulp. The fruits having been collected from the rural zone of Buritizal City, São Paulo State, Brazil. The species was identified as *Mauritia vinifera* Mart. and distinguished from other species of the same genera by its strobiliform shape. The major nutritional components were as follows: carbohydrates, from 10,6 to 13,2 g/100g; oleic acid (72,6 to 74,6%) in the oily fraction, similar to olive oil. Vitamin C and calcium were in accordance with literature data, while the pH values were higher. It's suggested a rational exploration of the buriti palm in its region of origin, concentrating specifically on the nutritional value of its fruit pulp.

KEY WORDS. palmas, buriti, *Mauritia*, chemical composition, histology, fatty acids.

REFERÊNCIAS

1. A biblioteca virtual do estudante brasileiro. **Acervo-Frutas no Brasil:buriti.** [http://www.bibrvit/buriti.futuro.usp.br/acervo/paradidat/frutas/buriti/buriti.html] 9 janeiro 2001.
2. Aguiar, J. **Tabela de composição de alimentos da Amazônia.** INPA/CNCS, Manaus, 1998. 4p.
3. American Oil Chemists' Society. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society.** 4th ed. Champaign, AOCS, 1990. (AOCS Recommended Practice Cd 1c-85).
4. Brinquedos de miriti. [http://www.cpgp.ufpa.br/gibi/bm.htm] 11 setembro 2003.
5. Base de dados tropical. **Municípios do Estado de São Paulo: Buritizal.** [http://www.bdt.org.Br/iScan]. 9 janeiro 2001.
6. Brasil. Ministério da Indústria e do Comércio. Secretaria de Tecnologia Industrial. **Produção de combustíveis líquidos a partir de óleos vegetais.** Brasília, STI/CIT, 1985. cap. 5, p. 135-60. (Documentos, 16).
7. Brasil. Leis, decretos, etc. Portaria n° 33/98 da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. **Diário Oficial**, Brasília, 30 mar. 1998. Seç. I, n° 60-E, p. 5-6. Adota os valores constantes das tabelas do anexo desta portaria como níveis de IDR (Ingestão Diária Recomendada) para as vitaminas, minerais e proteínas.
8. Brasil. Leis, decretos, etc. Resolução n° 482/99 da Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Diário Oficial**, Brasília, 13 out. 1999. Seç. I, n° 196-E, p. 82-7. Aprova o regulamento Técnico referente a Óleos e Gorduras Vegetais, constante do anexo desta Resolução. (Anexo 13 – Azeite de oliva).
9. Brazmazon. **Buriti.** [http://www.brazmazon.com.br/ingles/produtos/oleos/buriti.htm]. 9 janeiro 2001.
10. Cavalcante, P. B. **Frutos comestíveis da Amazônia.II.** Belém, Museu Paraense Emílio Goeldi, 1974. p. 37-39. (Publicações avulsas n° 27).
11. Citybrazil. **Números gerais Buritizal.** [http://www.citybrasil.com.br/sp/buritizal/]. 15 janeiro 2001.
12. Codex Alimentarius Commission. **Fats, oils and related products.** 2nd ed. Rome: FAO/WHO, 1993. v. 8, p. 41-7.
13. Contreras-Guzman, E. Determinação de ácido ascórbico (vitamina C), por redução de íons cúpricos. **Quím. Nova**, 7(2): 60-4, 1984.
14. Corrêa, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil.** Rio de Janeiro, Imprensa Nacional, 1984. p. 338-40.
15. Cruz, G.L. **Dicionário de plantas úteis do Brasil.** Rio de Janeiro, Civilização Brasileira. 3^o ed. 1985. p. 122.
16. Franco, G. **Tabela de composição química de alimentos.** 8^a ed. Rio de Janeiro, São Paulo, Atheneu, 1989. p. 75, 118.
17. 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.
18. Gomes, R. P. **Fruticultura brasileira.** São Paulo, Nobel, 1973. p. 128-9.
19. Hiane, P. A. *et al.* Composição centesimal e perfil de ácidos graxos de alguns frutos nativos do Estado de Mato Grosso do Sul. **Bol. CEPPA**, 10(1): 35-42, 1992.
20. Instituto Adolfo Lutz. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** 3^a ed. São Paulo, IMESP, 1985. v.1, p. 21-54, 266.
21. Instituto Plantarum de Estudos da Flora. **Buriti.** [http://www.plantarum.com.br/buriti.html]. 9 janeiro 2003.
22. Lognay, G. Investigaciones sobre el aceite de *Mauritia flexuosa* L. **Grasas y aceites**, 38(5): 303-7, 1987.
23. Lorenzi, H. **Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil.** Nova Odessa, Plantarum, 1992. p. 281.

24. Lorenzi, H. **Palmeiras no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa, Plantarum, 1996. p. 112.
25. Mariath, J.G.R et al. Vitamin A activity of buriti (*Mauritia vinifera* Mart.) and its effectiveness in the treatment and prevention of xerophthalmia. **Am. J. Clin.Nutr.**, 49:849-53, 1989.
26. Peixoto, A. R. **Plantas oleaginosas arbóreas**. São Paulo, Nobel, 1973. p. 155-167.
27. Serruya, H.; Bentes, M. H. S. Chemometrics classification of Palmae family fruit oils. In: INTERNATIONAL MEETING ON FATS & OILS TECHNOLOGY, SYMPOSIUM AND EXHIBITION, Campinas-SP, 1991. p. 206-8.
28. Silva, S. **Frutas-Brasil**. São Paulo, Empresa das Artes, 1991. p. 46-47.
29. Soares, E.F. et al. Caracterização do óleo da polpa de buriti (*M. vinifera*). In: XIV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, São Paulo-SP, 1994. **Programa e Comunicações Científicas**. [poster 7.51]. p. 192.
30. Souza, M. do C. P. et al. Amadurecimento natural e artificial do buriti. **Pesq. Agropec. Bras.**, 19(7):891-6, 1984.
31. Stansby, M.E.; Lemon, J.M. Quantitative determination of oil in fish flesh. **Ind. Eng. Chem.**, 9(7):341-3, 1937.
32. Tratado de Cooperación Amazónica. In: Secretaria Pro-Tempore – TCA, ed. **Frutales y hortalizas promisorios de la Amazonia**. Lima, Secretaria Pro-Tempore - TCA, s.p. [<http://amazonas.rds.org.co/libros/44/texto.htm>]. 9 janeiro 2001.
33. Vallilo, M.I. et al. Composição química e o perfil de ácidos graxos das sementes de quatro espécies de palmeiras cultivadas no Estado de São Paulo. **Rev. Inst. Flor.**, São Paulo, 13:147-54, dez. 2001.

Recebido em 14/03/2003 ; Aprovado em 12/11/2003

Isolamento de micobactérias em espécimes clínicos, utilizando o sistema automatizado MB/BacT™.

Mycobacteria isolation in clinical specimens using the MB/BacT™ system.

Dalva C. G. AILY²
Daisy N. SATO³

Maria Conceição MARTINS¹
Maria Alice da Silva TELLES¹

Rede Estadual de Laboratórios da Tuberculose

RIALA6/964

Aily, D.C.G. et al. - Isolamento de micobactérias em espécimes clínicos, utilizando o sistema automatizado MB/BacT™. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 62(3): 233 - 237, 2003.

RESUMO. O aumento da incidência da tuberculose e outras micobacterioses têm demonstrado a importância de se isolar e identificar rapidamente as micobactérias. No período de março a dezembro de 2000 foram avaliados 791 espécimes clínicos coletados de pacientes com sorologia positiva para HIV. O sistema MB/BacT™ detectou 30,0% de amostras positivas, enquanto o meio Löwenstein Jensen 19,0%. As identificações das micobactérias foram realizadas pelo sistema molecular de DNA AccuProbe ou por provas fenotípicas. O Sistema Automatizado MB/BacT™ foi mais sensível e rápido para o isolamento de micobactérias que o método tradicional e, acoplado a um sistema de identificação molecular, poderá ser uma ferramenta útil para o Programa de Controle da Tuberculose.

PALAVRAS-CHAVE. *Mycobacterium tuberculosis*, diagnóstico, coinfeção TB/HIV, MB/BacT™.

Rede Estadual de Laboratórios para o Diagnóstico e Controle da Tuberculose: Cacilda Rosa Cardoso da SILVA³; Cristina Abade MARABINI²; Heloisa Silveira Paro PEDRO⁴; José Peixoto HENARES³; Maria Izabel F. PEREIRA⁴; Maria Izilda Tavares PINI³; Maria Lúcia Ferreira OLIVEIRA²; Maria do Rosário Assad GOLONI⁴; Rosângela Mendes SILVA².

1 - Instituto Adolfo Lutz - Laboratório Central

2 - Instituto Adolfo Lutz - Laboratório I de Campinas

3 - Instituto Adolfo Lutz - Laboratório I de Ribeirão Preto

4 - Instituto Adolfo Lutz - Laboratório I de São José do Rio Preto

INTRODUÇÃO

A disseminação da tuberculose acompanhou o desenvolvimento dos grandes centros urbanos e dos aglomerados populacionais e seu controle só foi possível com a identificação de seu modo de transmissão e a produção de drogas eficazes para o seu tratamento¹².

Com o advento da AIDS esse quadro teve uma alteração significativa, pois a infecção pelo HIV é o maior fator de risco conhecido para o desenvolvimento da tuberculose. A incidência de adoecimento num indivíduo HIV positivo é de 7 a 10% ao ano, enquanto que no HIV negativo é de 10% ao longo de sua vida¹³.

As técnicas bacteriológicas para detecção do *Mycobacterium tuberculosis* são importantes tanto para a confirmação do diagnóstico quanto para o controle de tratamento da doença. A microscopia é de baixo custo, altamente reproduzível, possibilita fornecimento rápido do resultado mas apresenta uma baixa sensibilidade quando comparada com o isolamento das micobactérias, em meio de cultura sólido ou líquido^{3,6,14}.

A cultura de micobactérias é importante pois permite o diagnóstico de casos paucibacilares, cuja positividade não é detectada pela microscopia, possibilita a identificação das espécies e a realização do teste de susceptibilidade às drogas. A principal desvantagem, quando se usa os métodos convencionais, é a demora de 30 a 60 dias para obtenção do resultado¹¹.

Na tentativa de isolamento mais rápido das micobactérias, foi proposto na década de 1980 o sistema BACTEC 460TB®, baseado na detecção de gás carbônico (CO₂) marcado com ¹⁴C. Esta técnica, por ser semi-automatizada e radiométrica, apresentou uma série de desvantagens que impediu o seu uso em larga escala⁵.

Recentemente, vários métodos não radiométricos e com monitoramento contínuo de crescimento bacteriano foram avaliados no sentido de diminuir o tempo entre a suspeita clínica e a detecção das micobactérias^{1,10,11}.

Após o isolamento, para a identificação rápida das espécies patogênicas ou potencialmente patogênicas, têm sido proposto o uso de sondas de DNA^{1,4,9}.

O Sistema Automatizado MB/BacT™ para o isolamento de micobactérias e a sonda Accuprobe™ para a identificação das espécies, foram implantados nos laboratórios do Instituto Adolfo Lutz de Campinas, Ribeirão Preto e São José do Rio Preto, pelo Programa Estadual de DST/AIDS, para aprimorar e agilizar o diagnóstico da tuberculose em pacientes com resultado positivo no teste HIV e que foram atendidos nessas regiões que apresentam grande número de casos de co-infecção TB/HIV.

O objetivo desse estudo foi comparar a taxa de isolamento e o tempo de detecção de micobactérias em espécimes clínicos de pacientes com resultado positivo no teste HIV, analisando os resultados obtidos com o sistema MB/BacT™

e o método convencional com meio de Löwenstein-Jensen (LJ).

MATERIALE MÉTODOS

Amostras

Foram processados pelos dois métodos 791 espécimes clínicos de origem pulmonar, coletados de pacientes com resultado positivo nos testes sorológicos para HIV, atendidos em Unidades Básicas de Saúde e Hospitais de Campinas, Ribeirão Preto e São José do Rio Preto entre março a novembro de 2000, conforme protocolo de implantação do sistema MB/BacT™, definido pela Coordenação do Programa Estadual de DST/AIDS.

Baciloscopia

Os esfregaços feitos a partir dos espécimes clínicos, foram corados pelo Método de Ziehl-Neelsen e observados ao microscópio óptico comum^{3,6}.

Isolamento

Os espécimes biológicos após descontaminação com N-acetil-L cisteína/NaOH foram semeados em meio de Löwenstein-Jensen (LJ), LJ acrescido de ácido p-nitrobenzóico (LJ-PNB) e Middlebrook 7H9 do sistema MB/BacT™. Os frascos de LJ e LJ-PNB foram incubados em estufa bacteriológica a 37°C e os frascos de Middlebrook 7H9 foram incubados no sistema MB/BacT™, que consiste de estufa bacteriológica com monitoramento contínuo de crescimento. As culturas positivas, foram confirmadas quanto à presença de bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR), pela observação de esfregaços corados pelo método de Ziehl-Neelsen^{3,6}. As culturas do sistema MB/BacT™ onde se detectou presença de microrganismos contaminantes ou presença de BAAR e microrganismos contaminantes foram descontaminadas pelo método de Petroff modificado³ utilizando NaOH 4,0% e semeadas em novo meio de cultura do sistema MB/BacT™.

Identificação

As espécies dos complexos *M. tuberculosis* (MT) e *M. avium* (MAC) foram identificadas pelo sistema DNA Accuprobe™. O crescimento em meio de LJ-PNB foi usado para a classificação presuntiva rápida das demais espécies, que foram posteriormente identificadas com os métodos fenotípicos^{2,3,6}.

RESULTADOS

Com o sistema MB/BacT™ foram detectadas 237 (30,0%) culturas positivas para micobactérias sendo que 135 (17,1%) apresentaram resultado positivo na baciloscopia direta e 102 (12,9%) apresentaram resultado negativo (Tabela 1). Com o meio de LJ foram detectadas 155 (19,0%) culturas positivas para micobactérias.

O tempo médio de detecção das micobactérias no sistema MB/BacT™ foi 10,7 dias (2,5 a 60 dias) e no meio LJ foi

Tabela 1. Isolamento de micobactérias a partir de espécimes clínicos nos meios de Löwenstein Jensen e Middlebrook 7H9 do sistema MB/BacT™.

MEIOS DE CULTURA	TOTAL DE AMOSTRAS	RESULTADOS		
		POSITIVO (%)	NEGATIVO (%)	CONTAMINADO (%)
Middlebrook 7H9 do MB/BacT™	791	237 (30,0%)	486 (61,4%)	68 (8,6%)
Löwenstein-Jensen	791	155 (19,0%)	420 (53,1%)	216 (27,3%)

28 dias (15 a 42 dias).

A identificação fenotípica ou genotípica das espécies foi inconclusiva em 22 culturas positivas. Nas demais os resultados obtidos foram: 136 *M. tuberculosis*, 43 complexo *M. avium*, 9 *M. chelonae*, 12 *M. fortuitum*, 1 *M. kansasii*, 1 *M. terrae*, 7 *M. gordonae*, 1 *M. peregrinum*, 1 micobactéria de crescimento lento escotocromógena e 4 micobactérias de crescimento lento acromógenas.

DISCUSSÃO

A detecção e identificação rápida das micobactérias em amostras biológicas é importante para o início de um tratamento adequado do paciente com tuberculose pulmonar ou micobacteriose.

Essa agilização é decisiva para o início de uma intervenção adequada para os pacientes com co-infecção TB-HIV que apresentam grande porcentagem de amostras paucibacilares. Além disso, nesses pacientes é mais frequente a ocorrência de doença causada por micobactérias não tuberculosas.

Nesse estudo, avaliou-se o desempenho do sistema MB/BacT™ em comparação com o isolamento em meio de Löwenstein-Jensen (LJ). O tempo médio de detecção das micobactérias foi menor nesse sistema quando comparado com o meio LJ. No caso de amostras paucibacilares, o tempo médio de crescimento no MB/BacT™ foi de 10 dias enquanto que no LJ foi de 28 dias. Segundo a OMS¹⁵ uma das desvantagens da cultura em meio de LJ, principalmente quando os espécimes biológicos são paucibacilares, é a detecção tardia do crescimento das micobactérias o que demonstra a vantagem da utilização do sistema automatizado.

Além disso, a taxa de detecção de micobactérias com o sistema MB/BacT™ foi 11,2% maior do que com o método tradicional de isolamento (LJ).

Com o sistema MB/BacT™ foram detectadas 237 culturas positivas para micobactérias e com o meio de LJ foram detectadas

65,4% dessas culturas. Não foi observado crescimento de micobactérias apenas no LJ.

A porcentagem de detecção com o LJ foi próxima à dos estudos de Piersimoni et al.⁸ e de Alcaide et al.¹ que relataram respectivamente 64,2% e 70% de positividade com os meios a base de ovos. Porém, bem menor que o observado por Rohner et al.¹¹ e Manterola et al.⁷ que relataram 79,5% e 92,5% respectivamente. Nestes estudos, com maiores taxas de crescimento em meio sólido, observamos que foram usados dois tipos de meio para o isolamento de micobactérias: LJ e Coletsos ou Stonebrink e Coletsos, possivelmente por essa razão, a porcentagem de positividade em relação à do sistema automatizado foi maior.

Em relação à porcentagem de contaminação das culturas por outros microrganismos foi inicialmente observado 24,0% para o meio MB/BacT™ e 27,3% para o LJ. A menor porcentagem de contaminação no sistema MB/BacT™ pode ser explicada pelo uso de antibiótico no meio de cultura desse sistema.

Neste estudo foi utilizado o método de N-acetil-L cisteína/NaOH, indicado pelo fornecedor do Sistema MB/BacT™, para descontaminação dos espécimes biológicos. Esse método por ser menos drástico possibilita melhor recuperação das micobactérias em cultura. Porém, por essa mesma razão, uma contaminação excessiva pode ocorrer em determinados casos¹⁵. Os resultados obtidos sugerem a realização de estudos em paralelo deste método com o de Petroff³, mais usado no Brasil, para comparar a taxa de contaminação e de positividade com ambos e adequar o uso do sistema MB/BacT™ à nossa realidade.

As culturas no MB/BacT™ em que se detectou presença de microrganismos contaminantes ou presença de BAAR e microrganismos contaminantes foram retratadas, o que possibilitou o aumento de 4,7% de culturas positivas (Figura 1). Após o retratamento, a porcentagem de contaminação no MB/BacT™ foi de 8,6%.

O retratamento das culturas do meio LJ não foi possível e esse fato pode ter influenciado o total de positividade com esse meio. O crescimento de determinados microrganismos no meio de LJ geralmente o liquefaz ou estes se espalham por toda a sua superfície em 24 horas, impossibilitando o crescimento

concomitante das micobactérias. Essas culturas são descartadas e esta é outra desvantagem citada pela OMS quanto à utilização desse meio¹⁵.

A identificação rápida e precisa das espécies mais freqüentes pertencentes aos complexos *M. tuberculosis* e *M. avium*, foi realizada pelo sistema molecular AccuProbe™ em 77,0% e 91,9% das culturas respectivamente. Quando os testes foram negativos para essas espécies ou no caso de solicitação do perfil de susceptibilidade às drogas, as culturas foram encaminhadas ao Laboratório Central do Instituto Adolfo Lutz para identificação com os testes fenotípicos.

O sistema MB/BacT™, com detecção automatizada do crescimento bacteriano, fornece um resultado mais rápido e sensível que o método tradicional que utiliza meio de cultura sólido à base de ovos. Este sistema acompanhado da identificação molecular poderá ser uma ferramenta útil para o Programa de Controle de Tuberculose, agilizando a identificação das espécies mais freqüentes e possibilitando uma intervenção rápida no tratamento dos pacientes com co-infecção HIV/TB.

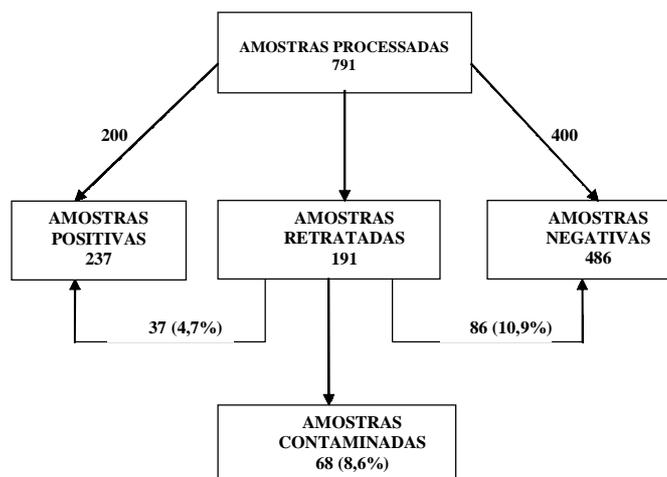


Figura 1. Contribuição do sistema MB/BacT™ na detecção de micobactérias em espécimes biológicos – Estado de São Paulo, 2000.

RIALA6/964

Aily, D.C.G. et al. - Mycobacteria isolation in clinical specimens using the MB/BacT™ system. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 62(3): 233 - 237, 2003.

ABSTRACT. The increasing incidence of tuberculosis and other mycobacterial diseases has made it essential for laboratories to quickly detect and identify mycobacteria. A total of 791 clinical specimens were collected from patients who were HIV positive, between March and December 2000. The MB/BacT™ system has detected 30.0% of mycobacterial isolates, while 18.8% were detected by Löwenstein-Jensen medium. The automated MB/BacT™ system was more sensitive and rapid than the traditional method for mycobacterial recovery. The MB/BacT™ system plus a DNA AccuProbe identification method could be a useful tool for the TB Control Program in rapid diagnosing TB cases among HIV positive patients.

KEY WORDS. *Mycobacterium tuberculosis*; diagnostic; infection TB/HIV; MB/BacT™.

REFERÊNCIAS

1. Alcaide, F. et al. Evaluation of the BACTEC MGIT 960 and the MB/BacT systems for recovery of mycobacteria from clinical specimens and for species identification by DNA AccuProbe. *J. Clin. Microbiol.*, 38 (1): 398-401, 2000.
2. Badak, F. Z. et al. Use of nucleic acid probes for identification of *Mycobacterium tuberculosis* directly from MB/BacT bottles. *J. Clin. Microbiol.*, 37 (5): 1602-1605, 1999.
3. BRASIL, Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Centro de Referência Professor Hélio Fraga. **Manual de Bacteriologia da Tuberculose**, 2ª edição, Rio de Janeiro, 1994.
4. Brunello, F.; Favari, F.; Fontana, R. Comparison of the MB/BacT and BACTEC 460 TB systems for recovery of mycobacteria from various clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.*, 37 (4): 1206-1209, 1999.
5. Conville, P. S. & Witebsky, F. G. Inter-bottle transfer of mycobacteria by the BACTEC 460. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 12: 401-405, 1989.
6. Kent, P. T. & Kubica, G. P. **Public Health Mycobacteriology: a guide for the level III laboratory**. Atlanta, US Department of Health and Human Services, 1985.
7. Manterola, J.M. et al. Comparison of a non radiometric system with BACTEC 12B and Culture on Egg-Based Media for Recovery of Mycobacteria from clinical specimens. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 17:773-77, 1998.
8. Piersimoni et. al. Comparison of MBBacT Alert 3D System with radiometric BACTEC system and Löwenstein-Jensen medium for recovery and identification of mycobacteria from clinical specimens: A multicenter study. *J. Clin. Microbiol.*, 39:651-57, 2001.
9. Roberts G.D.; Bottger E.C.; Stockman L. Methods for the rapid identification of mycobacterial species. *Clinics Lab. Med.*, 16(3):603-13, 1996.
10. Roggenkamp, A. et al. Comparison of MB/BacT and the BACTEC 460 TB systems for recovery of mycobacteria in a routine diagnostic laboratory. *J. Clin. Microbiol.*, 37 (11): 3711-3712, 1999.
11. Rohner, P. et al. Evaluation of the MB/BacT system in comparison to the BACTEC 460 system and solid media for isolation of mycobacteria from clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.*, 35(12):3127-3131, 1997.
12. Rosemberg, J. Tuberculose Panorama Global, óbices para o seu controle. Secretaria da Saúde do Estado do Ceará – 1999.
13. São Paulo, Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac”. (**Informe Técnico – Campanha Estadual de Busca de Casos de Tuberculose**). Alerta TB/ 1998.
14. Wolinsky, E. Conventional diagnostic methods for tuberculosis. *Clin. Infect. Dis.*, 19: 396-401, 1994.
15. World Health Organization. (**Laboratory Services in Tuberculosis Control**.) Part III: Culture. Geneva 1998.

Recebido em 07/08/2003 ; Aprovado em 11/12/2003



Composição e qualidade de pólen apícola comercializado em algumas cidades nos estados de São Paulo e Minas Gerais – Brasil

Composition and quality of bee-collected pollen commercialized in some country towns in São Paulo and Minas Gerais - Brazil

Deborah H. M. BASTOS^{1*}
Cássia I. ROCHA²,
Ildenize B. da S. CUNHA²,
Patricia de O. CARVALHO²,
Elizabeth A. S. TORRES¹

RIALA6/965

Bastos, D. H. M. et al. - Composição e qualidade de pólen apícola comercializado em algumas cidades nos estados de São Paulo e Minas Gerais – Brasil. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 62(3): 239 - 244, 2003.

RESUMO. Pólen apícola tem seu uso recomendado como suplemento alimentar. Dados a respeito das condições higiênico-sanitárias de pólen produzido no Brasil e de sua composição são escassos. Nesse trabalho foram determinados os teores de umidade, proteínas, lipídeos, cinzas, o pH e a atividade de água de vinte e uma amostras de pólen de abelhas (*Apis mellifera*) adquiridas no comércio ou de apiários do sul de Minas Gerais e do estado de São Paulo. O teor de umidade encontra-se acima do estabelecido pela legislação. Os teores de proteínas e lipídeos estão dentro da faixa estabelecida pela legislação. Três amostras apresentaram teores de cinzas em desacordo com as normas. Os altos níveis de umidade e atividade de água encontrados indicam que há falhas no processo de desidratação e/ou armazenamento das amostras. O pólen apícola produzido na região sudeste do Brasil pode ser utilizado como complemento alimentar tendo em vista seu alto teor de lipídeos e proteínas, desde que as condições microbiológicas estejam adequadas.

PALAVRAS-CHAVE. polen apícola; composição; análise centesimal; qualidade

*Endereço para correspondência:

¹ Departamento de Nutrição, Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, Av. Dr. Arnaldo, 715. CEP 01246-904 São Paulo. E-mail dmbastos@usp.br

² Faculdade de Farmácia - Universidade São Francisco,

Av. São Francisco de Assis, 218. Caixa Postal 163. CEP 12916-900. Bragança Paulista, SP.

INTRODUÇÃO

O pólen coletado pelas abelhas é utilizado na colméia como fonte de proteína. A abelha aglutina-o com a sua saliva, que contém diversas enzimas, para que possa ser fixado nas suas corbículas (cestas das patas traseiras) e transportado para a colméia. Apresenta elevado valor nutritivo com uma composição aproximada de 40% de carboidratos, 35% de proteínas, 5% de água, 5% de lipídeos e 5 a 15% de outras substâncias. Na sua composição encontram-se numerosos aminoácidos (histidina, leucina, isoleucina, triptofano, valina, lisina e alguns outros) e algumas vitaminas do complexo B, A, C, D e K^{3,9}. O pólen contém ainda substâncias antibióticas, ativas sobre espécies de *Colibacilos* e certas espécies de *Proteus* e *Salmonellas*, além de substâncias antioxidantes. Popularmente, o consumo de pólen é indicado para o combate ao stress, depressão, anemia, baixa tolerância do sistema imunológico, fraqueza de memória, alto índice de colesterol, disfunção intestinal (constipação ou diarreia), problemas de próstata, impotência, entre outros. É dito também que esse produto é eficaz no combate ao envelhecimento e no desenvolvimento da massa muscular^{8,10}. Indica-se o consumo de pólen granulado (desidratado) diariamente, em quantidades que variam de 1 a 3 colheres de chá por dia (5 a 25 g por dia), misturado ou não a outro alimento como iogurte, mel, suco de frutas e outros^{8,10}. Orzaez et al.¹¹ estudaram a composição e o valor calórico de 15 amostras e verificaram que, em função de seu teor de lipídios e carboidratos esse produto constitui-se em interessante suplemento alimentar.

O Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Pólen Apícola⁶ define pólen apícola como o resultado da aglutinação do pólen das flores, efetuada por abelhas operárias, mediante néctar e suas substâncias salivares, o qual é recolhido no ingresso da colméia e o classifica em a) *pólen apícola* que é o produto coletado em sua forma original que deve conter no máximo 30% de umidade e b) *pólen apícola desidratado* que é o produto submetido ao processo de desidratação em temperatura superior a 42°C e com teor de umidade não superior a 4%.

O aumento da demanda por produtos naturais e por produtos orgânicos têm despertado o interesse dos apicultores para a produção de pólen. Embora não tenham sido encontrados dados sobre o montante produzido no Brasil nos últimos anos, é fato que o clima e a flora apícola do Brasil favorecem esse tipo de atividade, a qual tem sido amplamente incentivada pelas associações de apicultores.

Estimular a produção de pólen requer, conseqüentemente, monitorar sua qualidade físico-química e higiênico-sanitária. O presente trabalho teve como objetivo analisar alguns parâmetros físico-químicos de amostras de pólen apícola comercializadas na região do sul de Minas Gerais e no estado de São Paulo para verificar sua adequação aos parâmetros estabelecidos pela legislação.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostragem

Vinte e duas amostras de pólen foram adquiridas em diversas localidades do sul do estado de Minas Gerais e do estado de São Paulo. Uma amostra (A2) foi classificada pelo próprio apicultor como pólen apícola, em sua forma original, e as demais, comercializadas como pólen apícola desidratado. As embalagens apresentaram pesos variando entre 50 e 150 gramas. Algumas amostras apresentavam-se granuladas e outras em cápsulas de cerca de 0,6g (Tabela 1).

As amostras foram armazenadas em freezer a -10°C até o momento das análises, quando foram trituradas utilizando-se multi-processador marca ARNO, modelo PRO e tamizadas usando-se malha 24 (ASTM) a fim de padronizar o tamanho das partículas.

Composição centesimal das amostras

O teor de umidade foi determinado pelo método de Karl Fischer⁴ utilizando-se um aparelho METROHM, modelo 701-KF-TITRINO. O teor de cinzas foi determinado por calcinação em mufla a 600°C segundo a AOAC¹. O teor de proteínas foi determinado por Micro-Kjedahl utilizando-se como fator de conversão N x 5,6¹². O teor de lipídeos foi determinado pelo método modificado de Bligh-Dyer².

Atividade de água (Aw)

A Aw foi determinada à temperatura de 25,00±0,02°C utilizando-se aparelho Aqualab-Decagon Devices Ins., modelo CX-2, expressando a razão entre a pressão de água do alimento e a pressão de vapor da água livre.

pH

A determinação foi feita utilizando-se pHmetro HANNA INSTRUMENTS, modelo HI 9321, segundo o método da AOAC¹.

As determinações do teor de cinzas, lipídios e proteínas foram realizadas em triplicata para cada amostra e o resultado está expresso como média ± desvio padrão. A determinação do teor de umidade, pH e atividade de água foram efetuadas em uma única determinação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teor de umidade das amostras variou de 5,6 a 19,3% (Tabela 2). A amostra que apresentou maior teor de umidade refere-se a “pólen apícola”, e portanto encontra-se nos limites impostos pela legislação, todas as demais amostras estavam sendo comercializadas como “pólen apícola desidratado”, e portanto, em desacordo com o estabelecido pela legislação para esse produto (4% de umidade). O alto teor de umidade deve ser resultado da forma de desidratação do pólen empregada por alguns apicultores tais como: secadores de cabelo, forno à gás, forno microondas.

Tabela 1. Pólen (origem, data de aquisição, embalagem e prazo de validade especificados pelos fornecedores) das regiões do sul de Minas Gerais e estado de São Paulo coletadas nos anos de 1999 e 2000

Amostras	Origem	Data de aquisição mês/ano	Tipo de embalagem**	Prazo de validade
A1	B. Paulista/SP	1/2000	Vidro	2 anos
A2*	Bananal/SP	1/2000	Polietileno	Nc
A3	Cambuquira/MG	3/2000	Vidro	2 anos
A4	Cambuquira/MG	3/2000	Vidro	2 anos
A5	Cambuquira/MG	3/2000	Vidro	2 anos
A6	S ^{ta} Bárbara/SP	3/2000	Vidro	1/2002
A7	Toledo/MG	3/2000	Vidro	Nc
A8	Lavras/MG	4/2000	Polietileno	4/10/2002
A9	S. Lourenço/MG	3/2000	Polietileno	1/03/2001
A10	Varginha/MG	3/2000	Polietileno	Nc
A11	B. Paulista/SP	4/2000	Vidro	18 meses
A12	B. Paulista/SP	3/2000	Vidro	2 anos
A13	S. Lourenço/MG	4/2000	Polietileno	2 anos
A14	S. Lourenço/MG	4/2000	Polietileno	2 anos
A15	S. Lourenço/MG	3/2000	Polietileno	2 anos
A16	S ^{ta} Bárbara/SP	3/2000	Vidro	1/2002
A17	Varginha/MG	5/2000	Polietileno	Nc
A18	Cambuquira/MG	5/2000	Vidro	2 anos
A19	Três Pontas/MG	6/2000	Polietileno	6 meses
A20	Rib. Preto/SP	5/1999	Polietileno	08/00
A21	B. Paulista/SP	6/2000	Vidro	2 anos
A22	Campanha/MG	6/2000	Vidro	Nc

Nc - não consta prazo de validade do produto

* Amostra A2 corresponde a pólen apícola pois foi cedida pelo apicultor antes do processo de desidratação. As demais foram adquiridas no comércio como pólen apícola desidratado

** Amostra A4 corresponde a pólen em cápsulas, as demais são amostras granuladas

A maioria dos pequenos apicultores não dispõe de recursos visando o cumprimento de requisitos estabelecidos pelos órgãos do Ministério da Agricultura, que estabelece o uso de secadores providos de bandejas sobrepostas e perfuradas com controle de temperatura e sistema de circulação de ar para secagem do pólen, além de sala de processamento onde alguns equipamentos são necessários para manter a umidade relativa do ar em 40%. As informações sobre os diferentes procedimentos que os apicultores utilizam para a desidratação de pólen, nas mesmas localidades de coleta das amostras, foi obtida verbalmente e/ou através de observação *in situ*, em visitas aos apiários.

Os valores de atividade de água situaram-se entre 0,3 e 0,6 e são consistentemente maiores que os obtidos por Bonvehi e Jordá⁵ para amostras de pólen da Espanha, que obtiveram valores entre 0,26 a 0,28. O desenvolvimento de microrganismos é bastante favorecido em atividades de água ao redor de 0,6, faixa em que outras reações (enzimáticas e químicas) também são favorecidas, o que pode ocasionar oxidação lipídica e escurecimento, dependendo das enzimas presentes, diminuindo o valor biológico desse produto e causando alterações sensoriais indesejadas (escurecimento e oxidação). Entre os potenciais riscos de consumo de um material nutritivo com altos

teores de atividade de água e armazenados à temperatura ambiente está a contaminação por fungos potencialmente produtores de micotoxinas carcinogênicas⁷.

O teor médio de cinzas variou, nas amostras analisadas, de 1,5 a 4,8% aproximando-se dos valores citados por Youssef et al¹³ que avaliaram amostras de pólen de *Trifolium alexandrinum*, *Zea mays*, *Vicia faba* e *Brassica sp Kaber*, obtendo teores de cinzas entre 2,7 a 5,7%. Bonvehi e Jordá⁵ encontraram valores entre 1,6 e 2,2% em 20 amostras de pólen coletadas na Espanha. A legislação brasileira estabelece que o teor de cinzas de pólen apícola deve ser no máximo de 4% m/m na base seca. Três amostras estão fora da especificação (A10, A17 e A21). É possível que a variação observada seja característica da flora apícola nas localidades de produção. Outra possibilidade é a poluição ambiental, que por vezes responde pelo alto teor de cinzas encontrado em produtos apícolas. Como dados a respeito da composição de pólen apícola coletado no Brasil são praticamente inexistentes, é impossível precisar se as amostras (A10, A17 e A21) fogem aos limites impostos pela legislação por que a mesma é baseada em resultados de pólen produzidos em outros países ou se, o alto teor de cinzas deve-se a outros fatores.

Tabela 2. Teor de umidade, Cinzas (% na base seca), lipídios (% na base seca), proteínas (% na base seca), atividade de água (Aw) e pH de amostras de pólen apícola*

Amostra	Umidade	Cinzas	Lipídios	Proteína	pH	Aw
A1	9,9	3,1 (0,04)	9,1 (0,04)	21,7 (1,11)	4,6	0,5
A2	19,3	2,5 (0,28)	6,3 (0,09)	27,8 (1,87)	3,8	0,4
A3	6,7	2,0 (0,00)	9,1 (0,25)	16,0 (0,32)	4,6	0,4
A4	6,3	2,0 (0,02)	9,4 (0,09)	15,8 (0,40)	4,5	0,4
A5	6,1	2,0 (0,02)	10,6 (0,43)	23,0 (0,42)	4,3	0,5
A6	9,2	3,2 (0,04)	6,5 (0,01)	20,3 (0,39)	4,8	0,5
A7	10,1	2,8 (0,06)	14,0 (0,09)	22,2 (0,23)	4,2	0,5
A8	12,0	2,3 (0,17)	10,1 (0,06)	20,3 (0,53)	4,1	0,5
A9	9,9	2,8 (0,01)	7,2 (0,37)	21,6 (0,34)	4,5	0,5
A10	8,4	4,8 (0,02)	9,4 (0,15)	18,9 (0,92)	5,4	0,4
A11	10,7	1,7 (0,00)	10,7 (0,09)	16,3 (0,40)	5,5	0,4
A12	11,3	3,2 (0,04)	7,9 (0,07)	22,6 (0,39)	4,6	0,5
A13	10,0	2,8 (0,02)	7,3 (0,32)	22,6 (0,43)	4,2	0,5
A14	10,0	2,7 (0,02)	6,1 (0,05)	22,9 (0,42)	4,2	0,5
A15	10,5	2,8 (0,00)	7,5 (0,19)	24,5 (0,28)	4,2	0,5
A16	6,5	3,5 (0,02)	6,5 (0,09)	21,2 (1,85)	4,6	0,3
A17	6,0	4,6 (0,02)	9,9 (0,05)	21,8 (0,00)	5,3	0,3
A18	9,0	2,4 (0,00)	7,8 (0,07)	27,5 (0,16)	4,9	0,3
A19	7,3	1,5 (0,02)	9,0 (0,12)	16,9 (0,42)	4,7	0,4
A20	6,7	1,7 (0,03)	8,8 (0,08)	19,3 (0,69)	4,6	0,4
A21	5,6	4,5 (0,03)	9,9 (0,03)	21,3 (0,64)	5,1	0,3
A22	12,2	2,4 (0,03)	10,4 (0,01)	21,8 (0,28)	3,7	0,6

*Os números entre parênteses referem-se ao desvio padrão de triplicata

Os valores de pH das amostras analisadas variaram entre 3,7 e 5,5 e encontram-se dentro do especificado pela legislação, que estabelece pH de 4 a 6.

Quanto ao teor de lipídios, todas as amostras estão dentro dos limites especificados pela legislação que determina que esse produto deve apresentar pelo menos 1,8% m/m de lipídios na base seca (6,1% a 14,0%). Os resultados encontrados nesse trabalho são maiores que os encontrados por Bonvehi e Jordá⁵ que encontraram valores entre 4,8-7,2%.

Em relação ao teor de proteínas das amostras, os valores variaram entre 16,0 e 27,5% estando em acordo com a legislação que estabelece teor mínimo de 8% m/m na base seca. Nesse

estudo foi utilizado o fator de conversão nitrogênio-proteína N x 5,6 tendo em vista que os dados disponíveis na literatura relativamente à composição de aminoácidos e proteína de pólen identificaram ser alto o teor de aminoácidos livres e que o uso do fator de conversão N x 6,25 superestima o teor de proteína. O teor de aminoácidos livres pode chegar a cerca de 26% do teor de proteína³. Ainda assim, se o fator de conversão utilizado nesse trabalho fosse N x 6,25, os teores de proteína seriam maiores e portanto, as amostras ainda estariam em acordo com os limites impostos pela legislação. O regulamento técnico para fixação da identidade e qualidade de pólen apícola não indica o fator de conversão a ser usado⁶. Youssef et al.¹³ encontraram

valores variando entre 23,3 e 37,7% para pólen coletado em Giza, no Egito. Esses autores utilizaram o fator N x 6,25 para converter o teor de nitrogênio em teor de proteína. Bonvehi e Jordá⁵ encontraram valores entre 12,6 e 18,2% para amostras de pólen da Espanha utilizando também o fator de conversão N x 5,6. Faltam dados sobre a composição de aminoácidos de pólen coletado no Brasil que permitam a escolha do fator de conversão nitrogênio- proteína mais apropriado. A utilização do fator N x 5,6 parece ser mais apropriada, pois o pólen apícola, apesar de ser modificado pelas enzimas das abelhas, é de origem vegetal, e a utilização desse fator, ao invés de N x 6,25 fornece resultados mais conservadores, que evitam superestimar o teor de proteínas de pólen.

CONCLUSÕES

Todas as amostras comercializadas como pólen desidratado apresentaram alto teor de umidade, não estando de acordo com as normas estabelecidas pelo Ministério da Agricultura. A desidratação do pólen apícola é uma operação crítica para a obtenção de um produto que possa ser armazenado

a temperatura ambiente por vários meses, conforme consta no rótulo desses produtos. Embora não haja documentação a respeito das mais variadas formas usadas por apicultores para secar esse produto, fica claro, pelos resultados obtidos, que é necessária a educação desses apicultores quanto ao emprego de métodos de desidratação adequados, que garantam a qualidade do produto e também em relação ao armazenamento, no que se refere à utilização de embalagem adequada e condições de temperatura e umidade. Os resultados para atividade de água encontraram-se elevados, e portanto, seria prudente a realização de análises microbiológicas do produto que é armazenado à temperatura ambiente. Para os demais parâmetros analisados, as amostras enquadram-se na faixa de variação mencionada na literatura. O alto teor de proteínas e de lipídios de pólen apícola favorecem sua utilização como suplemento alimentar, porém há necessidade de investimento em pesquisas para estabelecer a composição e parâmetros de qualidade, dada a escassez de dados sobre a composição do pólen apícola produzido no Brasil. Há também necessidade de investimento no setor apícola para que o produto seja processado e comercializado em condições adequadas de umidade e atividade de água.

RIALA6/965

Bastos, D. H. M. et al. - Composition and quality of bee-collected pollen commercialized in some country towns in São Paulo and Minas Gerais - Brazil. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 62(3): 239 - 244, 2003.

ABSTRACT. Pollen collected by bees is used as a dietary supplement. Data related to the hygienic and sanitary conditions of this product, as well as its composition, are rare. In this work, the physical-chemical properties of twenty-one samples of pollen from *Apis mellifera* bees, acquired from commercial establishments or directly from bee-keepers from the São Paulo and Minas Gerais states, were determined. The physical-chemical properties analyzed were moisture, water activity, ashes and pH. Moisture content of the samples analyzed was above the limit established by legislation. Protein and lipids contents were within the limits established by legislation. Three samples presented ash contents outside of the legal standards. Pollen samples produced in southeast Brazil could be used as food supplement due to its high level of lipids and proteins if microbiological parameters were within safe limits.

KEY WORDS. pollen, composition, analysis, quality

REFERÊNCIAS

1. AOAC International - **Official Methods of Analysis of AOAC International**. AOAC International 14^a ed., 1994.
2. Bligh E.G. e Dyer J.W. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology** 37(8): 911-7,1959.
3. Bonvehi J.S.; Galindo J.G.; Pajuelo A.G. Estudio de la composición y características físico-químicas del polen de abejas. **Alimentaria**, 176: 63-7, 1986.
4. Bonvehi J.S ; Casanova T.M. Estudio analítico para determinar la humedad del polen. **Anales de Bromatología**, 39: 339-349,1987.
5. Bonvehi J.S; Jordà R.E. Nutrient composition and microbiological quality of honeybee-collected pollen in Spain. **J. Agric. Food Chem.**, 45: 725-732,1997.
6. Brasil - Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento - Instrução Normativa nº 3, de 19 de Janeiro de 2001. Regulamento Técnico para fixação de qualidade e identidade do pólen apícola. Publicado no **DOU** de 23/01/01, Seção I, págs. 18-23.
7. Jodral M. et al.. El polen apícola como sustrato para la producción de aflatoxinas. **Alimentaria**, 236: 67-68, 1992.
8. Linskens H.F. e Jorde W. Pollen as food and medicine – a review. **Economic Botany**, 51: 78-87, 1997.
9. Loper G.M. et al. Biochemistry and microbiology of bee-collected almond (*Prunus dulcis*) pollen and bee bread I - Fatty acids, vitamins and minerals. **Apidologie** ,11(1): 63-73, 1980.
10. Masson, B. **O pólen**. São Paulo: Gaia, 1994. 103 p.
11. Orzaez V.M.T. et al. The importance of bee collected pollen in the diet: a study of its composition. **Intern. J. Food Sci. Nut.**, 53(3): 217-224, 2002.
12. Rabie A.L.; Wells J.D.; Dent L.K. The nitrogen content of pollen protein. **J. Apic.Res.**, 22(2): 119-123, 1983.
13. Youssef A.M. et al. Chemical studies on pollen collected by honey bees in Giza region, Egypt. **J. Apic. Res.**, 17: 110-113, 1987.

Recebido em 07/08/2003 ; Aprovado em 11/12/2003

A questão da higiene de manipuladores das lanchonetes localizadas ao redor do campus do CEFET/Química de Nilópolis, RJ

The question of hygiene of handlers in foodservice establishments located around the campus of CEFET/Química of Nilópolis, RJ

Adriano G. da CRUZ *¹
Bruno Jorge G. LOUZA ²
Cláudio N. CORNO ⁴
Edimir FERNANDEZ-FERREIRA¹
Felipe M. TEIXEIRA³
Gabriel de O. SANTOS ²
Marco Antônio L. SOUZA ²
Olidirene R. MARTINS ²
Rodrigo S.TAVARES ²
Rosângela da C. TEIXEIRA¹

RIALA6/966

Cruz, A. G. da et al. A questão da higiene de manipuladores das lanchonetes localizadas ao redor do campus do CEFET/Química de Nilópolis, R.J. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 62(3): 245 - 248, 2003.

RESUMO. Durante o período de junho a agosto de 2002, a qualidade higiênico-sanitária dos manipuladores das lanchonetes situadas ao redor do campus do Centro Federal de Educação Tecnológica em Química - CEFET/ Química de Nilópolis - RJ (A, B, C, e D) foi avaliada através de análises microbiológicas de coliformes a 35°C (totais), coliformes a 45°C (termotolerantes), bactérias mesófilas e pesquisa de *Staphylococcus aureus*. Bactérias mesófilas foram encontradas na faixa de 10-294 UFC/ mão, coliformes totais e termotolerantes entre <3 - >2400 NMP/mão. Foi encontrado *S. aureus* no manipulador da lanchonete C. Os resultados encontrados confirmam a importância do manipulador como veículo de contaminação de alimentos e indicam potencial perigo para a Saúde Pública, pois colocam em risco a saúde das pessoas que consomem os alimentos servidos nesses estabelecimentos.

PALAVRAS-CHAVE. manipuladores, qualidade, segurança alimentar

¹ Docentes do Cefet/Química de Nilópolis - RJ

² Alunos de Curso de Química Industrial do Cefet-Química de Nilópolis -RJ

³ Graduando em Medicina Veterinária da UFRRJ

⁴ Químico Industrial - Plus-Vita Alimentos

*Endereço para correspondência: Rua Lúcio Tavares, 145 - Nilópolis
CEP: 20270-021- Rio de Janeiro - e-mail: food@globo.com

Manipuladores de alimentos são definidos como todas as pessoas que podem entrar em contato com o processo de produção de alimentos, seja de forma parcial ou total, incluindo-se os que colhem, abatem, armazenam, transportam, processam ou preparam alimentos e enquadrando-se nesse universo trabalhadores da indústria e comércio de alimentos ambulantes e até donas de casa⁵. Devido a sua importância, são parte integrante obrigatória de qualquer programa de segurança alimentar nas indústrias de alimentos e estabelecimentos que servem refeições, na medida que suas precárias condições higiênico-sanitárias podem contaminar os alimentos manuseados pelos mesmos⁸.

Wei e Chiou¹³ relatam um surto causado por *S. aureus* em uma escola tailandesa, atingindo 10 estudantes após refeição matinal, tendo como veículo os manipuladores responsáveis pelo preparo das refeições. Germano et al.⁷ afirmam que a regulamentação da profissão de manipulador de alimentos é muito importante no mundo globalizado e cita como vantagens, entre outras, desse ato uma maior capacitação de mão-de-obra em contato com o alimento e conseqüentemente um aumento da oferta de alimentos seguros e com melhor qualidade para o consumidor. Para o alcance desse objetivo, o treinamento constituiu-se como prática essencial. Um levantamento realizado com manipuladores em estabelecimentos de pequenos e médios portes que atuam no setor de carnes e laticínios na cidade de São Paulo revelou que 62,5% dos entrevistados nunca tinham recebido treinamento apesar de atuarem na área há mais de um ano, 93,8% desconheciam as reais funções das máscaras e luvas, embora as usassem e ainda tinham concepções erradas quanto

aos conhecimentos referentes ao controle de praga e microrganismos⁶.

O objetivo deste trabalho é avaliar as condições higiênico-sanitárias dos manipuladores das lanchonetes situadas ao redor do campus do CEFET/Química de Nilópolis – RJ, através de análises microbiológicas de microrganismos patogênicos à saúde humana e indicadores de higiene, visando estabelecer medidas corretivas para um melhor padrão sanitário na produção das refeições servidas por esses estabelecimentos.

Foram escolhidas as quatro lanchonetes situadas perto do CEFET/Química de Nilópolis, sendo seus manipuladores codificados por A, B, C e D. A coleta do material foi feita antes dos intervalos das aulas dos turnos da manhã e tarde, pois esse é o horário de maior fluxo de estudantes nesses estabelecimentos consumindo lanches e refeições. As amostras foram colhidas através de “swab” da superfície da palma da mão e dedo, utilizando-se água peptonada como diluente. Após a coleta, as amostras foram transportadas para o laboratório de microbiologia do CEFET/Química de Nilópolis onde realizaram-se análises microbiológicas de bactérias mesófilas aeróbias, determinação de coliformes a 35°(totais) e 45°C(termotolerantes) e a pesquisa qualitativa de *Staphylococcus aureus* segundo a metodologia recomendada pela APHA¹.

A Tabela 1 demonstra os resultados das análises microbiológicas expressos em valores mínimos e máximos de contagens bacterianas executadas nos manipuladores de alimentos.

TABELA 1 - Análises microbiológicas dos manipuladores

Manipuladores	Bactérias Aeróbias Mesófilas (UFC/mão)	Coliformes a 35°C (NMP/mão)	Coliformes a 44,5°C (NMP/mão)	<i>Staphylococcus aureus</i>
A	10 - 12	<3 – 93	<3 - 4	-
B	9 - 19	43 – 93	<3 - 43	-
C	214 – 294	460 - >2400	460 - >2400	+
D	75 – 95	<3 - <3	< 3 - < 3	-

-: ausência / +: presença

UFC: unidades formadoras de colônias

NMP: número mais provável

Os resultados encontrados sugerem uma precária qualidade higiênico-sanitária dos manipuladores, podendo ser os mesmos veículos de toxinfecções alimentares comprometendo com isso a saúde das pessoas que consomem esses alimentos. O manipulador C registrando os maiores índices de coliformes totais e termotolerantes, ambos na faixa de 460 - >2400 NMP/mão e positivo para *S. aureus*, além de alto índice de bactérias mesófilas (214 – 294 UFC/mão). Os manipuladores A e B apresentaram igualmente resultados que indicam condutas precárias do ponto de vista higiênico-sanitária, sendo encontrado uma grande variação do número de coliformes totais em ambos (<3-93 e 43-93 NMP/mão, respectivamente) e presença de coliformes termotolerantes em B (<3-43 NMP/mão), sendo ambos negativos para *S. aureus*. Nesse contexto, o manipulador D apresentou os melhores resultados, representado pelos baixos valores de coliformes termotolerantes e totais encontrados (ambos <3 NMP/mão), e por número relativamente baixo de bactérias mesófilas (75-95 UFC/mão), demonstrando não ser uma fonte de contaminação na produção de refeições e lanches, o que pode ser observado pelo cuidado na manipulação dos produtos. Registra-se contudo, que esse manipulador desconhecia totalmente práticas mínimas de higiene e manipulação de alimentos, sugerindo que caso fossem executadas um maior número de análises, resultados alarmantes poderiam ser encontrados.

Embora não existam padrões oficiais na legislação brasileira com relação aos manipuladores de alimentos, recomenda-se como padrão ausência de *S. aureus* e coliformes termotolerantes e um baixo número de coliformes totais e bactérias mesófilas. A presença de coliformes termotolerantes indicam a possibilidade de existência de patógenos entéricos associados, como *Escherichia coli*, *Salmonella sp* e *Shigella sp* tornando o alimento impróprio para o consumo humano. Da mesma forma, altos índices de bactérias mesófilas e coliformes totais evidenciam precários hábitos higiênicos, indicando

condições para a sobrevivência de patógenos que se desenvolvem à mesma temperatura de incubação. Resultados positivos para *S. aureus* alertam para o risco de toxinfecção alimentar decorrente de condições favoráveis para a multiplicação do microrganismo e a conseqüente produção de toxina no alimento¹².

Os resultados encontrados neste trabalho, entretanto, são muito semelhantes aos encontrados em experimentos anteriores, o que demonstra a importância do manipulador de alimentos em programas de segurança alimentar na indústria de alimentos e nos serviços de alimentação. Oballe, Rodriguez e Dominguez¹¹ encontraram *S. aureus* em 22% dos manipuladores de um estabelecimento hoteleiro. Monteiro et al¹⁰ encontraram *S. aureus* e *E. coli* em 35% e 55% dos manipuladores de uma cozinha industrial no Ceará. Jeyasekaran et al⁹ relatam a presença de *Listeria monocytogenes* em 5% dos manipuladores de uma indústria pesqueira, enquanto Curtis et al⁴ indicam 21,9% dos manipuladores positivos para *E. coli*. Bastos et al², entretanto, encontraram *S. aureus* e ausência de coliformes termotolerantes em apenas 6% dos manipuladores em indústrias de polpas congeladas no Ceará. Campos, Cruz e Silva³ relatam ainda, ausência de *E. coli* e *S. aureus* e coliformes totais na faixa de 30 – 100 UFC/mão nas mãos de manipuladores em restaurante *self-service* em um campus universitário no Rio de Janeiro.

De um modo geral, os manipuladores dos estabelecimentos apresentaram precários hábitos higiênico-sanitários podendo se tornar veículos de surtos de doenças alimentares na comunidade discente. Medidas corretivas envolvendo treinamento em higiene/ manipulação de alimentos, instruções de limpeza/sanitização e preparo de soluções sanitizantes serão parte de um plano de ação a ser efetuado pelos docentes do curso técnico em Química Industrial do CEFET/Química de Nilópolis a fim de preservar a saúde das pessoas que freqüentam esses estabelecimentos.

Cruz, A. G. da et al. - The question of hygiene of handlers in foodservice establishments located around the campus of CEFET/Química de Nilópolis, RJ. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 62(3): 245 - 248, 2003.

ABSTRACT. The sanitary and hygienic quality of handlers in foodservices establishments (A, B, C, e D) located around campus of Federal Center of Technological Education of Chemistry – CEFET/Química of Nilópolis, RJ was evaluated. Microbiological Analysis for Total and Fecal Coliform MPN, mesophilic aerobic bacteria count and *Staphylococcus aureus* research were performed in the their hands. Results were between 10-294 UFC/ hand for Mesophilic aerobic count and <3 - >2400 MPN/ hand for Total and Fecal Coliform . It was found *S. aureus* on handler of foodservice establishment C. The results confirm the importance of handlers as source of food contamination, indicating potential hazard to the Public Health and being necessary the implantation of corrective actions to minimize the risks faced by the people who consume the foods served at these establishments.

KEY-WORDS. handlers, quality, food safety.

REFERÊNCIAS

1. American Public Health Association. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**, 3rd ed. Washington D.C.1992. 1219 p.
2. Bastos, M.R.S. *et al.* Avaliação Microbiológica das Mãos de manipuladores de polpa de frutas congeladas. **Hig. Alimentar**, 16 (94):55-7, 2002.
3. Campos, F.R.; Cruz, A.G.; Silva, E.S. Perfil Higiênico-Sanitário de restaurante “self-sevice” localizado no campus da UFRRJ. **In: I Simpósio Internacional de Segurança Microbiológica de Alimentos**. São Paulo, 2002. **Anais**. p.24
4. Curtis, M.L.; Fransceschi, O.; Castro, N. de . Assessment of foods microbiological quality in food service establishments. **Archivos Latino Americanos de Nutricion**, 50(2):177-182, 2000.
5. FAO. Codex Alimentarius. Código de procedimentos de higiene para estabelecimentos onde são servidos alimentos pré-cozidos e cozidos em alimentação para coletividades. **In: Associação Brasileira de Empresas de Refeições coletivas**, 2^o ed. São Paulo, 1995.p.123
6. Germano, M.I.S.; Rencinai, S.T.; Germano P.M.L. Grau de Informação dos manipuladores de alimentos em pequenas e médias empresas da cidade de São Paulo.: 6^o Congresso Brasileiro de Higienistas de alimentos, Espírito Santo, 2001. **Anais In: Hig. Alimentar**, 15(80/81): 94, 2001.
7. Germano, M.P.S. et al. Manipuladores de alimentos:Capacitar? É preciso. Regularizar ?... Será preciso ??? **Hig. Alimentar**, 14(78/79):18 - 22, 2000.
8. *International Commission of Microbiological Specifications for Food(ICMSF)*. **APPCC na Qualidade e Segurança Microbiológica de Alimentos**. São Paulo: Varela; 1997. 377p.
9. Jeyasekaran, G. et al. Prevalence of *Listeria sp* in seafood handlers. **J. of Food Sci. and Technol.**, 39(2):173-175, 2002.
10. Monteiro, M C.N. et al. Controle Higiênico sanitário de manipuladores de alimentos de cozinhas industriais do Estado do Ceará. **Hig. Alimentar**, 15(39): 90-3, 2001.
11. Oballe, J.; Rodriguez, F., Dominguez, J.C. Portadores de *S. aureus* em manipuladores de alimentos. **Alimentaria**, 31:33-5, 1993
12. Silva Jr., Eneo Alves da. **Manual de Controle Higiênico Sanitário em Alimentos**. São Paulo: Varela, 2001. 397 p.
13. Wei, H.L.; Chiou, C.S. Molecular subtyping of *Staphylococcus aureus* from an outbreak associated with a food handler. **Epidemiology and Infection**, 128(1):15-20, 2002.

Recebido em 04/08/2003 ; Aprovado em 12/11/2003

Fish residue valorization: application in the quail diet and study of effects in the eggs

Seibel, N. F. - **Fish residue valorization: application in the quail diet and study of effects in the eggs.**

Rio Grande/RS, 2002 [Dissertação de Mestrado - Fundação Universidade Federal do Rio Grande – Departamento de Química].

The use of fish industrialization residues is small in the southern part of Rio Grande do Sul State, Brazil. These residues are generally: accumulated in tanks without receiving any type of treatment, discarded in the vicinity of the industries or taken for low quality fish flour preparation. A simple and cheap alternative for its use is the production of chemical silage. When it is produced in good conditions it can be added in the ration of birds, in a percentile maximum of 10%. In this present work took place a study for the use of the residues under this form, using its solid fraction in the quails ration and evaluating its effects on the physical-chemical characteristics, microbiological, and the sensorial profile of the fatty acids of the eggs. The accomplished analyses were: Haugh Unit; yolk index; relationship albumen/egg, yolk/egg and peal/egg, according to Souza and Souza (1995) and volume of the yolk and albumen; proximal composition, according to A.O.A.C. (1995), and for proteins Micro Kjeldahl's method was used, for lipids the acid hidrolises and for ashes and humidity was used gravimetric method; determination of fatty acid through

gaseous chromatography; sensorial analysis of scent and flavor, through structured scales and evaluation of mesofilos microorganism and psicofilos, according to ABNT (1995), norm MB-3462 Novembro/91, using the plaquement method in depth and in surface, respectively; these analyses were accomplished with samples stored in different times from 0 up to 30 days. The found results demonstrate that was possible the use of residues under the form of chemical silage, that proved to be a stable product; in the quail eggs the physical-chemical characteristics are modified along the time, mainly due to the humidity changes; the sensorial terminology of the scent and flavor of the eggs was gathered in four groups: sweetened, penetrating, oleaginous and farinaceous; the diet has influence in the sensorial characteristics, when the silage didn't contain antioxidant; the storage temperature has great influence in the physical properties of the eggs; at the end of the 30 days of storage the eggs didn't show microbiological contamination; there was a change in the profile of the fatty acids of the quails eggs, in function of the modified diets.

*Tese disponível na Biblioteca da Fundação Universidade Federal do Rio Grande e Universidade Estadual de Londrina.

e-mail: nseibel@pop.com.br

Infecção pelos vírus linfotrópicos de células T humanas dos tipos 1 (HTLV-1) e 2 (HTLV-2) em indivíduos infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) em Londrina e região, Paraná, Brasil

Morimoto, H.K. - **Infecção pelos vírus linfotrópicos de células T humanas dos tipos 1 (HTLV-1) e 2 (HTLV-2) em indivíduos infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) em Londrina e região, Paraná, Brasil.** São Paulo, 2003. [Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP]. Orientador: Profa. Dra. Primavera Borelli. Co-orientador: Profa. Dra. Adele Caterino de Araujo.

A ocorrência de co-infecção entre o HIV e o HTLV-I ou HTLV-II tem sido relatada em várias partes do mundo, provavelmente como consequência de as vias de transmissão desses vírus serem as mesmas, ou seja, contato sexual, transfusão sanguínea, uso de agulhas e/ou seringas contaminadas e de mãe para filho. Frequências variáveis de co-infecção por HIV/HTLV-I e por HIV/HTLV-II têm sido descritas e estas dependem do tipo viral prevalente na região estudada. Sabe-se que esses retrovírus ativam-se mutuamente *in vitro* e existem evidências de que isto também ocorra *in vivo*, estando, assim, a co-infecção relacionada à progressão mais rápida para aids e ao surgimento de leucemias e linfomas de células T e de quadros neurológicos e dermatológicos associados à infecção por HTLV-I/II. O presente projeto de pesquisa teve como objetivo principal determinar a prevalência de infecção pelos vírus HTLV-I e HTLV-II em indivíduos com HIV/aids do município de Londrina e região. Além disso, visou caracterizar a população de indivíduos infectados por retrovírus humanos nesta região geográfica, analisando variáveis sociodemográficas, história prévia de doenças sexualmente transmissíveis (DSTs), presença de outras doenças infecciosas (hepatite B, hepatite C e sífilis) e número de células CD4+. Fatores de risco associados à aquisição dessas retrovíroses foram também pesquisados, assim como a variante viral de HTLV-II que predomina na região. Utilizaram-se nesta pesquisa testes sorológicos de rotina e, no caso de infecção por HTLV-

I e -II, além dos ensaios sorológicos, a reação em cadeia da polimerase (PCR) e a pesquisa de polimorfismo de fragmentos de restrição enzimática (RFLP). Foram entrevistados e participaram do estudo 758 indivíduos, dos quais a maioria era de cor branca, com escolaridade de ensino fundamental completo e pertencente às classes sociais C e D. A média de idade da população foi de aproximadamente 35 anos e a DST mais freqüente foi a gonorréia, seguida de sífilis e condiloma. A contagem de células CD4+ mostrou que a maioria dos pacientes apresentava contagem acima de 200 cels/mm³ de sangue. O principal fator de risco associado à aquisição dessas retrovíroses foi o sexual para a infecção por HIV, e o uso de drogas injetáveis para a infecção por HTLV-I e HTLV-II. Houve associação de infecção por HTLV-I/II com o uso de drogas injetáveis, com a hepatite C e a hepatite B. Usando os resultados obtidos com a sorologia e a biologia molecular para o HTLV-I e -II, foi possível determinar a prevalência de co-infecção por HIV/HTLV-I/II na população geral, que foi de 5,8%, sendo 0,8% para a infecção por HTLV-I e 4,9% para a infecção por HIV/HTLV-II. A PCR se mostrou mais sensível em relação ao teste confirmatório de WB para detectar casos verdadeiramente positivos de infecção por HTLV-II. Houve prevalência de infecção por HTLV-II do subtipo IIa, com predomínio das variantes a4 e a6. Detectaram-se casos de infecção por HTLV-IIa de variantes ainda não descritas na literatura, designadas de aBr, e um caso de infecção por HTLV-II do subtipo b.

*Tese disponível na Biblioteca Digital da USP www.teses.usp.br
e-mail: catarino@ial.sp.gov.br

Neurocisticercose: Aspectos clínicos, epidemiológicos e análise de 171 prontuários do Instituto de Infectologia Emílio Ribas de 1980 a 1990

Bedaque, E.A. Neurocisticercose: **Aspectos clínicos, epidemiológicos e análise de 171 prontuários do Instituto de Infectologia Emílio Ribas de 1980 a 1990**. São Paulo, 2003. [Dissertação de Mestrado – Coordenação dos Institutos de Pesquisa da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo]. Orientadora: Profa. Dra. Adele Caterino de Araujo.

De 171 prontuários de casos de neurocisticercose registrados no Instituto de Infectologia Emílio Ribas no período de 1980 a 1990, foram extraídos os dados possíveis de ordem clínica, epidemiológica e de exploração laboratorial.

O A. procedeu ao estudo individual e conjuntural, estabelecendo tabelas com dados de naturalidade, procedência, idade, ocupação, hábitos, sintomatologia e evolução. Verifica que as informações dos prontuários são deficientes, contrastando com a importância, a frequência e as repercussões graves da doença que, em geral, não é reconhecida de pronto.

Mostra que é indispensável a complementação do diagnóstico clínico-epidemiológico por exames subsidiários do LCR e de neuroimagem e que o seguimento é fundamental para a detecção e tratamento precoces de complicações, tais como, a hidrocefalia, a doença racemosa e as infecções bacterianas concomitantes.

O LCR identificou a eosinofílorraquia em 63% dos pacientes à admissão, as provas imunológicas foram positivas em 85% desses casos, a maioria com história clínica de cefaléia e irritação meníngea, sugestivos do processo meningítico verificado, os exames de neuroimagem identificaram lesões císticas e calcificadas como alteração predominante.

O A. acentua que o diagnóstico de epilepsia tardia deve

incluir a pesquisa da neurocisticercose e que a tríade meningites recorrentes, hipoglicorraquia e neurocisticercose pode indicar a hidrocefalia, a cisticercose racemosa, ou ambas. A febre foi indicativa de gravidade ao acompanhar estes processos inflamatórios recorrentes ou obstrutivos e que culminaram com o óbito. Relata que a neurocisticercose, à admissão, mimetiza meningites bacterianas, meningites virais, meningites indeterminadas, afecções cerebrais neoplásicas, vasculares e uma variedade de outras doenças.

O complexo teníase/cisticercose esteve presente nas áreas rurais e, também, nas urbanas, de regiões consideradas indenes com casos autóctones provenientes dos Estados do Piauí, Rondônia, Goiás e Mato Grosso do Sul. A prevalência da teníase em 3% dos pacientes indica perenidade do parasita heteroxênio no ecossistema brasileiro.

Faz, também, recomendações para que se proceda a um interrogatório meticoloso do paciente sobre a sintomatologia e os seus antecedentes epidemiológicos através da elaboração de interrogatório dirigido próprio, a fim de se obter a idéia para o diagnóstico precocemente. Finalmente descreve o cenário patocenótico do período e, questiona a colocação da neurocisticercose no rol das doenças de notificação compulsória em São Paulo.

*Tese disponível
no site: www.melhoresteses.hpg.com.br
e-mail: nseibel@pop.com.br

AGRADECIMENTOS AOS RELATORES

A COMISSÃO DE REDAÇÃO AGRADECE AOS COLABORADORES DESTE VOLUME

- ADAGMAR ANDRIOLO – Fleury
- ALICE SAKUMA – IAL
- AMIR GEBARA – INSTITUTO BIOLÓGICO
- ANA MARIA RAMALHO DE PAULA – IAL
- ANGELA M. LADEIRA – INSTITUTO DE BOTANICA
- ANTONIO RUFFINO NETO – USP
- BENEDITO LOPES FONSECA – USP
- BERNADETE D. G. M. FRANCO – USP
- CAROL H. COLLINS – UNICAMP
- CELIA MARIA DE SYLOS – UNESP
- CLARICE QUEICO FUJIMURA LEITE – UNESP
- CRISTINA N. ALBUQUERQUE – USP
- DENISE C. BILIA – INSTITUTO DE BOTANICA
- DILZA BASSI MONTAVANI – ITAL
- ELIZABETH APARECIDA F. DA S. TORRES – USP
- EXPEDITO TADEU F. DA SILVEIRA – ITAL
- FLAVIA SALDANHA KUBRUSLY – INSTITUTO BUTANTAN
- GUILHERME PRADO – FUNDAÇÃO EZEQUIEL DIAS
- HELENA GODOY – UNICAMP
- HELOÍSA HELENA B. DE TOLEDO – IAL
- IZILDINHA MORENO – ITAL/
- JAIM LITCHTIG – IAL
- JANE MENEGALDO SNOW – ITAL
- JORGE CÉSAR MASINI – USP
- JORGE MANCINI FILHO – USP
- KIMIYO NONOYAMA – IAL
- LIGIA BICUDO DE ALMEIDA MURADIAN – USP
- LIGIA FERREIRA GOMES – USP
- LINA YAMACHITA OLIVERAS – CIENTEC
- LINDA NISHIHARA – IAL
- LÚCIA VALENTE SOARES – UNICAMP
- LUCILAINE FERRAJOLO – IAL
- LUIZ ANTONIO GIOIELLI – USP
- LUIZ TADEU FIGUEIREDO – USP
- MARCIA BITTAR ATUI – IAL
- MARCIA REGINA BEAUX – UFRJ
- MARCOS A. GONÇALVES MUNHOZ – HOSPITAL DAS CLÍNICAS
- MARIA ANTONIA CALLORI DOMINGUES – USP
- MARIA ISABEL VALLILO – INSTITUTO FLORESTAL
- MARIA LÚCIA RACZ – USP
- MARIA TERESA DE SEIXAS ALVES – UNIFESP
- MARIA TERESA DESTRO – USP
- MARIE SATAKE – Hospital Servidor Público Estadual
- MARILENE DE VUONO PENTEADO – USP
- MÁRIO H. HIRATA – USP
- MARISA LANDGRAF – USP
- MARTA TANIWAKI – ITAL
- MAURO LEITÃO – UNICAMP

- MIYOKO JAKABI – IAL
- MYRNA SABINO – IAL
- PAULO AUGUSTO ACHUCARRO SILVEIRA – HOSPITAL DAS CLÍNICAS
- PAULO ROBERTO NOGUEIRA DE CARVALHO – ITAL
- PRIMAVERA BORELLI – USP
- RAYMUNDO S. AZEVEDO – USP
- REGINA SORRENTINO RODRIGUES MINAZZI – IAL
- RONALDO ZUCATELLI – INSTITUTO BUTANTAN
- ROSA MARIA D. FÁVARO – IAL
- ROSEMAR ANTONIASSI – EMBRAPA
- SEBASTIÃO TIMO IARIA – USP
- SILVANA BOSQUIROLI – LACEN – PR
- SÔNIA MARIA N. LAZZARI – UFPR
- SUELI CABRINI – NESTLÉ DO BRASIL LTDA
- SYLVIA CARDOSO LEÃO – UNIFESP
- TERESA CRISTINA VESSONI PENNA – USP
- TEREZINHA DE JESUS ANDREOLI PINTO – USP
- VERA LUCIA SIGNORELI BALDINI – ITAL
- VICTOR EDUARDO A. ARIAS – FMUSP
- VIVIANE F. BOTOSSO – INSTITUTO BUTANTAN

ISSN 0073-9855



9 770073 985009